



Charakterisierung von Zytoskelett-assoziierten Proteinen
bei der amöboiden Umwandlung
des Humanpathogens *Trichomonas vaginalis*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Gary Kusdian

aus Kleve

Juli 2014

Aus dem Institut für Molekulare Evolution
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Erstgutachter: Professor Dr. William Martin

Zweitgutachter: Professor Dr. Peter Jahns

Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2014

Publikationen

Kusdian G, Wöhle C, Martin WF, Gould SB. 2013. The actin-based machinery of *Trichomonas vaginalis* mediates flagellate-amoeboid transition and migration across host tissue. *Cell Microbiol* 15(10):1707-21.

Gould SB, Wöhle C, Kusdian G, Landan G, Tachezy J, Zimorski V, Martin WF. 2013. Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int J Parasitol* 43(9):707-19.

Wöhle C, Kusdian G, Radine C, Graur D, Landan G, Gould SB. 2014. The excavate parasite *Trichomonas vaginalis* expresses thousands of pseudogenes and long non-coding RNAs independently from neighboring genes. *BMC Genomics*: eingereicht.

Kusdian G, Zimorski V, Gould SB, Martin WF. 2014. Trichomonads. In: Mehlhorn H, editor. *Encyclopedia of Parasitology*, 4th Edition. Springer: eingereicht.

Tagungsbeiträge

Kusdian G, Martin WF, Gould SB. 2011. Characterization of the actin-bundling protein plastin in *Trichomonas vaginalis*. ACOP: 1st Asian Congress of Protistology, Jeju, Südkorea. Posterpräsentation.

Kusdian G, Wöhle C, Martin WF, Gould SB. 2012. Characterization of the actin-bundling protein TvFIM1 in *Trichomonas vaginalis*. DGZ: 35. Jahrestagung, Dresden, Deutschland. Posterpräsentation.

Kusdian G, Wöhle C, Radine C, Graur D, Landan G, Martin WF, Gould SB. 2012. Long non-coding RNAs in *Trichomonas vaginalis*. ISOP/ISEP: Protist, Oslo, Norwegen. Posterpräsentation.

Kusdian G, Wöhle C, Martin WF, Gould SB. 2012. Early infection dynamics of *Trichomonas vaginalis*. BMFZ: 7. Klausurtagung, Bergisch-Gladbach, Deutschland. Vortrag.

Kusdian G, Wöhle C, Martin WF, Gould SB. 2013. Early cytoskeletal dynamics of *Trichomonas vaginalis* upon contact with human tissue. ICOP: International Congress of Protistology, Vancouver, Kanada. Vortrag.

Kusdian G, Wöhle C, Zimorski V, Martin WF, Gould SB. 2013. Early infection dynamics of *Trichomonas vaginalis*. BMFZ: 8. Klausurtagung, Wermelskirchen, Deutschland. Vortrag.



Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Abstract	3
3	Einleitung	5
3.1	Das Zytoskelett	5
3.1.1	Tubulin	7
3.1.2	Aktin.....	10
3.1.3	Intermediär-Filament Proteine	11
3.2	<i>Trichomonas vaginalis</i>	12
3.3	Der Infektionsmechanismus von <i>T. vaginalis</i>	16
3.4	Ziele der Dissertation	19
4	Material und Methoden	21
4.1	Abkürzungen	21
4.2	Chemikalien und Medien	22
4.3	Enzyme.....	22
4.4	Antikörper und Fluorophore.....	22
4.5	Antibiotika	22
4.6	Oligonukleotide.....	23
4.7	Kits.....	23
4.8	Vektoren	24
4.9	Organismen und deren Kultivierung	25
4.9.1	<i>Trichomonas vaginalis</i>	25
4.9.2	Humane, vaginale Epithelzellen	27
4.9.3	<i>Escherichia coli</i>	28
4.10	Molekularbiologische Methoden.....	28
4.10.1	Nukleinsäuren.....	28
4.10.2	Proteine.....	31
4.11	Bioinformatische Methoden.....	37

5	Ergebnisse.....	39
5.1	Die divergente Morphologie von <i>T. vaginalis</i> während der Infektion von Wirtszellen ..	39
5.2	Die Rolle von Aktin im Zytoskelett.....	43
5.2.1	Während der Infektion steigt die Menge an Aktin.....	46
5.2.2	Aktin lokalisiert während der amöboiden Phase in fibrösen Strukturen	47
5.2.3	Interaktionspartner von Aktin	49
5.3	<i>TvFIM1</i> als Aktin-interagierendes Protein	55
5.3.1	<i>TvFIM1</i> bündelt Aktinfilamente.....	57
5.3.2	<i>TvFIM1</i> re-lokalisiert in amöboiden Zellen in Akkumulationen.....	60
5.3.3	Phagozytose von Hefe und die Lokalisation von <i>TvFIM1</i>	64
5.3.4	Transkriptionsanalysen von <i>TvFim1</i>	65
5.4	GFP in <i>T. vaginalis</i> als Lebendzell-Marker.....	68
5.5	Centrin lokalisiert an der undulierenden Membran in <i>T. vaginalis</i>	71
5.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	75
6	Diskussion.....	77
6.1	Das Zytoskelett von <i>Trichomonas vaginalis</i> während der Infektion von Wirtszellen	77
6.2	Die Rolle von <i>TvFIM1</i> im Aktin-basierten Zytoskelett	82
6.3	Die Rolle von Centrin in <i>Trichomonas vaginalis</i>	87
6.4	Erkenntnisse der Arbeit	90
6.5	Ausblick	93
7	Anhang.....	96
8	Literaturverzeichnis.....	106

1 Zusammenfassung

Das Zytoskelett ist maßgeblich an der mechanischen Stabilität, der aktiven Bewegung, der Form und Transporte innerhalb der Zelle beteiligt. Es stellt ein dynamisches System an unterschiedlichen Filamentarten dar, welches mit zahlreichen anderen Proteinen miteinander verbunden ist und mit diesen interagiert. Die Säulen des eukaryotischen Zytoskeletts sind Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediär-Filamente.

Der eukaryotische, einzellige und flagellierte Humanparasit *Trichomonas vaginalis* nimmt als evolutiv-ursprünglicher Organismus eine besondere Stellung in Bezug auf das Zytoskelett ein, da es eine nicht weit verbreitete Eigenschaft aufweist: Während der Infektion des menschlichen Urogenitaltrakts wandelt sich der pyriforme, ovale Protist zu einer amöboiden, adhärenen Zelle um, so dass die Kontaktfläche zu dem Wirtsepithel maximiert wird. Dabei verbleibt der Parasit stets extrazellulär. Diese Morphogenese wird – je nach Virulenz des Stammes – binnen Minuten vollzogen und ist ebenso schnell reversibel.

Diese Dissertation zeigt, dass das amöboide Stadium vornehmlich durch das Aktin-basierte Zytoskelett gesteuert wird, wie es für andere amöboide Organismen bereits bekannt ist. Die Identifizierung von Aktin-assoziierten Proteinen mittels Co-Immunopräzipitation und anschließender Sequenzierung mittels MALDI-TOF stellt eine Aktin-Maschinerie mit allen wichtigen Aktin-bindenden Proteinen, außer einem Motorprotein, dar. Das ubiquitäre, eukaryotische Aktin-Motorprotein Myosin ist verantwortlich für den Transport entlang von Aktinfilamenten und konnte nach wie vor nicht für *T. vaginalis* identifiziert werden. Das Aktin-bindende Protein TvFIM1, welches zu der Klasse der Fimbrine gehört, wurde in Immunofluoreszenz- und *in vitro*-Studien näher charakterisiert. TvFIM1 verstärkt die Polymerisierung von Aktin-Monomeren zu Filamenten und bündelt diese auf parallele und anti-parallele Weise. Während der Umwandlung in das amöboide Stadium re-lokalisiert das Protein in distinkten Akkumulationen an den äußeren Stellen der Pseudopodien und in Cluster, welche dynamisch agieren. Auch während der Phagozytose von Hefe lokalisiert TvFIM1 an der

umschließenden Seite des Parasiten. Dabei ko-lokalisiert das Protein stets mit Aktin. Für die Lebendzell-Observierung wurde das grün-fluoreszierende Protein (GFP) als Marker für TvFIM1 im anaeroben Organismus *T. vaginalis* mit Einschränkungen etabliert.

Als eine weitere Komponente des Zytoskeletts wurde Centrin in *T. vaginalis* näher charakterisiert. TvCEN1, 2, 4 und 6 werden von allen acht Centrin-Homologen am höchsten exprimiert und lokalisieren stets an der undulierenden Membran und im Atraktophor, die Gesamtheit aller fünf Basalkörper der Flagellen, die über sigmoide Fasern verbunden sind. Die Lokalisation ändert sich während der Zellteilung nicht, was darauf hindeutet, dass Centrin in *T. vaginalis* eine strukturgebende Funktion von Mikrotubuli hat. Die kontraktile Wirkung des Proteins unterstützt die Verbindung der rückläufigen Flagelle mit der Costa, einer subsidiären, rigiden Struktur im Cytosol.

2 Abstract

The cytoskeleton plays a major role in the mechanical stability, the active movement, shape, and trafficking within the cell. It provides a dynamic system of different types of filaments, which is connected together with numerous other proteins and interacts with them. The pillars of the eukaryotic cytoskeleton are actin filaments, microtubules and intermediate filaments.

The eukaryotic, unicellular and flagellated human parasite *Trichomonas vaginalis* takes as an evolutionarily-primitive organism a special position in relation to the cytoskeleton, because it has a not far-spread ability: during the infection of the human urogenital tract, the pyriform, oval protist transforms into an amoeboid-adherent cell in order to maximize the surface towards the host epithelium, while remaining extracellular. This morphogenesis is – dependent on the strain virulence – achieved within several minutes and is reversible at the same speed rate.

This dissertation shows that the amoeboid stage is primarily controlled by the actin-based cytoskeleton, as it is already known for other amoeboid organisms. The identification of actin-associated proteins by means of co-immunoprecipitation and subsequent sequencing using MALDI-TOF reveals an actin machinery with canonical actin-binding proteins, except a motor protein. The ubiquitous eukaryotic actin motor protein Myosin is responsible for the transport along actin filaments and could still not be identified for *T. vaginalis*. The actin-binding protein TvFIM1, which belongs to the class of Fimbrins, was characterized in immunofluorescence and *in vitro* studies more thoroughly. TvFIM1 enhances the polymerization of actin monomers into filaments and bundles them in a parallel and anti-parallel manner. During the transition into the amoeboid stage the protein re-localizes in distinct accumulations on the outer sites of the pseudopodia and in clusters which act dynamically. Also during the phagocytosis of yeast TvFIM1 localizes to the surrounding site of the parasite, always co-localizing with actin. For live cell imaging the green fluorescent protein (GFP) has been established as a marker for TvFIM1 in the anaerobic organism *T. vaginalis* with limitations.

As a further component of the cytoskeleton Centrin has been characterized in detail in *T. vaginalis*. TvCEN1, 2, 4 and 6 are the highest expressed of all eight Centrin homologues and always locate at the undulating membrane and in the atractophore, the sum of all five basal bodies of the flagella, which are connected via sigmoid fibers. The localization does not change during cell division, suggesting that Centrin in *T. vaginalis* has a structuring function of microtubules. The contractile function of the protein supports the connection of the recurrent flagellum with the costa, a supportive, rigid structure in the cytosol.

3 Einleitung

Eine biologische Zelle bezeichnet die kleinste lebensfähige Einheit aller Organismen und stellt ein autarkes und selbsterhaltendes System dar. Alle Zellen erhalten ihre mechanische Stabilität durch ein Gerüst an unterschiedlichen Filamenten und ein Zusammenspiel verschiedener Proteine. In der Gesamtheit handelt es sich um das Zytoskelett.

3.1 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett befähigt Zellen dem mechanischen Stress ihrer Umgebung standzuhalten, ihre Form zu ändern, sich zu bewegen und die Struktur innerhalb der Zelle während des Wachstums oder der Teilung zu gewährleisten. Es besteht aus einem System von unterschiedlichen Filamenten mit einzigartigen Funktionen. Bei Eukaryoten beinhalten sie beispielsweise die Trennung der Chromosomen während der Mitose, den intrazellulären Transport zwischen Organellen oder die Unterstützung der fragilen Plasmamembran (Nicklas und Koch 1969; Pochon-Masson 1967; Watanabe et al. 1988). Erstmals in Eukaryoten entdeckt, wurde das Zytoskelett in den letzten Jahren mit zahlreichen Studien

Tabelle 3.1 Gegenüberstellung von prokaryotischen Proteinen und eukaryotischen Homologen des Zytoskeletts gefolgt und deren Eigenschaften und Funktionen (nach Monahan and Harry 2009).

Prokaryotisches Protein	Eukaryotisches Homolog	Eigenschaft / Funktion in Prokaryoten
FtsZ	Tubulin	Formt einen kontraktilen Ring in der Zellmitte zur Induktion der Zellteilung.
BtubA/BtubB	Tubulin	Nur in wenigen Prokaryoten präsent und vermutlich durch horizontalen Gentransfer von Eukaryoten gewonnen.
MreB	Aktin	Formt ein helikales Element, welches an der Zellmorphogenese oder Chromosomentrennung beteiligt ist.
ParM	Aktin	Wird zu helikalen Filamenten assembliert, die eine wichtige Rolle bei der Plasmidsegregation spielen.
MamK	Aktin	Koordiniert die intrazelluläre Organisation der Magnetosomen in magnetotaktischen Bakterien.
Crescentin	Intermediär-Filament Protein	Strukturgebendes Protein, welches bspw. die Wölbung des Bakteriums <i>Caulobacter crescentus</i> bestimmt.

über homologe Strukturen bzw. Proteine in Prokaryoten und deren Rolle als Vorreiter des eukaryotischen Zytoskeletts erforscht (s. Tab. 3.1, Wickstead und Gull 2011). Weitaus umfangreichere Analysen beschäftigen sich jedoch mit dem Zytoskelett der Eukaryoten, welches aus drei unterschiedlichen Klassen von Proteinen besteht: Tubulin, Aktin und Intermediär-Filament Proteinen (s. Abb. 3.1). Alle drei Klassen können zu filamentösen Strukturen assembliert werden, die in engem Zusammenspiel mit anderen Proteinen unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die Filamente sind äußerst dynamisch und können sich mittels interagierender Proteine schnell an neue Gegebenheiten anpassen. Ein Beispiel für das Zusammenspiel der drei Filamentarten ist die Zellteilung: Nachdem sich die Chromosomen repliziert haben, bildet sich ein bipolarer Spindelapparat aus und segregiert diese zu zwei separaten Tochter-Nuklei, die wiederum durch Intermediär-Filament Proteine geschützt werden (Jones et al. 1985). Während der Teilung sorgt ein Aktinfilament-Netzwerk und dessen Motorprotein Myosin für das Ausbilden eines kontraktilen Rings, der die Zelle abschnürt, wodurch zwei neue Zellen entstehen (s. Abb. 3.2, Schroeder 1973).

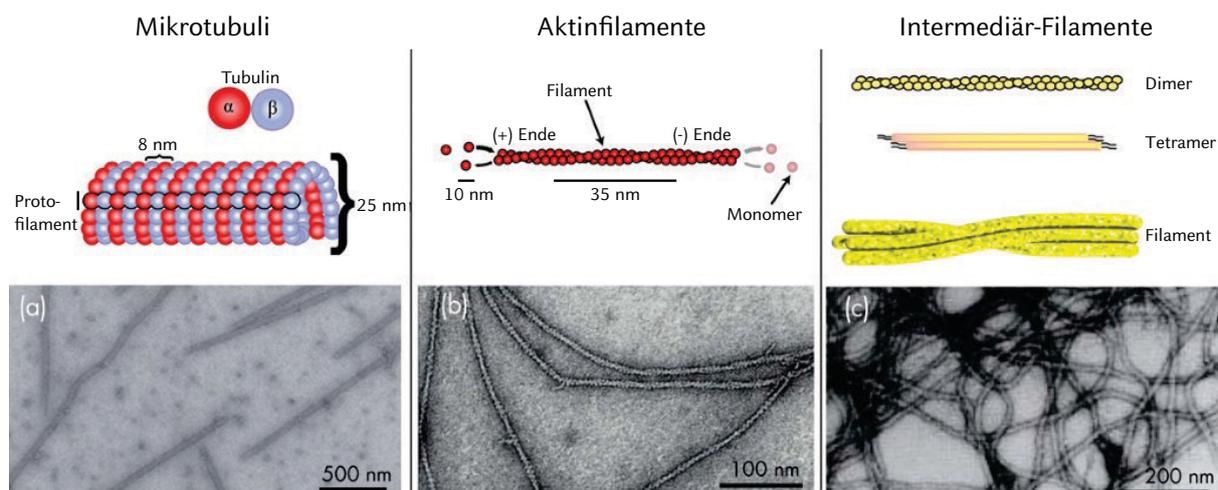


Abbildung 3.1 Vergleich der drei Hauptbestandteile des eukaryotischen Zytoskeletts in Illustration und elektronenmikroskopische Aufnahmen: Mikrotubuli bestehen aus Protofilamenten, welche aus α - und β -Tubulinen hervorgehen, Aktinfilamente werden aus globulären Aktin-Monomeren synthetisiert und weisen (wie auch Mikrotubuli) eine Polarität auf und Intermediär-Filamente werden aus α -helikalen Monomeren gebildet, die zu dimeren und tetrameren Strukturen führen. Nach Huber et al. 2013.

Die Untereinheiten der jeweiligen Filamente sind durch schwache nicht-kovalente Bindungen charakterisiert, welche die rapide Reorganisation der Filamente gewährleisten (Downing and Nogales 1998b).

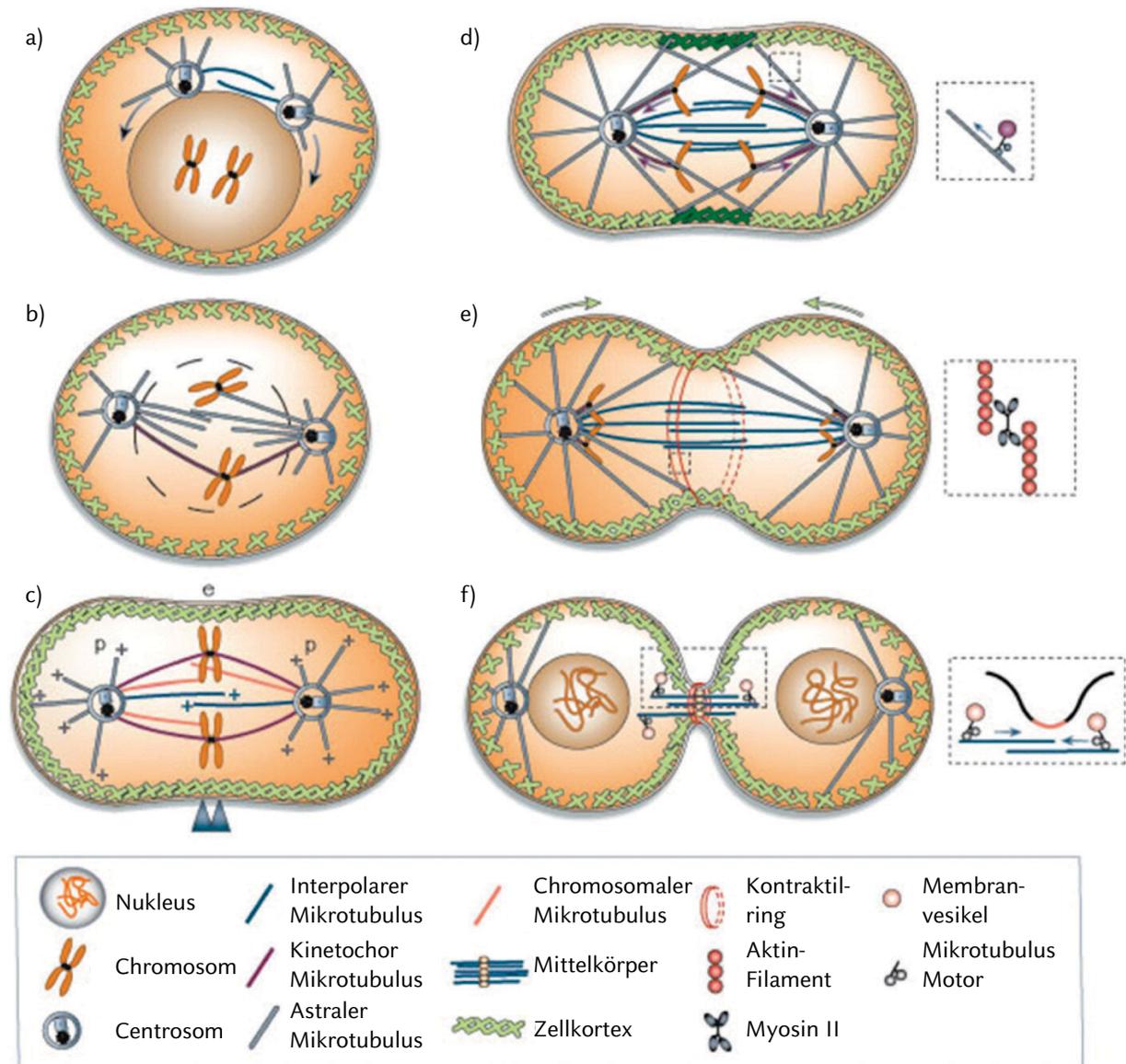


Abbildung 3.2 Schema der allgemeinen Zellteilung mit dem Fokus auf Cytoskelett-Komponenten und dem Zusammenspiel der drei Filamentklassen Aktin, Tubulin und Intermediär-Filament Proteinen. a) Prophase. Die duplizierten Centrosomen migrieren zum Zellkern (Centrosomen, welche aus zuvor verdoppelten Centriolen bestehen und von pericentriolarem Material umgeben sind, beginnen die Assemblierung der Mikrotubuli und bilden die Spindelpole aus.). b) Prometaphase. Die Nukleushülle wird abgebaut so dass die Mikrotubuli die Chromosomen zur Zellmitte ziehen können. c) Metaphase. Schwesterchromatide (Pfeilkopf) sind zum gegenüberliegenden Pol (p) gerichtet. d) Anaphase A. Chromatide werden zu den gegenüberliegenden Polen der Zelle gezogen (Segregation). e) Anaphase B. Die Teilungsfurche entsteht durch einen Actomyosin-Komplex und es entsteht der kontraktile Ring. f) Telophase. Die Nukleushülle wird erneut aufgebaut, der Mittelkörper entsteht, welcher die Zellen abschnürt und so zwei neue Zellen entstehen. Nach Huber et al. 2013.

3.1.1 Tubulin

Tubuline bzw. die daraus entstehenden Mikrotubuli bestimmen die Lage der membran- gebundenen Organellen und sind am intrazellulären Transport beteiligt (Singh et al. 2008). Ferner sind sie Hauptbestandteil von Flagellen oder Cilien und bilden dort das Axonem,

welches aus zwei zentralen Einzel-Mikrotubuli besteht, umgeben von neun peripheren Doppelmikrotubuli. Mikrotubuli sind röhrenartige, polare Strukturen, bestehend aus 13 parallelen Protofilamenten, welche aus Heterodimeren von globulärem α - und β -Tubulin gebildet werden (s. Abb. 3.3). Jede einzelne Tubulin-Einheit besitzt eine GTP-Bindestelle. Je länger eine Untereinheit Teil eines Filaments ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird (Downing and Nogales 1998a; Downing and Nogales 1998c). Dies hat zur Folge, dass der Anbau eines weiteren Moleküls dort biochemisch ungünstiger ist. Zusammen mit der strukturellen Differenz der Mikrotubuli-Pole kommt es zum kontinuierlichem Abbau am (-) Ende und Anbau am (+) Ende, was *treadmilling*-Effekt genannt wird. Weitere dynamische Möglichkeiten von Mikrotubuli entstehen, wenn GTP-gebundene Tubulin-Monomere am (-) Pol (also GDP-gebundene Monomere) assembliert werden und so eine GTP-Kappe bilden. Die Kappe

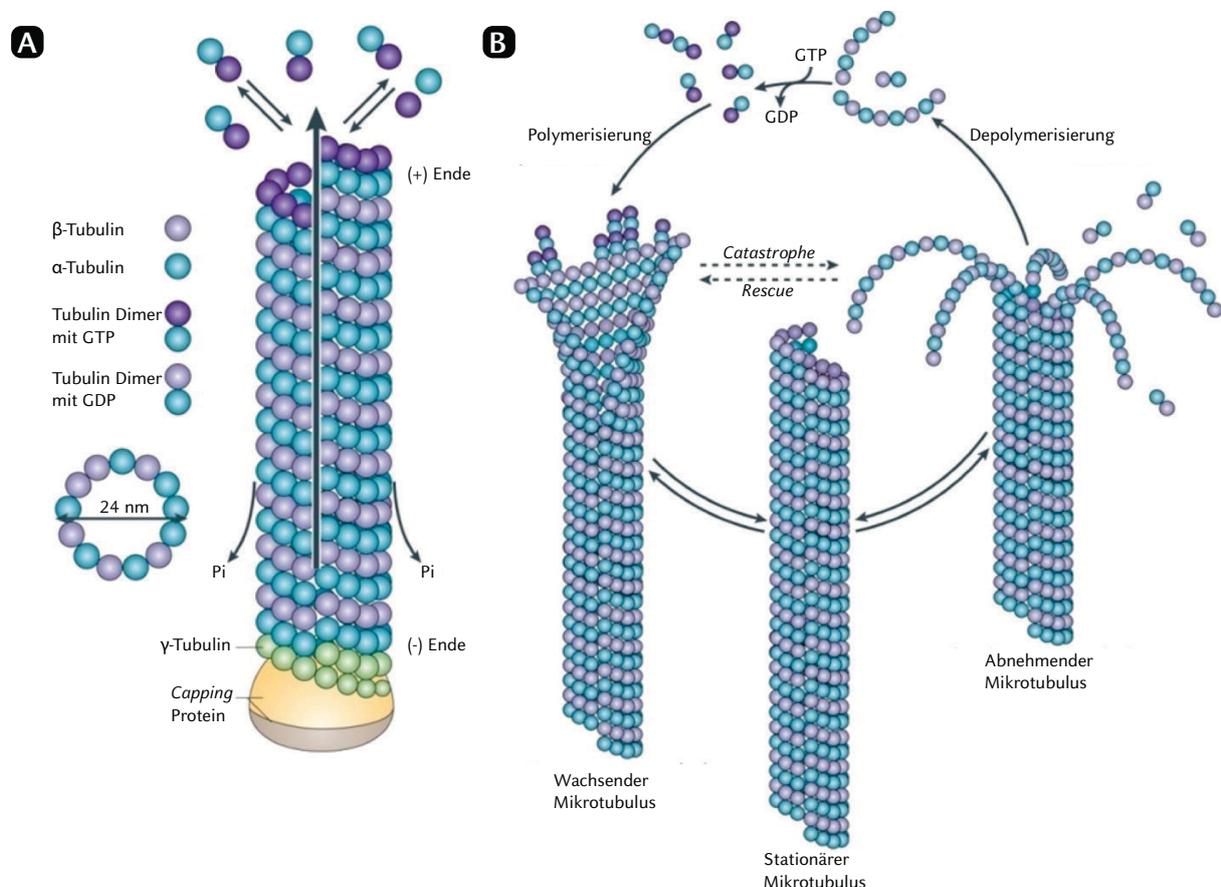


Abbildung 3.3 Assemblierung und dynamische Instabilität von Mikrotubuli. A) Im GTP-gebundenem Stadium polymerisieren Tubulin-Heterodimere zu einem Rohr aus üblicherweise 13 Protofilamenten. Nach der Polymerisierung findet die GTP-Hydrolyse statt. B) Nachdem die Konzentration der GTP-Dimere eine kritische Grenze unterschreitet, werden GDP-Dimere auseinandergerissen und der Mikrotubulus verkürzt sich (*Catastrophe*). Dieser Prozess kann nur durch einen Anstieg an GTP-Dimeren rückgängig gemacht werden (*Rescue*). Nach Huber et al. 2013.

sorgt für eine rasche Elongation des Filaments an dem Pol (*rescue*), kann jedoch durch das Wegfallen jener ebenfalls schnell verkürzt werden (*catastrophe*) (Gardner et al. 2013). Eine weitere Art von Tubulin-Monomeren sind γ -Tubuline, die eine wichtige Rolle bei dem Polymerisierungsbeginn von Mikrotubuli erfüllen und daher in dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum aufzufinden sind (*microtubule-organizing center, MTOC*, Oakley et al. 1990). Einen solchen MTOC bildet beispielsweise das Centrosom, eine Struktur bestehend aus zwei Centriolen, welche rechtwinklig zueinander stehen, geschützt von einer Matrix in der Nähe des Zellkerns. Die Centriole ist eine zylindrische Anordnung von modifizierten Mikrotubuli und einer Vielzahl von akzessorischen Proteinen. Trotz der Tatsache, dass nicht jede Zelle ein Centrosom als MTOC besitzt, dienen γ -Tubuline stets als Polymerisierungsbeginn der Mikrotubuli. Einzelne Centriolen werden als Basalkörper definiert – der Ursprung von Flagellen oder Cilien – und sind ebenfalls ein MTOC (Yubuki und Leander 2013).

Aufgrund ihrer Röhrenform und des einhergehend größeren Durchmessers (25 nm) gehören Mikrotubuli zu den starken und stabilen Filamenten der drei Klassen. Einige der wichtigsten akzessorischen Proteine der Mikrotubuli sind Stathmin, Katanin und die Motorproteine Kinesin und Dynein (Vallee und Shpetner 1990). Stathmin bindet Untereinheiten und hindert diese an der Polymerisierung (Horwitz et al. 1997), während Katanin Mikrotubuli durchtrennt (Sharp und Ross 2012). Kinesin wurde erstmals im Riesenaxon von Tintenfischen als Transporter von Organellen charakterisiert (Vale et al. 1985). Das Motorprotein bewegt sich in Richtung des (+) Endes der Mikrotubuli, während Dynein sich nur zum (-) Ende bewegen kann. Dyneine sind verantwortlich für den Vesikeltransport, aber auch für das Schlagen von Flagellen oder Cilien und erreichen dabei Geschwindigkeiten von bis zu 14 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (Kumar et al. 1995; Mazumdar et al. 1996; Takahashi et al. 1982). Das Axonem weist eine „9+2“ Struktur auf, welches auf die neun speziell angeordneten Doppel-Mikrotubuli, verbunden durch Dynein-Ärmchen, die ein Mikrotubulus-Paar umkreisen, zurückzuführen ist. Ein wichtiges Protein, welches mit den Flagellen assoziiert, ist Centrin, das einerseits für die Duplikation der Centriolen (sowohl im Centrosom als auch im Basalkörper (Koblenz et al. 2003)), aber auch für das Durchtrennen von Mikrotubuli verantwortlich und in Flagellen lokalisiert ist (Baron et al.

1995; Salisbury et al. 1988; Sanders und Salisbury 1994). Die Mehrheit der ubiquitären Centrine ist jedoch nicht in Centrosomen aktiv, sondern in anderen Kompartimenten, die bisher nicht hinreichend untersucht wurden (Paoletti et al. 1996). Centrin wurde erstmals aus der flagellierten Grünalge *Tetraselmis striata* isoliert (Salisbury et al. 1984) und dort als verantwortliches Protein für die Kontraktion von filamentösen Strukturen abhängig von dem Ca^{2+} -Ionenanteil in der Zelle charakterisiert (Melkonian et al. 1992).

3.1.2 Aktin

Aktin bestimmt die Form der Zelloberfläche und wird für die Fortbewegung genutzt. So ist das Entstehen von sogenannten Filopodien (eindimensionale Ausstülpung), Lamellipodien (zweidimensional, blatt-ähnliche Strukturen) und Pseudopodien (dreidimensional, vollzogen von bspw. Amöben), welche Extensionen der Zelle sind, aktin-basiert. Zudem wirken Aktinfilamente stützend auf die Plasmamembran der Zelle und nehmen eine essentielle Rolle während der Endozytose ein (Berepiki et al. 2011; Galletta und Cooper 2009). Sie bestehen aus globulären Aktin-Molekülen (G-Aktin, 42 kDa), die eine ATP-Bindestelle aufweisen, an der die Hydrolyse von ATP zu ADP stattfinden kann. Das Aktin-Protein hat einen (-) und einen (+) Pol, was ebenfalls eine Polarität von Aktinfilamenten (F-Aktin) und somit auch den *treadmilling*-Effekt zur Folge hat (Cleveland 1982). Auch bei dieser Filamentart wird die Polymerisierung am (+) Pol favorisiert (Welch und Mullins 2002). Ihre dünne Beschaffenheit (7 nm Durchmesser) macht sie zu den fragilsten Filamenten der Zytoskelett-Klassen (Pollard und Cooper 1986).

Während die Bildung der Mikrotubuli im Inneren der Zelle nahe des Nukleus auftritt, werden Aktinfilamente hauptsächlich in der Nähe der Plasmamembran synthetisiert. Der Zellkortex – eine dünne, proteinöse Schicht unterhalb der Plasmamembran – besteht aus Aktinfilamenten, bestimmt somit die Zellform und befähigt zur Motilität. Ein Korrelat zu γ -Tubulin als Synthesestarter ist bei Aktinfilamenten der Arp2/3 Komplex (*actin-related protein*, Arp), welches eine netzwerkartige Struktur von Filamenten zur Folge hat. Weitere wichtige akzessorische Proteine der Aktinfilamente sind Formin, Profilin, Gelsolin und das Motorprotein Myosin mit seinen verschiedenen Derivaten. Formin hat eine ähnliche Funktion wie der Arp2/3 Komplex, bei dem parallele

Filament-Anordnungen entstehen (Bogdan et al. 2013). Profilin bindet an dem (+) Ende von Monomeren, welche leichter an dem (+) Ende von Filamenten binden und beschleunigt dadurch die Elongation von Aktinfilamenten (Courtemanche et al. 2013), während Gelsolin diese durchtrennen kann (Marino et al. 2013). Myosin II war das erste Motorprotein, welches entdeckt wurde (Parrish und Mommaerts 1954) und generiert Muskelkontraktionen. Das Protein besteht aus einer langen Kette, welche eine α -helikale *coiled-coil* Umwindung mit einem zweiten Myosin Protein vollzieht, und einer leichten Kette am N-Terminus, welche als Kopf-Domäne bezeichnet wird. Dort wird durch ATP-Hydrolyse die Bewegung in Richtung des (+) Endes von Aktinfilamenten mit einer Geschwindigkeit von bis zu 60 $\mu\text{m}/\text{sec}$ gewährleistet (Rogers und Gelfand 1998). Jedoch gibt es eine weitere Klasse (Myosin VI), die auch in (-) Richtung des Aktinfilaments wandern kann (Sweeney und Houdusse 2010a). Weiterhin wurden Fimbrin und α -Actinin charakterisiert, die kompetitiv wirken (Bündelung von Aktinfilamenten, (Hanein et al. 1998; Sjoblom et al. 2008)) und Spectrin, welches die Anbindung von Filamenten mit der Plasmamembran vollzieht (Naydenov und Ivanov 2011). Filamin verbindet Aktinfilamente zu einer viskosen 3D-artigen Matrix, die der Ausbildung von Lamellipodien dient (Wang und Singer 1977). Diese Matrix steht in engem Zusammenspiel mit Myosin, welches eine Kontraktion des gesamten Netzwerks zur Folge hat und somit den „hinteren“ Teil der Zelle mit in die Bewegungsrichtung zieht (Golsteyn et al. 1997). Der Steuerung der Reorganisation des Aktinfilament-Netzwerks wurden bisher drei Klassen an Rho-GTPasen zugeschrieben: Cdc42 induziert Filopodien, Rac Lamellipodien und Rho sorgt für Adhäsion und Fibrillenbündel (Nobes und Hall 1995).

3.1.3 Intermediär-Filament Proteine

Intermediär-Filament Proteine sind für den mechanischen Halt der Zelle zuständig, wie z.B. die schützende Ummantelung der Erbinformation im Zellkern (Omary et al. 2004). Während alle eukaryotischen Zellen Aktin und Tubulin aufweisen, ist dies nicht geltend für Intermediär-Filament Proteine. Diese Klasse von Zytoskelett-Proteinen ist beispielsweise präsent in Vertebraten, Nematoden und Mollusken – vornehmlich also Metazoen – jedoch nicht ubiquitär in jedem Zelltyp. Die Bausteine solcher Filamente sind

Tetramere aus parallelen *coiled-coil* Domänen, die wiederum aus α -helikalen Monomeren bestehen. Im Gegensatz zu Aktin und Tubulin-Dimeren weisen die Tetramere keine Bindestelle für Nukleosid-Triphosphate auf und bilden aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaft – resultierend aus den α -Helices – keine polaren Enden aus (Crick 1953). Zusätzlich sorgen die starken lateral-hydrophoben Wechselwirkungen der *coiled-coil* Proteine für eine sehr flexible Struktur ohne zu brechen – ähnlich einem Seil (Oshima 2007). Intermediär-Filamente sind weitestgehend selbst-organisierend, jedoch sind akzessorische Proteine ebenfalls präsent, wie Filaggrin, welches z. B. Keratinfilamente bündelt (Steinert et al. 1981), oder Plectin, welches übergreifend mit Mikrotubuli oder auch Aktinfilament-Bündel interagiert und diese mit Intermediär-Filamenten verbindet (Castanon et al. 2013).

Intermediär-Filamente wurden bisher hauptsächlich in Metazoen studiert – in einzelligen Eukaryoten, den Protisten, verblieb diese Klasse an Proteinen lange Zeit weitestgehend unangetastet (El-Haddad et al. 2013; Fleury-Aubusson 2003). Die Vielfalt der Organismen innerhalb der Protisten zeigt, dass das Zytoskelett dieser Zellen komplex ist und die gleichen Funktionen erfüllen kann wie bei mehrzelligen Organismen, trotz der Abundanz hoch-spezialisierter Organe.

3.2 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis ist ein einzelliger Eukaryot (Protist) und gehört zu dem Taxon der Trichomonadida in dem Phylum Parabasalia. Letzteres beinhaltet ausschließlich anaerobe Organismen. In der aktuellen Systematik der höheren Eukaryoten werden die Parabasalia der Gruppe der Excavata zugeordnet (Adl et al. 2005). Als anaerober Organismus greift *T. vaginalis* nicht auf aerobe Mitochondrien als energie-produzierendes Organell zurück, sondern auf eine anaerobe Form der Mitochondrien, die Hydrogenosomen. Namensgebend ist dabei der Wasserstoff (*hydrogen*), welcher als Nebenprodukt bei einer ATP-liefernden Substratkettenphosphorylierung ausgehend von Pyruvat entsteht (Müller et al. 2012). Der parasitär lebende Protist gilt als ein evolutionär ursprünglicher Organismus (Martin und Müller 1998). Der Parasit ist mikroaerophil (Guschina et al. 2009). Sauerstoff wirkt auf

T. vaginalis in geringen Mengen nicht lethal und wird toleriert, da zahlreiche Enzyme zur Sauerstoff-Detoxifizierung vorhanden sind (Putz et al. 2005), die während Sauerstoff-Stress hochreguliert werden (Gould et al. 2013).

Als Humanpathogen ist er verantwortlich für die sexuell übertragbare, nicht-virale Krankheit Trichomoniasis, welche mit einer jährlichen Okkurrenz von 190 Millionen Neuinfektionen weltweit neben Chlamydien, Gonorrhö und Syphilis zu den meist verbreitetsten gehört (Van der Pol 2007). Dabei basiert diese Zahl der

Neuinfektionen weitestgehend auf mikroskopischer Observierung von Nasspräparaten, bei der eine verringerte Erkennungsrate bereits bestätigt wurde (Smith et al. 2005) und lässt somit vermuten, dass die tatsächliche Anzahl weitaus höher ist. Die Behandlung basiert auf 5-Nitroimidazol Derivaten wie Metronidazol und Tinidazol, die selektiv gegen anaerobe Bakterien und Parasiten wirken. Jedoch erhebt die Resistenz von 2,5–10% getesteter Stämme gegenüber Metronidazol Anspruch auf andere Möglichkeiten der Behandlung (Conrad et al. 2013; Schwebke und Barrientes 2006).

Die Morphologie von *T. vaginalis* ist unterschiedlich bei frei-schwimmender und amöboider Form, welches in Kapitel 3.3 näher beschrieben wird. Im frei-schwimmenden Stadium hat die Zelle eine ovoide Form – der Nukleus befindet sich am anterioren Ende der Zelle. Vier Flagellen ragen ebenfalls an dieser Seite heraus – die fünfte Flagelle ist posterior gerichtet, ragt bis zum Ende der Zelle und wird als undulierende Membran bezeichnet, da sie eng mit dieser assoziiert ist. Das Zytoskelett von *T. vaginalis* weist einzigartige Strukturen auf bestehend aus Costa, Pelta und Axostyl, welches als Mastigont-System bezeichnet wird (Benchimol 2010). Die Costa ist ein strukturiertes Element, bestehend aus geriffelten Wurzelfasern auf der cytosolischen Seite der undulierenden

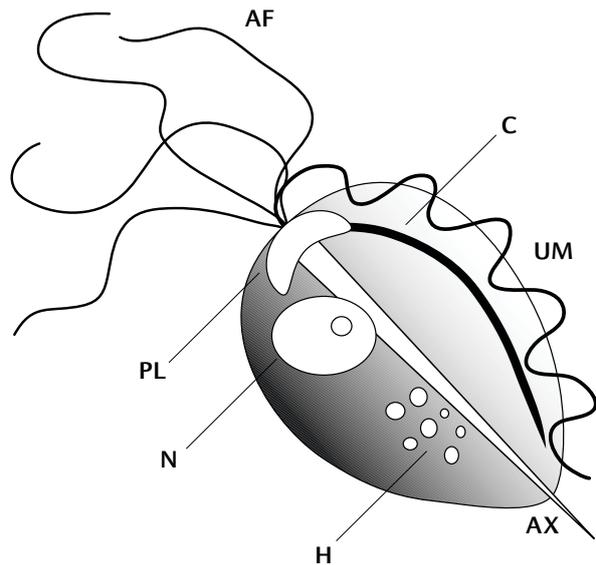


Abbildung 3.4 Illustration von *Trichomonas vaginalis*. Vier anteriore Flagellen (AF) entspringen den Basalkörpern, welche von der Pelta (PL) ummantelt werden. Das damit verbundene Axostyl (AX) verläuft über den Median der gesamten Zelle. Die fünfte Flagelle ist posterior gerichtet und bildet die undulierende Membran (UM), welche von der Costa (C) gestützt wird. Der Nukleus (N) befindet sich anterior, die Hydrogenosomen (H) befinden sich meist entlang des Axostyls.

Membran und wirkt unterstützend (Brugerolle 1991). Costa und undulierende Membran sind über Schichten von Mikrofibrillen miteinander verbunden. Die Pelta ist eine gebogene, flächenförmige Struktur und umgibt die Basalkörper der Flagellen, welche in *T. vaginalis* die Centriolen ersetzen (Zuo et al. 1999). Schließlich ist das Axostyl eine rigide, longitudinale Struktur, weitestgehend bestehend aus Mikrotubuli (s. Abb. 3.6, (36), (38), (39) und (43)), welche entlang des Zellmedians führt (s. Abb. 3.4). In Abb. 3.5, welche den

nahen Verwandten *Tritrichomonas muris* darstellt, wird gezeigt, dass Axostyl (Ax) und Pelta (Pe) eine Einheit in Form einer Ummantelung bilden und somit Pelta-Axostylar-Komplex genannt werden (de Andrade Rosa et al. 2013). Trichomonaden bilden keine Zysten aus, können jedoch unter Stressbedingungen Pseudozysten ausbilden, indem sie ihre Flagellen mit Hilfe von Centrin Proteinen am Basalkörper internalisieren (Pereira-Neves und Benchimol 2009; Stockdale 2008).

Centrin wurde bereits mittels eines Antikörpers gegen *Chlamydomonas* Centrin an den Basalkörpern und der undulierenden Membran von *T. vaginalis* lokalisiert (Brugerolle et al. 2000). Die Basalkörper weisen eine bestimmte Orientierung auf: Jener der rückläufigen

Flagelle ist orthogonal zu den anderen gelegen, welche eine feste Position haben. Über eine Lamina und sigmoide Fasern sind die Basalkörper mit dem Pelta-Axostylar-Komplex verbunden. Bei den sigmoiden Fasern (Abb. 3.5, F₂) wurde bereits eine Assemblierung von Mikrotubuli observiert, was ein Hinweis auf einen MTOC sein könnte (Brugerolle 1991) und bei *T. vaginalis* Atraktophor genannt wird (Benchimol 2004). Die Basalkörper werden

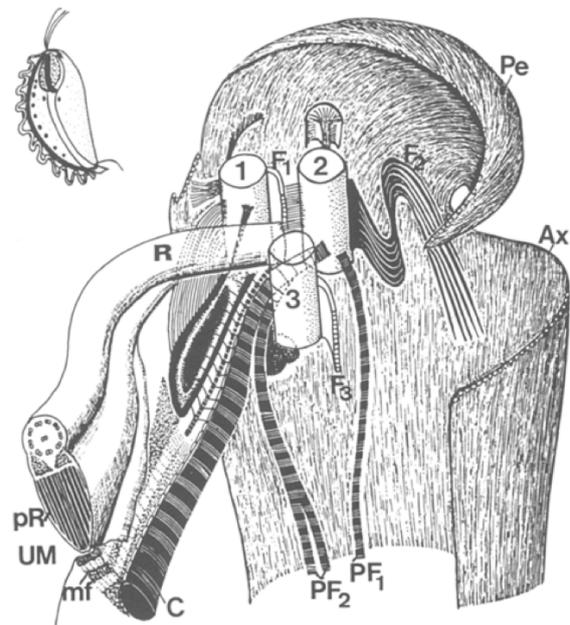


Abbildung 3.5 Rekonstruktion des Flagellen- und Zytoskelett-Systems in *Tritrichomonas muris*; Basalkörper 1, 2, 3 der anterioren Flagellen sind in einer festen Position um den Basalkörper R der rückläufigen Flagelle angelegt. Die regelmäßig verlaufenden Stränge zum Basalkörper sind: Zwei parabasale Fasern (PF₁ und PF₂), die Costa (C), sigmoide Fasern (F₂) und die hakenförmige Lamina (F₁ und F₃). Die achsenparallele Stabform der rückläufigen Flagelle (pR) und die Mikrofibrillenschichten (mf) bestimmen die Form der undulierenden Membran (UM), welche mit der anliegenden Costa verbunden ist. Die mikrotubulären Fasern der Pelta (Pe) und des Axostyls (Ax) umhüllen diesen Komplex (Brugerolle 1991).

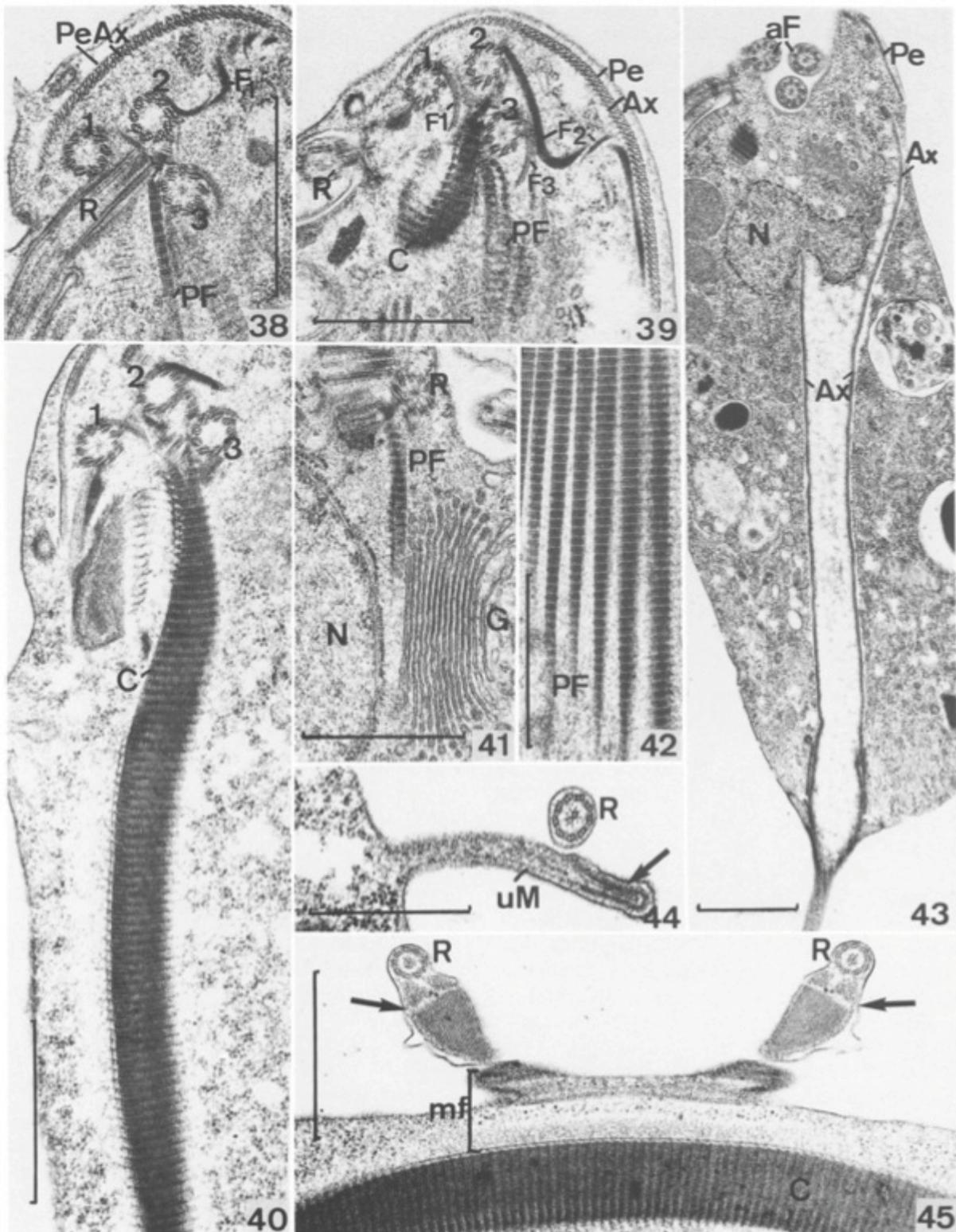


Abbildung 3.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Zytoskeletts von Vertretern der Trichomonadidae. (38) und (39) Verteilung der Basalkörper in *Monocercomonas* (38) und *Tritrichomonas* (39). Basalkörper 1, 2, 3 der anterioren Flagellen liegen orthogonal zum Basalkörper (R) der rückläufigen Flagelle. Die hakenförmige Lamina (F₁ und F₃) und die sigmoiden Fasern (F₂) sind mit dem Pelta(P)-Axostylar(Ax)-Komplex verbunden; die parabasale Fasern (PF) und Costa (C). (40) Die regelmäßige Struktur der Costa (C) verbunden mit dem Basalkörper aus *Tritrichomonas*. (41) und (42) Parabasale Fasern (PF) stützen den Golgi-Apparat (G) in *Monocercomonas* (41) und Bündel von (PF) in *Trichonympha* (42). (43) Longitudinale Sektion des Pelta(P)-Axostylar(Ax)-Komplexes in *Tritrichomonas*. Anteriore Flagelle (aF) und Nukleus (N). (44) Interne faserige Struktur (Pfeil) in der undulierenden Membran (uM) in *Trichomitus*. (45) Achsenparallele Strukturen (Pfeil) in der rückläufigen Flagelle (R) von *Tritrichomonas muris* und die Verbindungen über Mikrofibrillen (mf) mit der Costa (C), welche die Form der undulierenden Membran bestimmen (Brugerolle 1991).

vor der Crypto-Pleuromitose – einer besonderen Form der Längsteilung und geschlossener Mitose, bei der die Nukleushülle intakt bleibt und der Spindelapparat extranuklear bindet (Bricheux et al. 2007; Ribeiro et al. 2002a) – dupliziert.

Das Genom von *T. vaginalis* ist 160 Mbp groß und umfasst ca. 60.000 codierende Gene verteilt auf sechs Chromosomen (Carlton et al. 2007). Jedoch bestehen 65% des Genoms aus repetitiven Sequenzen, was durch die rasche Expansion der Genfamilien und Genomduplikations-Ereignisse nach der evolutiven Aufteilung von *T. vaginalis* und *T. tenax* begründet wird (Cui et al. 2007). Eine aktuellere Studie, welche diese Expansionen berücksichtigt und Genfamilien zusammenfasst, schätzt die Genomgröße auf 175 Mbp mit 46.000 codierenden Genen (Smith und Johnson 2011).

3.3 Der Infektionsmechanismus von *T. vaginalis*

Eine essentielle Komponente der Ansiedlung von *T. vaginalis* im Urogenitaltrakt des Menschen ist die rapide Umformung der Zellmorphologie (Lal et al. 2006). Die freischwimmende Zelle flacht sich ab, um die amöboide, adhärente Form einzunehmen, resultierend in einer Vergrößerung der Kontaktfläche zu den Wirtszellen. Auf diese Fähigkeit können nur wenige Protisten zurückgreifen, wie beispielsweise *Naegleria gruberi* und *Physarum polycephalum* (Fritz-Laylin et al. 2010b; Ryan et al. 2011). Die Umformung von *T. vaginalis* findet innerhalb weniger Minuten statt und ist ebenso schnell reversibel, im Gegensatz zu der Transformation von *N. gruberi*, die mehr als eine Stunde andauert (Fritz-Laylin et al. 2010a). Dabei sind die Eigenschaften und der Grad der Umwandlung von *T. vaginalis* sehr stamm-spezifisch (Lustig et al. 2013).

Der molekulare Mechanismus dieser Pathobiologie wurde bereits investigiert, jedoch gibt es nach wie vor nur Ansätze, die den Verlauf erklären. Es wurde bereits erforscht, dass Oberflächenproteine von *T. vaginalis* die Adhärenz an die Wirtszellen initiieren. Sie unterteilen sich in drei Klassen (Ryan et al. 2011): i) Ein kontroverses Set an metabolischen Proteinen, welchem als zweite Funktion die Adhärenz zugeschrieben wird. Darunter fallen Enzyme, die an der Substratkettenphosphorylierung in den Hydrogenosomen beteiligt sind und ebenfalls an der Zellmembran die Adhäsion

induzieren sollen (Garcia und Alderete 2007; Meza-Cervantez et al. 2011). ii) Ein Lipophosphoglycan, welches in der Glycocalyx des Parasiten lokalisiert ist und mit dem humanen Galectin-1 interagiert (Okumura et al. 2008). iii) Eine Vielfalt von Membranproteinen, welche kürzlich durch genomische und proteomische Analysen identifiziert wurde. Diese beinhaltet beispielsweise die BspA Proteinfamilie, welche an der Zelloberfläche lokalisiert ist (Hirt 2013; Noël et al. 2010). Der Parasit bleibt während der Infektion stets extrazellulär und sekretiert dabei Mikrovessel, die physische und biochemische Eigenschaften von Exosomen aufweisen. Durch das Einschleusen von RNA und exosomalen Proteinen wird die Immunantwort der Wirtszellen moduliert (Twu et al. 2013). Schließlich konnten parasitäre Proteasen identifiziert werden, welche die humane, extrazelluläre Matrix abbauen (Piña-Vázquez et al. 2012).

Molekularbiologische Untersuchungen sind in *T. vaginalis* weitestgehend etabliert, wie die genetische Modifikation des Organismus mittels Elektroporation zwecks Markierung von bestimmten Proteinen (Delgadillo et al. 1997), jedoch stellt die anaerobe Lebensweise eine Herausforderung für Teilgebiete der molekularbiologischen Forschung dar. Der Einsatz des grün fluoreszierenden Proteins (*green fluorescent protein*, GFP) – erstmalig charakterisiert in der Qualle *Aequorea victoria* (Shimomura et al. 1962) – erbrachte ein einfaches Werkzeug für die Zellobservierung *in vivo* (Chalfie et al. 1994). Zur Fluoreszenz von GFP ist die Zyklisierung, Dehydratation und Oxidierung des Tripeptids Ser-Tyr-Gly an Positionen 65–67 innerhalb des Chromophors nötig (Heim et al. 1994). Dies geschieht spontan in der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff. Gleichzeitig ist die Fluoreszenz abhängig von dem pH-Wert und der Temperatur (Belpaire et al. 2005; Elsliger et al. 1999). Aufgrund des mangelnden Sauerstoffs und des relativ niedrigen pH-Werts von 6,2 bei der Kultivierung von *T. vaginalis* wurde GFP als molekularer Marker zwar vorgeschlagen (Benchimol 2004), jedoch bisher nicht erschlossen.

Die amöboide Umwandlung gehört ebenfalls zu einem nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus, verbindet jedoch die beiden Typen der zellulären Fortbewegung bei Eukaryoten: Tubulin-basiertes, flagelliertes Schwimmen und Aktin-basiertes, amöboides Gleiten. In Amöben und Parasiten innerhalb der Gruppe der Apicomplexa ist das Aktin-basierte Zytoskelett eine Schlüsselkomponente der

Zellbewegung (Baum et al. 2008; Fukui 2002). In *T. vaginalis* wurde das Aktin-Zytoskelett erstmals im Jahr 1996 untersucht und zeigte eine Lokalisierung von Aktinfilamenten in der Mikrofibrillen-Schicht an der Adhäsionszone von amöboiden Zellen (Brugerolle et al. 1996). Durch Zugabe des von einigen Pilzen ausgeschiedenen Stoffwechselprodukts Cytochalasin, welches an Aktinfilamente bindet und diese an der Polymerisierung hindert, wurde die Fähigkeit der Adhäsion von *T. vaginalis* stark verringert, was ebenfalls für das Aktin-basierte Zytoskelett spricht (Gold und Ofek 1992). Derivate von Aktin-Genen wurden identifiziert und zeigen eine hohe Homologie zu Vertebraten-Aktin (Bricheux und Brugerolle 1997). Bekannte Aktin-Derivate aus *T. vaginalis* sind zusammen mit ihren durchschnittlichen Expressionswerten in Tab. 3.2 aufgelistet (s. Erläuterung in Legende).

Tabelle 3.2 Identifizierte Aktin-Derivate in *Trichomonas vaginalis* mit ihren TVAG Nummern (trichdb.org) und durchschnittlichen Expressionswerten in willkürlichen Einheiten (*arbitrary units*, a.u.). Die Ziffer zeigt die absolute Anzahl der sequenzierten mRNAs dieser Gene von *T. vaginalis* bei 11 unterschiedlichen Konditionen. Je höher diese Zahl ist, desto stärker wurde dieses Gen in der Zelle exprimiert (Aurrecoechea et al. 2009; Elmendorf et al. 2010; Gould et al. 2013).

TVAG Nummer	Expression [a.u.]	TVAG Nummer	Expression [a.u.]
TVAG_337240	288.145	TVAG_200190	55.741
TVAG_054030	174.328	TVAG_150270	47.465
TVAG_485210	142.022	TVAG_149090	38.612
TVAG_249200	98.943	TVAG_310030	20.459
TVAG_160060	78.823	TVAG_172680	16.196
TVAG_090470	74.807	TVAG_247170	190

Als Aktin-interagierende Proteine wurden in *T. vaginalis* bisher lediglich Coronin und α -Aktinin charakterisiert (Bricheux et al. 2000; Bricheux et al. 1998). Eines der wichtigsten Aktin-interagierenden Proteine, welches die Rolle als Motorprotein erfüllt, ist Myosin. Derivate von solchen Proteinen wurden bisher nicht in *T. vaginalis* entdeckt (Carlton et al. 2007; Wickstead und Gull 2011), was jedoch auch an einer radikalen, evolutionären Entwicklung der Gensequenzen und der damit einhergehenden bioinformatischen Unidentifizierbarkeit liegen kann (Richards und Cavalier-Smith 2005).

3.4 Ziele der Dissertation

Der flagellierte Protist *Trichomonas vaginalis* weist während seiner Infektion von Zellen des menschlichen Urogenitaltrakts eine immense Morphogenese binnen kürzester Zeit auf, um seine Pathogenität vollständig auszuschöpfen. Von einer ovoiden, frei-schwimmenden Zelle formt sich der Parasit zwecks Oberflächenvergrößerung zu einem amöboiden Körper. Das Zytoskelett leistet hier einen enormen Umbauprozess. Diese Umwandlung kombiniert zwei Elemente des eukaryotischen Zytoskeletts: Aktin und Tubulin. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung interagierender Proteine. Der Fokus lag dabei auf der Identifizierung von putativen Myosin-Derivaten oder anderen neuen Motorproteinen zur Interaktion mit Aktinfilamenten. Der parasitär lebende Protist *Giardia lamblia* besitzt ebenfalls keine codierenden Gene für Myosin oder Homologe (Morrison et al. 2007) und greift dennoch auf ein komplexes Aktin-Zytoskelett zurück (Paredes et al. 2011).

T. vaginalis besitzt zwei Homologe der Fimbrin/Plastin Familie, von denen eines bereits als Aktin-interagierendes Protein (*TvFIM1*) identifiziert wurde (Kusdian 2011). Die Vertiefung der Analysen an diesem Protein sollten weitere Erkenntnisse über die Beteiligung des Proteins am Aktin-Netzwerk während der Morphogenese erbringen. Dies inkludiert *in vitro* Versuche mit Aktin-Monomeren und –Filamenten, um die Interaktion beider Proteine genauer zu untersuchen. Weiterhin sollten Versuche auf Transkriptions- (Expressionslevel unter endogenen und Knockdown Bedingungen) und Translationsebene (Lokalisierung, Akkumulation in der Zelle) Aufschluss über das Protein geben. Dabei wurden unterschiedliche Bedingungen, wie die Infektion von humanen, vaginalen Epithelzellen oder die Phagozytose von Hefe, berücksichtigt. Der Einsatz eines GFP-Tags (*green fluorescent protein*) für *TvFIM1* sollte in *T. vaginalis* etabliert werden, um neben fixierten Immunofluoreszenz- auch auf Lebendzellaufnahmen zurückgreifen zu können. Dieser Tag war bisher keine Option für den anaeroben Parasiten, aufgrund der Tatsache, dass GFP zum Ausbilden seines Fluorophores Sauerstoff braucht (Belpaire et al. 2005). Alternativen für eine Protein-spezifische Markierung und ihre Lebend-Observierung gibt es für den Protisten nur geringfügig, wie den HaloTag®, der einen Liganden zum

Fluoreszieren benötigt oder eine umstrittene Methode der Transfektion mit viraler RNA und GFP (Li et al. 2012; Martincova et al. 2012).

Für Mikrotubuli-Strukturen sollten Centrin-Homologe in *T. vaginalis* identifiziert und lokalisiert werden, um deren Funktion im Zytoskelett einzuordnen. Diese Proteine interagieren mit Mikrotubuli-Strukturen, wie Basalkörper oder Centrosomen. Eine Lokalisation an der undulierenden Membran sollte nachgewiesen werden (Brugerolle et al. 2000), jedoch mit einem Ansatz auf Gen-Ebene mit spezifischem Tag, um die einzelnen Centrin-Derivate in *T. vaginalis* näher zu charakterisieren und Unterschiede zwischen ihnen durch den Einsatz des endogenen Promotors zu erörtern.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Proteine des Zytoskeletts von *T. vaginalis* während der Infektion näher zu charakterisieren. Hierzu sollten Aktin-bindende Proteine identifiziert werden und Interaktionsexperimente mit Aktin und dem Protein TvFIM1 Aufschluss über die Rolle des Proteins während der Morphogenese des Parasiten erbringen. Weiterhin sollten Mikrotubuli-assoziierte Proteine ebenfalls untersucht werden, um ihre Rolle im Umbauprozess des Zytoskeletts zu determinieren.

4 Material und Methoden

4.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung	KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
ATP	Adenosintriphosphat	LB	<i>lysogeny broth</i> ; Bakterienmedium
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>	M	mol pro Liter
bp	Basenpaare	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
BSA	Bovine serum albumin	MgSO ₄	Magnesiumsulfat
bzw.	beziehungsweise	min	Minute
ca.	circa	ml	Milliliter
cm	Zentimeter	mM	Millimolar
CO ₂	Kohlendioxid	NaCl	Natriumchlorid
CoA	Coenzym A	NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	nm	Nanometer
DEPC	Diethyldicarbonat	OD	Optische Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
DTT	Dithiothreitol	pH	-log ₁₀ (H ⁺)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RT	Raumtemperatur
ESTs	<i>expressed sequence tags</i>	SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
<i>et al</i>	und andere	sec	Sekunde
g	gramm	TBS-T	<i>Tris-buffered saline</i> (Tween)
g	Erdbeschleunigung [9,81 m × s ⁻¹]	TEMED	Tetramethylethylendiamin
G418	Geneticindisulfat	TrichDB	<i>Trichomonas vaginalis</i> Genom Datenbank
H ₂ O	Wasser	TYM	Medium für <i>T. vaginalis</i> (<i>trypton-yeast extract-maltose medium</i>)
HCl	Salzsäure	U	Einheiten (<i>units</i>)
IgG	Immunglobulin	ÜN	über Nacht
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	V	Volt
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat	v/v	Volumenprozent
kDa	Kilo-Dalton	w/v	Gewichtsprozent

4.2 Chemikalien und Medien

Sämtliche Chemikalien lagen in höchster Reinheit und Qualität (*p.a.*) vor. Puffer, Medien und andere Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt und durch Dampfdruck-Sterilisation autoklaviert, bzw. sterilfiltriert.

4.3 Enzyme

<i>Bam</i> HI-HF®	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	New England Biolabs
<i>Kpn</i> I-HF®	New England Biolabs
<i>Nde</i> I	New England Biolabs
<i>Nsi</i> I	New England Biolabs
<i>Sac</i> II	New England Biolabs
Phusion® High-Fidelity Polymerase	New England Biolabs
T4 DNA Quick-Ligase	New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	5Prime
Trypsin-EDTA	GIBCO

4.4 Antikörper und Fluorophore

Fluoroshield™	Mounting Medium mit DAPI (F6057)	Sigma
HaloTag® TMR	Ligand zur Detektion des HaloTags®	Promega
Phalloidin	Texas Red®-X (T7471)	Invitrogen
α-Aktin (A4700)	monoklonaler Antikörper aus Maus	Sigma
α-GFP (C163)	monoklonaler Antikörper aus Maus	Invitrogen
α-HA (H6908)	monoklonaler Antikörper aus Kaninchen	Sigma
α-HA (H9658)	monoklonaler Antikörper aus Maus	Sigma
α-Kaninchen	Alexa fluor 633 (A21086)	Invitrogen
α-Maus IgG	Alexa fluor 488 (A11001)	Invitrogen
α-Maus IgG	ImmunoPure, Peroxidase gekoppelt	Pierce
α-Ratte IgG	Alexa fluor 594 (A11007)	Invitrogen
α-Ratte IgG	ImmunoPure, Peroxidase gekoppelt	Pierce
α-Streptag® II	Peroxidase gekoppelt	Novagen
α-TvFIM1	polyklonaler Antikörper aus Ratte	Eurogentec

4.5 Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Geneticin (G418)	Roth
Penicillin/Streptomycin	Biomedicals LLC

4.6 Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit genutzten Oligonukleotide wurden bei den Firmen Metabion (Steinkirchen) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

<i>TvAkt1_NdeI_F</i>	5' GGT GGT CAT ATG GCT GAA GAA GAC GTT CA 3'
<i>TvAkt1_KpnI_R</i>	5' GGT GGT GGT ACC GAA GCA CTT GCG GTG GAC 3'
<i>TvFim1_NdeI_F</i>	5' CTG ACG CAT ATG GCT GTA AAC GCT GCG 3'
<i>TvFim1_BamHI_R</i>	5' GAC GTG GAT CCT TGA TCC ATG GCC ATA AGA GA 3'
<i>TvFim1_qFOR</i>	5' ACA ACC TTT ACG ACG GCA TC 3'
<i>TvFim1_qREV</i>	5' GCT TTG TCT TGT TGG CCT TC 3'
<i>40SRibo_qFOR</i>	5' GCA TTG ATC AGG CTC TCT CC 3'
<i>40SRibo_qREV</i>	5' ATG CGC TCA AGT TCG TCT TT 3'
<i>asTvFim1_BamHI_F</i>	5' GGT GGT GGA TCC CGT ATG AGC CTT CTC AAG AC 3'
<i>asTvFim1_NdeI_R</i>	5' GGT GGT CAT ATG GCC GTC AGC GAT GCC G 3'
<i>TvFim2_NdeI_F</i>	5' GGT GGT CAT ATG GTC AAC ATG GCT TCA GAA 3'
<i>TvFim2_BamHI_R</i>	5' GAC GTG GAT CCT TGG AGA ATC ATC AAA GAA GCA T 3'
<i>Halo_R</i>	5' GCT CGC CCA GGA CTT CC 3'
<i>TvCen1_SacII_F</i>	5' GGT GGT CCG CGG ATC AAA TCG AAC CAC GAA AAT TC 3'
<i>TvCen1_BamHI_R</i>	5' GGT GGT GGA TCC GAA ATC ACC TTC CAT CAT TCT T 3'
<i>TvCen2_SacII_F</i>	5' GGT GGT CCG CGG CTG CTG CTG GAG CTC GT 3'
<i>TvCen2_KpnI_R</i>	5' GGT GGT GGT ACC TTT TCC GTA TTT TTT AGC AGG ATC 3'
<i>TvCen4_SacII_F</i>	5' GGT GGT CCG CGG TTG TTG TTT AAT CAA ACT ATA AAA TCT T 3'
<i>TvCen4_HindIII_R</i>	5' GGT GGT AAG CTT ATG GGC AGC ATG TGT TGG AT 3'
<i>TvCen6_SacII_F</i>	5' GGT GGT CCG CGG TGT TTT AGT ACT AAA AAG ATA TTA CAA T 3'
<i>TvCen6_BamHI_R</i>	5' GGT GGT GGA TCC AAA TGT AAG CAT AAT CTG AAC GAG 3'

4.7 Kits

CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Scientific
DNase I (RNase-free)	Fermentas
DNAzol®	Invitrogen
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad
MinElute™ Gel Extraction Kit	Qiagen
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
Power SYBR® Green	Applied Biosystems
Qubit® Quant-iT dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen
Qubit® Quant-iT Protein Assay Kit	Invitrogen
Qubit® Quant-iT RNA Assay Kit	Invitrogen
Quick Ligation™ Kit	New England Biolabs
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
TRIzol®	Invitrogen

WesternBright ECL Spray	Advansta
μMACS™ HA Epitope Tag Protein Isolation Kit	Miltenyi Biotec
μMACS™ Protein G MicroBeads	Miltenyi Biotec

4.8 Vektoren

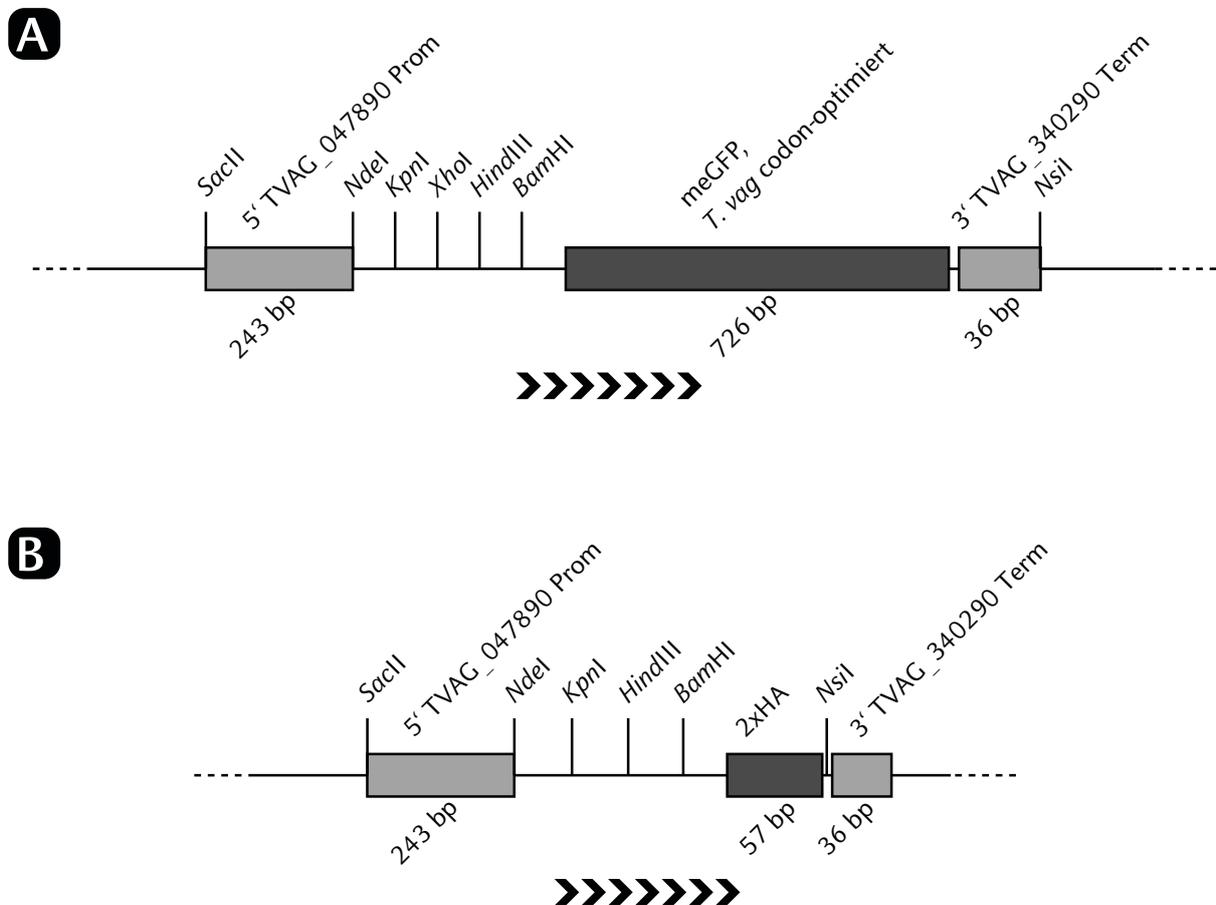


Abbildung 4.1 Schemata des Polylinkers (*multiple cloning site, MCS*) von pTv_GFP (A) und pTv_HA (B). Beide Vektoren basieren auf pTagvag2 (Hrdy et al. 2004). Die neue MCS wurde mit der codon-optimierten Sequenz von monomerischem, verbessertem GFP (*monomeric, enhanced GFP*) bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und über *NdeI* und *NsiI* in pTagvag2 inseriert. Diese Sequenz diente anschließend für die Etablierung von pTv_HA, welche über *SacII* und *BamHI* inseriert wurde.

Die in dieser Arbeit genutzten Vektoren basieren, sofern nicht zugehörig zu einem Klonierungskit, wie pJET (s. Kap. 4.6), auf pTagvag2 – freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. J. Tachezy, Prag, Tschechien (Hrdy et al. 2004). Die Polylinker der neu etablierten Vektoren pTv_GFP und pTv_HA sind in Abb. 4.1 dargestellt. Die Sequenz des Polylinkers inklusive Sequenz für das grün-fluoreszierende Protein (monomerisches, verbessertes GFP, meGFP) wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg)

synthetisiert und über die Endonukleasen *SacII* und *NsiI* in pTagvag2 inseriert. Der Vektor pTv_HA wurde durch das Inserieren des Polylinkers über die Restriktionsstellen *SacII* und *BamHI* in pTagvag2 erstellt. Für die endogene Expression mittels Gen-eigenem Promotor wurden 200 Nukleotide in 5'-Richtung ausgehend von der codierenden Sequenz mit *SacII* mitkloniert, so das der ursprüngliche SCS-Promotor (TVAG_047890) ersetzt wird.

4.9 Organismen und deren Kultivierung

4.9.1 *Trichomonas vaginalis*

In dieser Arbeit wurden drei Stämme von *Trichomonas vaginalis* eingesetzt: T1 (Tai et al. 1993) – zur Verfügung gestellt von J.-H. Tai (Institute of Biomedical Sciences, Taipeh, Taiwan), T016 (Alderete et al. 1987) – zur Verfügung gestellt von J. Alderete (School of Molecular Biosciences, Pullman, USA) und FMV1 (Jesus et al. 2004) – zur Verfügung gestellt von M. Benchimol (Santa Ursula University, Rio de Janeiro, Brasilien).

Alle Stämme wurden, sofern nicht anders angegeben, in konischen 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 12 ml TYM-Medium pH 6,2 (s. Tab. 4.1) möglichst anaerob bei 37 °C kultiviert. Zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen wurde der Kultur eine Penicillin/Streptomycin Lösung [1% (v/v)] zugesetzt. Bei transfizierten *T. vaginalis* Zellen wurde zusätzlich das Neomycin Derivat G418 (100 µg/ml) als Selektionsmarker hinzugefügt. Die Kulturen wurden täglich mit ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen bzw. jeden zweiten Tag mit einem Zehntel der Zellen in 12 ml TYM-Medium inokuliert.

Tabelle 4.1 Zusammensetzung des TYM Mediums pH 6,2 und der Eisenlösung zur Kultivierung von *Trichomonas vaginalis* nach (Clark und Diamond 2002; Diamond 1957).

TYM Medium pH 6,2		Eisenlösung	
2,22%(w/v)	Tryptose	1% (w/v)	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄)×6H ₂ O
1,11% (w/v)	Hefeextrakt	0,1% (w/v)	5-Sulfosalicylsäure
15 mM	Maltose		
9,16 mM	L-Cystein		
1,25 mM	L(+)-Ascorbinsäure		
0,77 mM	KH ₂ PO ₄		
3,86 mM	K ₂ HPO ₄		
10% (v/v)	Pferdeserum		
0,71% (v/v)	Eisenlösung		

4.9.1.1 Infektion von humanen, vaginalen Epithelzellen

Für die Infektion von humanen, vaginalen Epithelzellen (s. Kap. 4.9.2) wurden diese entweder auf Ibidi μ -Slides VI^{0.4} (Lebendzellobservierung) oder BD Falcon™ *CultureSlides* (Immunofluoreszenzaufnahmen) Objektträger nach vorangegangener Trypsinisierung überführt. Dabei wurde jeweils mit einem Zehntel einer konfluent angewachsenen Zellkultur in einer T25 Zellkulturflasche inokuliert, gefolgt von einer Inkubation von mindestens 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ zur Anhaftung der Zellen am Boden der Zellkulturflasche. Danach wurde das VEC-Medium abgenommen und die Wirtszellen mit ca. $2,5 \times 10^6$ *T. vaginalis* Zellen pro Kammer (*CultureSlide*) bzw. $2,5 \times 10^5$ pro Kanal (μ -Slide VI^{0.4}) infiziert. Es folgte erneut eine Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ bis zur Observierung oder Fixierung.

Der beladene μ -Slide VI^{0.4} (Ibidi, #80606) wurde am Fluoreszenzmikroskop AxioObserver.Z1 der Marke Zeiss unter 5% CO₂ und 37 °C in einer Inkubationskammer observiert (s. Kap. 4.10.2.6). Für die Infektion im *CultureSlide* wurde die Präparation der Immunofluoreszenzaufnahmen angeknüpft (s. Kap. 4.10.2.5).

4.9.1.2 Phagozytose von *S. cerevisiae* durch *T. vaginalis* Zellen

In diesem Experiment phagozytiert *T. vaginalis* durch die Abwesenheit von Pferdeserum im TYM Medium die zugesetzten Hefezellen. Dafür wurde Hefepulver (RUF Lebensmittelwerk KG, Quakenbrück, Deutschland) in sterilem Wasser (37 °C) resuspendiert und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Hefezellen dreimal mit 0,1 M PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄) gewaschen und mit einer Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml in Pferdeserum-freien TYM Medium verdünnt. *T. vaginalis* Zellen wurden ebenfalls in Pferdeserum-freien TYM Medium mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml resuspendiert und im Verhältnis 1:50 mit Hefezellen in einer Kammer eines *CultureSlides* (BD Falcon™, #354114) für 15 min bei 5% CO₂ und 37 °C inkubiert. Die Nutzung von Pferdeserum-freien TYM Medium dient dazu, dass *T. vaginalis* nicht auf seine endozytotische Nährstoffaufnahme, sondern auf die Phagozytose von Hefe zurückgreift. Im Anschluss der Inkubation folgte die Immunofluoreszenz-Präparation (s. Kap. 4.10.2.5).

4.9.1.3 Zellzählung von *T. vaginalis* unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Zellzählungen des *T. vaginalis* Stammes T1 und FMV1 unter aeroben (16% O₂) und anaeroben Bedingungen wurden mit dem Bio-Rad *Automated Cell Counter* TC20™ (#145-0102) und den zugehörigen *Counting Slides* (Bio-Rad, #145-0015) nach Anleitung durchgeführt. Dabei wurde auf eine Trypanblau-Färbung zur Determinierung von lebenden und toten Zellen verzichtet.

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden Zellen der beiden *T. vaginalis* Wildtyp-Stämme T1 und FMV1 unter aeroben und anaeroben Bedingungen gezählt. 12 ml TYM Medium wurden mit 2×10^6 Zellen inokuliert und entweder im Zentrifugenröhrchen (15 ml) bei 37 °C oder in einer Zellkulturflasche mit Membranverschluss (25 cm²) bei 5% CO₂ (entspricht 16% O₂) und 37 °C inkubiert. Alle zwei Stunden wurde der Probe ein Aliquot zügig unter sterilen Bedingungen entnommen, um die Probe erneut unter optimalen Bedingungen zu inkubieren. Das Aliquot diente der Messung am Zellzähler.

4.9.1.4 Transfektion von *T. vaginalis*

Die Transfektion aller *T. vaginalis* Stämme erfolgte stets mittels Elektroporation (Delgadillo et al. 1997; Land et al. 2004). Hierzu wurden etwa $2,5 \times 10^8$ Zellen des Wildtyps in frischem TYM Medium mit 30 µg Plasmid-DNA des Konstrukts in einer 0,4 cm Elektroporationsküvette (Bio-Rad, #165-2081) gemischt. Zuvor wurde die Zellsuspension viermal durch eine 23G-Nadel durchgezogen, um Zell-Akkumulationen zu lösen und die Zellmembran anzurauen. Die Küvette wurde in die Schockkammer des Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad, #165-2660) gesetzt und der elektrische Puls erfolgte bei 350 V und 960 µFd. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 12 ml frisches, warmes TYM Medium überführt und bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h erfolgte die Zugabe der Selektionsdroge G418 (100 µg/ml) zu der Kultur. Nach 48 h wurde die Kultur in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1.000×g, 10 min bei RT pelletiert und in frischem TYM Medium, versetzt mit Penicillin/Streptomycin und G418, resuspendiert. Der Transfektionserfolg wurde durch eine Western Blot Analyse überprüft (s. Kap. 4.10.2.3).

4.9.2 Humane, vaginale Epithelzellen

Die Zelllinie MS-74 der humanen, immortalisierten, vaginalen Epithelzellen wurde freundlicherweise von J. Alderete (School of Molecular Biosciences, Pullman, USA) zur Verfügung gestellt und wurden im Jahr 2002 isoliert (Klumpp et al. 2002). Die Kultivierung erfolgte in 45% DMEM (Invitrogen, #31885), 45% Keratinocyte-SFM (Invitrogen, #37010022) und 10% fötalem Kälberserum (FCS) in Zellkulturflaschen mit Membranverschluss (75 cm²) bei 37 °C und 5% CO₂. Zum Schutz vor bakterieller Kontamination wurde zusätzlich ein Penicillin/Streptomycin Gemisch zu dem Medium hinzugefügt [1% (v/v)]. Bei hoher Konfluenz wurde der Zellrasen zweimal mit PBS (PAA, #H15-001) gewaschen und anschließend mit einer 0,05% Trypsin-Lösung (Invitrogen, #25300-054) bei 37 °C für 10 min inkubiert, um die Zelladhärenz zu lösen. Die Reaktion wurde mittels FCS terminiert und die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Pelletieren (600×g, 6 min, RT) wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und je nach Versuch 1:10 in eine neue Zellkulturflasche inklusive Medium gesplittet.

4.9.3 *Escherichia coli*

Für Standard-Klonierungsarbeiten (Sambrook et al. 1989) wurde der *E. coli* Stamm XL1-blue der Firma Stratagene genutzt [$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac } *F' \text{ proAB lacIqZ_M15 Tn10 (TetI)}$]. Die heterologe Überexpression von TvFIM1 erfolgte im *E. coli* Stamm C41 [$F\text{-ompT hsdS}_B \text{ (TB- MB-)} gal dcm \text{ (DE3)}$], abgeleitet von BL21(DE3) (Miroux und Walker 1996).

4.10 Molekularbiologische Methoden

4.10.1 Nukleinsäuren

4.10.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *T. vaginalis*

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *T. vaginalis* wurde das organische Reagenz DNazol[®] (Invitrogen, #10503-027) genutzt. Diese Guanidin-basierte Lösung ermöglicht die selektive Präzipitation von DNA aus Zell-Lysaten. Dafür wurden 50 ml einer *T. vaginalis*

Kultur mit einer Konzentration von etwa 3×10^6 Zellen/ml bei $1.500 \times g$ und $4^\circ C$ für 10 min pelletiert. Nach Verwerfen des Überstands erfolgte die Isolierung nach Herstellerprotokoll. Die genomische DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0 und 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und die Konzentration anschließend mittels des Fluorometers Qubit® (Invitrogen, #Q32866) und dem Kit Qubit® dsDNA BR Assay (Invitrogen, #Q32853) nach Herstellerprotokoll bestimmt.

4.10.1.2 Amplifizierung von DNA via Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen mittels Sequenz-spezifischen Oligonukleotiden und einer DNA-Polymerase (Mullis et al. 1992). Für die Amplifizierung von Sequenzen, die zur weiteren Klonierung verwendet wurden (s. Kap. 4.10.1.3), kam eine Polymerase mit Korrekturlese-Funktion (*proof reading*, Phusion® Polymerase) zum Einsatz, während für Test-PCRs die *Taq*-Polymerase genutzt wurde. Die Reaktionsansätze und der Verlauf im PCR-Thermocycler wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Anschließend wurde jedem Ansatz 1/10 Vol. 10× Ladepuffer hinzugefügt (10× Ladepuffer: 0,4% (w/v) Bromphenolblau; 0,4% (w/v) Xylencyanol; 1 mM EDTA, pH 8,0; 20% (v/v) Ficoll) und in einem 1%igem Agarose-Gel mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch getrennt (50× TAE Puffer: 2 M Tris; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA, pH 8,0) (Sambrook et al. 1989). Anschließend wurde das Gel in einem Transluminator unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

4.10.1.3 Herstellung von Expressionsvektoren

Zur Herstellung von Expressionsvektoren (Konstrukten) wurde die zu untersuchende Gensequenz mittels PCR amplifiziert. Nach elektrophoretischer Trennung wurde das Amplifikat nach Herstellerangaben aus dem Agarose-Gel eluiert (s. Kap. 4.7). Es folgte die Ligation des Amplifikats mit dem Zwischenvektor pJET1.2 (s. Kap 4.7, CloneJET™ PCR Cloning Kit) zur erneuten Amplifizierung der Sequenz. Ultra-kompetente *E. coli* XL1-blue Zellen wurden mit 5 µl des Ligationsansatzes transformiert und für 20 min inkubiert ($4^\circ C$). Ein Aliquot der Zellen wurde anschließend auf einer LB-Agar-Platte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen. Die Platte wurde bei $37^\circ C$ über Nacht inkubiert. Durch die

erlangte Resistenz gegenüber Ampicillin konnten erfolgreich transformierte *E. coli* Zellen auf dieser Platte wachsen. Bakterienkolonien wurden in 5 ml LB Medium (1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt), versetzt mit Ampicillin (100 µg/ml), überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Es folgte die Isolierung der Plasmide aus *E. coli* mittels NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) basierend auf der alkalischen Lyse. Die inserierte Sequenz in den Plasmiden wurde mit spezifischen Oligonukleotiden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) sequenziert und anschließend auf Richtigkeit überprüft. Danach folgte die Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen und die Ligation (s. Kap. 4.3) nach Herstellerangaben in die Expressionsvektoren pTagvag2, pTv_HA oder pTv_GFP.

4.10.1.4 Isolierung von RNA aus *T. vaginalis*

Für die Isolierung von RNA wurde unter RNase-freien Bedingungen gearbeitet. Etwa 5×10^7 *T. vaginalis* Zellen wurden für 10 min bei $1.500 \times g$ und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl TRIzol® (Invitrogen) resuspendiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerprotokoll. Die RNA wurde schließlich in 150 µl DEPC-H₂O (0,01% (v/v) DEPC) resuspendiert und die Konzentration mittels dem Fluorometer Qubit® (Invitrogen, #Q32866) und dem Kit Qubit® RNA BR Assay (Invitrogen, #Q10210) bestimmt.

4.10.1.5 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird RNA in DNA durch das Enzym Reverse Transkriptase umgeschrieben und somit zur cDNA (*complementary* DNA). Die Umschreibung von mRNA (*messenger* RNA) in cDNA stellt somit transkribierte Gene dar und kann aufzeigen, ob und wie stark ein Gen in der Zelle transkribiert wird. Zuvor muss sichergestellt werden, dass die RNA restlos von DNA befreit ist, um Artefakte zu unterbinden. Dazu wurden 10 µg Gesamt-RNA aus *T. vaginalis* mit DNase I (Fermentas) nach Herstellerprotokoll behandelt. Es erfolgte eine erneute Konzentrationsbestimmung mit Qubit®, um anschließend 1 µg DNase-behandelte RNA in cDNA mittels dem iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) nach Herstellerangaben umzuschreiben. Für eine RT-PCR wurde als Negativkontrolle zusätzlich ein Ansatz ohne Zugabe der Reversen Transkriptase vorbereitet.

4.10.1.6 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird eine qualitative Analyse der Transkription von Genen durchgeführt. Diese zeigt auf, ob Transkripte eines Gens in der Zelle vorliegen oder nicht. Hierzu wurde 1 µl cDNA als Matrize in einer Test-PCR (s. Kap. 4.10.1.2) eingesetzt.

4.10.1.7 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient der quantitativen Analyse von transkribierten Genen in der Zelle. Durch die Akkumulation eines Fluorophors (SYBR® Green) in synthetisierten DNA-Strängen kann der Zyklus einer PCR bestimmt werden, bei der das Gen exponentiell vervielfältigt wird (= Ct, *threshold cycle*). Die Detektion der Transkripte erfolgt über spezifische Oligonukleotide, die ein ca. 100 bis 200 bp langes Fragment in der Gensequenz amplifizieren (s. Kap. 4.6). Die eigentliche Quantifizierung erfolgt durch die Erstellung einer Eichgerade. Eine Verdünnungsreihe von genomischer DNA mit bekannter Konzentration dient als Matrize der Reaktionsansätze mit den spezifischen Oligonukleotiden. Die ermittelten Ct-Werte können somit zu DNA-Mengen in Bezug gesetzt werden. Da die Anzahl der Homologe des Gens im Organismus und die Sequenzlänge bekannt sind, ist die Errechnung der Transkriptmenge in einer bestimmten Menge RNA, bzw. cDNA möglich (Bustin et al. 2009; Livak und Schmittgen 2001; Lu et al. 2012; Pfaffl et al. 2002).

Sämtliche Experimente wurden mit dem Gerät StepOnePlus™ und dem Kit „Power SYBR® Green Master Mix“, welches die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase beinhaltet, der Firma Applied Biosystems durchgeführt. RNA wurde in biologischen Triplikaten aus *T. vaginalis* im frei-schwimmenden und amöboiden Stadium isoliert. Die Versuchsansätze wurden in technischen Triplikaten durchgeführt, bei denen 1 µl der korrespondierenden cDNA eingesetzt wurde.

4.10.2 Proteine

4.10.2.1 Isolierung von Proteinen aus *T. vaginalis*

Um ein Gesamtzellextrakt von *T. vaginalis* zu erhalten, wurden ca. 5×10^7 Zellen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, pelletiert (1.500×g, 5 min, 4 °C) und in nativem Lysispuffer (150 mM NaCl; 1% (v/v) Triton™ X-100; 50 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert. Bei einer

Ultraschallbehandlung auf Eis für 6×10 sec wurden die Zellen aufgeschlossen und das Cytosol freigesetzt. Es erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit Qubit® und dem QuantiT™ Protein Assay Kit (Invitrogen, #Q33210) nach Herstellerangaben.

4.10.2.2 Elektrophoretische Trennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen wurden diese in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in 12%igen Trenngelen separiert (Laemmli et al. 1970; Sambrook et al. 1989). Zuvor wurden die Proteinproben in Laemmli-Puffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA; 1% (w/v) SDS; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 10% (v/v) Glycerin; 0,05% (w/v) Bromphenolblau) 10 min bei 95 °C denaturiert. Es wurde stets ein Standard als Referenz des Molekulargewichts der Proteine auf das Gel geladen (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, #26619) oder Precision Plus Protein WesternC Standard (Bio-Rad, #161-0385)).

Zur Visualisierung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel wurde eine Coomassie Brilliant Blau Färbung nach (Heukeshoven und Dernick 1988) durchgeführt.

4.10.2.3 Western Blot

Bei der Western Blot Analyse werden die Proteine, welche in einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt wurden, mittels elektrischer Spannung auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C Extra, GE Healthcare) übertragen (Gershoni und Palade 1983; Towbin et al. 1979). Dazu wurden drei Lagen Whatman 3MM-Papier in Transferpuffer (39 mM Glycin; 48 mM Tris; 1,3 mM SDS; 20% (v/v) Methanol) getränkt und auf die Anode des Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems (Bio-Rad) gelegt. Es folgte die Nitrocellulosemembran, das SDS-Polyacrylamidgel und erneut drei Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman 3MM-Papier. Nach Entfernung sämtlicher Luftblasen wurde die Kathode aufgelegt und der Transfer nach Herstellerangaben gestartet. Der Erfolg des Western Transfers wurde durch die Übertragung des gefärbten Standards auf der Nitrocellulosemembran überprüft.

4.10.2.4 Immunodetektion

Zur Detektion bestimmter Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurden diese mit spezifischen Antikörpern behandelt und anschließend mittels Chemilumineszenz oder Fluoreszenz detektiert. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Western Blot in

Blockingpuffer (5% (w/v) Magermilchpulver in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl)) für 30 min geschwenkt und darauf in Blockingpuffer mit dem/den Erstantikörper/n für 1h oder ÜN inkubiert (Verdünnungen sind in den Abbildungen ersichtlich, Liste der Antikörper s. Kap. 4.4). Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS-T (0,1% (v/v) Tween 20) gewaschen, bis die Inkubation des Zweitantikörpers in Blockingpuffer für 1h erfolgte. Bei der Chemilumineszenz wurde ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper genutzt, der nach der Inkubation und erneutem dreimaligem Waschen mit TBS mit dem „SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate“ Kit (Thermo Scientific, #34077) bzw. dem „WesternBright ECL Spray“ (Advansta, #D-12049-D50) detektierbar wurde. Die Observierung erfolgte im ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad, #170-8280). Bei der Detektion eines Multiplex Western Blots wurden fluoreszierende Zweitantikörper eingesetzt (s. Kap. 4.4), bei der die Inkubation und die Waschschritte im Dunkeln durchgeführt wurden. Auch hier erfolgte die Observierung mit dem ChemiDoc™ MP System durch Anregung der Fluorophore mit spezifischen LEDs. Dadurch war die Detektion von zwei unterschiedlichen Proteinen auf einer Nitrocellulosemembran möglich.

4.10.2.5 Immunofluoreszenz-Mikroskopie

Für die Lokalisierung von spezifischen Proteinen innerhalb der Zelle können diese immunologisch behandelt werden und mittels Fluoreszenz detektiert werden. Das Prinzip beruht auf der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, so dass die Antikörper ihr entsprechendes Epitop der Peptidsequenz binden und durch den Fluorophor-gekoppelten Zweitantikörper nachweisbar sind.

Für die Fixierung wurden *T. vaginalis* Zellen allein, mit humanen, vaginalen Epithelzellen (s. Kap. 4.9.1.1) oder mit Hefezellen (s. Kap. 4.9.1.2) pelletiert und/oder von dem Überstand getrennt, gefolgt von einer Inkubation mit 4% (v/v) Paraformaldehyd und 0,1% (v/v) Triton™ X-100 in PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄) für 15 min bei RT. Die Lösung wurde abgenommen – für die Fixierung von *T. vaginalis* allein wurde stets in einem 2 ml Reaktionsgefäß gearbeitet und für nachfolgende Schritte 1 min bei 2000×g und 4 °C pelletiert – und mit Blockingpuffer (1% (w/v) BSA; 0,25% (w/v) Gelatine; 0,05% (v/v) Tween 20 in PBS) versetzt, gefolgt von einer Inkubation von 30 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen für 1h bei RT mit dem

Primärantikörper in Blockingpuffer inkubiert (s. Kap. 6.3), worauf ein dreimaliges Waschen mit PBS erfolgte. Schließlich fand die Inkubation der Zellen mit dem Fluorophor-gekoppelten Zweitantikörper im Dunkeln für 1h bei RT und erneut dreimaligem Waschen mit PBS statt. Die Zellen wurden in Fluoroshield mit DAPI (Sigma, #F6057) aufgenommen und bis zur Observierung im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Die Fluoreszenzmikroskope LSM 510, 710 (Zeiss) und Eclipse Ti-E (Nikon) wurden für die Observierung der Proben genutzt.

4.10.2.6 Lebendzellobservierung

Bei der Lebendzellobservierung wurden *T. vaginalis* Zellen während der Infektion oder alleine im Durchlicht-Kanal observiert. Bei GFP-markierten Proteinen konnte aufgrund der Eigenfluoreszenz von GFP ebenfalls eine Lebendzellobservierung durchgeführt werden. Dazu wurde die transfizierte *T. vaginalis* Kultur nicht unter anaeroben Bedingungen, sondern unter 5% CO₂ und 37 °C inkubiert, so dass GFP in Anwesenheit von Sauerstoff seine aktive Form bilden kann (s. Kap. 4.9.1.1). Die Observierung erfolgte unter gleichen Bedingungen (37 °C und 5% CO₂) am Mikroskop AxioObserver.Z1 (Zeiss).

4.10.2.7 Immunopräzipitation (Affinitätschromatographie)

Bei der Immunopräzipitation werden spezifische Proteine mittels Antikörper und Affinitätschromatographie isoliert, welche im Idealfall an deren Interaktionspartner gekoppelt sind. Diese Interaktionspartner werden zusammen mit dem eigentlichen Protein isoliert und können in einer SDS-PAGE (s. Kap. 4.10.2.2) identifiziert werden. Für diese Experimente wurden die Produkte der µMACS™ Serie (Miltenyi Biotec) genutzt. Das Prinzip basiert auf magnetischen Kügelchen (*beads*), die mit Liganden gekoppelt sind, die wiederum an das Protein von Interesse binden. Zuerst erfolgt die Zellyse, die in diesem Experiment entscheidend ist. Die Lyse der Zelle sollte vollständig, jedoch weitestgehend schonend durchgeführt werden, um mögliche Interaktionen von Proteinen nicht zu stören. Für diese Experimente wurden die Zellen vor der Lyse für 10 min mit 200 ng/ml Phalloidin (AppliChem, #A1488) inkubiert, um Aktinfilamente zu stabilisieren.

Es wurden zwei Ansätze der Zellyse getestet, welche beide auf mechanische Kräfte verzichten, sondern lediglich eine chemische Lyse bewirken. Der Standard-Lysispuffer (150 mM NaCl; 1% (v/v) Triton™ X-100; 50 mM Tris-HCl pH 8,0) und ein Lysispuffer,

welcher bereits zur Extraktion von Cytoskelett-Proteinen aus *Giardia lamblia* erfolgreich genutzt wurde (200 mM KCl; 10 mM Tris; 2 mM DTT; 2 mM EDTA; 1 mM ATP; 2 mM MgSO₄; 1,5% (v/v) Triton™ X-100; 1× Complete Mini Protease Inhibitor Tablette)(Palm et al. 2005). Nach einer Inkubation von 3 h im 360°-Rotator bei 4 °C wird die Suspension bei 10.000×g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert um Zelltrümmer von der Suspension zu separieren. Anschließend erfolgt die Inkubation der magnetischen Kügelchen im Proteinextrakt ÜN rotierend bei 4 °C, so dass die Bindung an die Zielproteine maximiert wird. Darauf folgt die Affinitätschromatographie bei der die Suspension sukzessive über eine Säule (Miltenyi Biotec, #130-042-701), die unter einem magnetischen Feld steht, überführt wird. Die Kügelchen mit dem Proteinkomplex verbleiben in der Säule, werden gewaschen und schließlich mit 95 °C heißem Laemmli-Puffer eluiert. Die magnetischen Kügelchen verbleiben in der Säule, so dass lediglich der Proteinkomplex eluiert und in einer SDS-PAGE analysiert wird.

Im ersten Ansatz wurden Protein G *beads* (Miltenyi Biotec, #130-071-101) genutzt, welche eine hohe Affinität zu α -Aktin aus Maus (Sigma, #A4700) aufweisen. Diese beiden Komponenten (50 μ l Protein G *beads* und 10 μ g α -Aktin) wurden zuvor gemischt und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Erst dann erfolgte die Zugabe des Komplexes zu dem Proteinextrakt. Die folgenden Schritte erfolgten nach Herstellerangaben.

Im zweiten Ansatz wurde das Proteinextrakt von transfizierten *T. vaginalis* Kulturen zusammen mit dem „ μ MACS™ HA tagged Protein Isolation“ Kit (Miltenyi Biotec, #130-091-122) verwendet. Hier binden die magnetischen Kügelchen direkt an den HA-Tag des Fusionsproteins. Die weiteren Schritte erfolgten ebenfalls nach Herstellerprotokoll. Neben dem Eluat wurden der Durchfluss des Gesamtextrakts und die Waschschrte aufgefangen, mit Laemmli-Puffer versehen und ebenfalls auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen.

4.10.2.8 Heterologe Überexpression von TvFIM1

Für die heterologe Überexpression von TvFIM1 wurde der *E. coli* Stamm C41(DE3) mit dem Vektor pETEV21a und der codierenden Sequenz für TvFim1 transformiert (s. Kap. 4.10.1.3). Ungefähr ein Liter Kultur wurde auf einem Schüttler bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,4 bis 0,6 bei 600 nm inkubiert. Die Überexpression wurde mit

1 mM IPTG induziert gefolgt von einer Inkubation für 4 h bei 37 °C im Schüttler. Die Zellen wurden anschließend pelletiert und mit PBS (s. Kap. 4.10.2.5) gewaschen. Die Zellyse erfolgte durch Homogenisieren durch das Potter-Elvehjem Verfahren und nachfolgendem Aufschluss mittels „OneShot Disruptor“ (Constant Systems Limited). Die His-getaggten Proteine wurden mit einer HisTrap™ Säule (HisTrap™ HP 5 ml, GE Healthcare) über Flüssigkeitschromatographie (FPLC) mit Hilfe einer Äkta P-920 (GE Healthcare) isoliert (s. Abb. 7.1). Der Elutionspuffer bestand aus 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol und 1 mM NaN₃.

4.10.2.9 Messung der Fluoreszenzpolarisations-Anisotropie von Proteinen

Die Messung der Fluoreszenzpolarisations-Anisotropie wurde unter Anleitung von M. Quinlan (University of California, Los Angeles, USA) in der *Summer School on Actin Dynamics* in Regensburg 2011 (DFG Programm SPP 1464) durchgeführt. Das Prinzip basiert auf der Korrelation zwischen der Anregung und Abstrahlung der Fluoreszenzpolarisierung. Die Anisotropie ist maximal, wenn ein Fluorophor in einem Raum fixiert ist. Wenn das Fluorophor rotiert, wird die Anisotropie verringert und ist abhängig von der Rotationsgeschwindigkeit. Ein wichtiger Aspekt dabei ist auch die Bestimmung des Molekülvolumens. Die Interaktion bzw. Bindung von zwei Molekülen ist dadurch detektierbar und soll in diesem Experiment Aufschluss über die Interaktion von Aktin aus *Acanthamoeba* und TvFIM1 geben (Pollard 2010; Vinson et al. 1998).

In diesem Versuch wurden 10 nM Oregon Green®-markierte Aktin-Monomere in Reaktionspuffer (50 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 10 mM HEPES pH 7,0) in An- und Abwesenheit von 10 μM TvFIM1 in dem Spektralfluorimeter FluoroMax®-4 (HORIBA Jobin Yvon GmbH, Bensheim) gemessen (Anregung: 488 nm, Abstrahlung: 519 nm). Durch die Zugabe von 10 nM Latrunculin B wurde eine spontane Aktin-Polymerisierung unterbunden, so dass lediglich Komplexe aus Aktin und TvFIM1 gebildet werden konnten (Spector et al. 1989).

4.10.2.10 Aktin-Polymerisierungsuntersuchung

Die Untersuchungen der Aktin-Polymerisierung wurden in der *Summer School on Actin Dynamics* in Regensburg 2011 (DFG Programm SPP 1464) durchgeführt.

Die interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF) wurde unter Anleitung von L. Blanchoin (Institute of Life Sciences Research and Technologies, Grenoble, Frankreich) durchgeführt. Als Kontrolle dienten 1,5 mM Aktin aus Kaninchen Muskeln (7% der Monomere markiert mit Alexa 568) und Observierungen in Anwesenheit von 3 und 5 mM TvFIM1 in dem für die FPLC genutzten Elutionspuffer (s. Kap. 4.10.2.8). Die Proteingemische wurden in frisch angesetzttem Fluoreszenzpuffer (10 mM Imidazol-HCl pH 7,8; 50 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 100 mM Dithiothreitol; 3 mg/ml Glukose; 20 mg/ml Catalase; 100 mg/ml Glucose-Oxidase und 0,5% (w/v) Methylzellulose) verdünnt, um die Aktin-Polymerisierung zu induzieren.

Die Aktin-Polymerisierung wurde in einer fluorometrischen Messung über Zeit unter Anleitung von H. Higgs (Dartmouth Medical School, Hanover, USA) durchgeführt. In diesem Experiment wurde die Aktin-Polymerisierung in dem Platten-Lesegerät (*microplate reader*) Infinite[®] 200 PRO (Tecan Group, Ltd.) und einer Mikrotiterplatte (Nunclon[®] 96 *flat black well plate*) beobachtet. Ein Aktin-Monomer (G-Aktin) Gemisch [4 mM *Acanthamoeba* Aktin bzw. Aktin aus Kaninchen Muskel; 5% (v/v) Pyren-markiertes Aktin in G-Puffer (2 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 mM DTT; 0,2 mM ATP; 0,1 mM CaCl₂; 0,01% (w/v) NaN₃)] wurde allein und in Anwesenheit von 4 mM TvFIM1 mit folgenden Parametern über Zeit gemessen: Anregung = 365 nm, Abstrahlung = 410 nm, Z-Position = 17.000, Verstärkung = 135, Messung alle 3 sec für 30 min.

4.11 Bioinformatische Methoden

Die Sequenzen sämtlicher untersuchter Gene in dieser Arbeit wurden der Datenbank TrichDB (www.trichdb.org) entnommen (Aurrecochea et al. 2009). Die Analyse von Sequenzidentitäten wurde mit BLAST (Altschul et al. 1990; Altschul et al. 1997) oder Clustal Omega (Sievers et al. 2011) durchgeführt. Weitere Sequenzanalysen wurden im Programm Sequencher 5.1 (Gene Codes) erstellt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit ImageJ 1.49a (Collins 2007), Photoshop Elements 10 (Adobe) und Illustrator CS4 (Adobe).

Für die *Heatmap* wurde eine Liste von 77 Aktin- und Tubulin-assoziierten Genen – hauptsächlich von *Homo sapiens* – erstellt (s. Tab. 7.1). Diese Ausgabesequenzen wurden mit kompletten Genomen von 25 Eukaryoten verglichen, welche die unterschiedlichen

Phyla des eukaryotischen Reichs repräsentieren (s. Tab. 7.2). Die Proteome wurden aus RefSeq bezogen (Pruitt et al. 2007), außer für *Bigeloviella natans* (<http://genome.jgi-psf.org/Bigna1/>), *Cyanidioschyzon merolae* (Matsuzaki et al. 2004) und *Cyanophora paradoxa* (Price et al. 2012), welche stattdessen den entsprechenden Quellen entnommen wurden. Für fünf Spezies, dessen Genome noch nicht vollständig sequenziert wurden, wurden *expressed sequence tags* (ESTs) aus dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>) verwendet (s. Tab. 7.2)(Boguski et al. 1993). Die Gruppen von homologen Proteinen wurden aus einer Gesamtanzahl von 453.696 Sequenzen rekonstruiert. Eine BLAST-Suche ergab 1.497 beste BLAST-Treffer. Alle Proteingruppen wurden mittels Needleman-Wunsch-Algorithmus und dem Needle Programm (Rice et al. 2000) in einem globalen Alignment zusammengefasst. Von den sich ergebenden 12.758 Proteingruppen wurden mittels MCL-Algorithmus mit Standardeinstellungen (Enright et al. 2002) solche Gruppen zu einer Proteinfamilie zusammengefasst, die eine Aminosäureidentität über 20% aufwies. Die Sequenzen der Ausgangsproteine innerhalb der Gruppen wurden anschließend mit den ESTs von *Alexandrium tamarense*, *Oxyrrhis marina*, *Porphyra yezoensis*, *Reclinomonas americana* und *Physarum polycephalum* mittels BLAST verglichen. Passende ESTs wurden zu Aminosäuresequenzen translatiert und zu den Gruppen der höchsten Ähnlichkeit hinzugefügt. Die Gruppen wurden durch Aufteilen in paraloge Gruppen, erneutes Zusammenfassen nach orthologen Gruppen, Löschen von Gruppen mit nur einem Gen und offensichtlich paralogen Sequenzen, basierend auf Annotierung und Überprüfung phylogenetischer Bäume mittels PHYML (Guindon et al. 2010), weiter verfeinert. Dieses Verfahren resultierte in 62 Proteinfamilien mit einer Gesamtanzahl von 891 Genen.

5 Ergebnisse

5.1 Die divergente Morphologie von *T. vaginalis* während der Infektion von Wirtszellen

Die Eigenschaften und der Grad der Morphogenese von *Trichomonas vaginalis* ist stamm-spezifisch und sollte in den im Labor vorhandenen Stämmen T1, T016 und FMV1 zunächst verglichen werden. Dabei nimmt der Stamm T1 eine sekundäre Rolle ein, da dieser durch die langjährige Kultivierung im Labor seine Fähigkeit zur amöboiden Umwandlung verloren hat (Lustig et al. 2013). Er wurde erstmalig im Jahr 1993 in Taiwan isoliert (Tai et al. 1993) und zeigte im Rahmen dieser Arbeit bei der Infektion von humanen, vaginalen Epithelzellen über 24 Stunden keine Umwandlung. Dabei wurde das Wachstum der Vaginalzellen nicht beeinträchtigt und sie wiesen keine Schäden auf (Daten nicht gezeigt). Bei der Inokulation von *T. vaginalis* T1 auf eine konfluente Schicht an humanen, vaginalen Epithelzellen wurde der Parasit mikroskopisch observiert (s. Abb. 5.1). Auch nach 20 min der Infektion waren sämtliche Zellen frei-schwimmend und ovoid. Sie zeigten eine rasche, schwimmende Bewegung und wiesen keine gerichtete Bewegung zu den Vaginalzellen auf. Ferner ist zu erkennen, dass Parasit und Wirtszellen nicht auf einer Fokusebene sind, da die beiden Parasiten neben der deutlichen Kontur der Vaginalzelle unscharf erscheinen (Abb. 5.1, T1).

Bei *T. vaginalis* T016 wurde nach einer kurzen, stationären Phase der Adaption eine gerichtete, tastende Bewegung zu den Vaginalzellen observiert (Abb. 5.1, T016). Eine amöboide Umwandlung wurde lediglich von ca. 60% der Individuen vollzogen, welche zusätzlich nicht vollständig war, da noch ovoide Formen vorhanden waren. Eine solche Zelle mit Ausbildung von Pseudopodien 20 min nach Inokulation ist als Schatten über der mittigen Vaginalzelle zu erkennen (Abb. 5.1, T016 bei $t = 117''$ und $144''$). Die posteriore Seite, sichtbar als adhären-planare Fläche, wird bei $t = 0''$ und $24''$ hinterhergezogen und wandert wiederum in die ovale Trichomonade ein. Die Bildreihe zeigt andere Trichomonaden, die weiterhin ovoid verbleiben und weiterschwimmen. Bei der

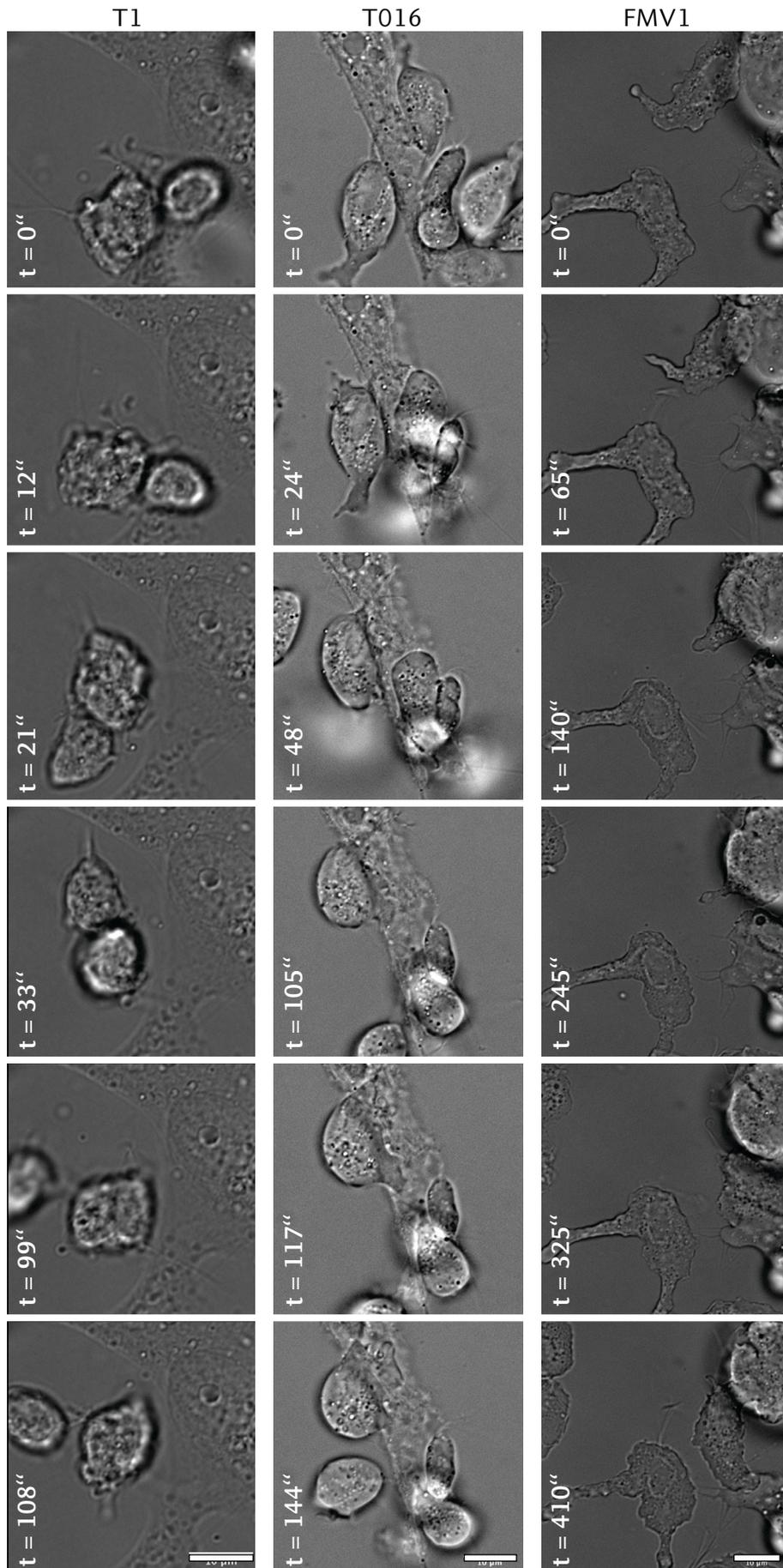


Abbildung 5.1 Lichtmikroskopische Lebendzell-Aufnahmen von *T. vaginalis* FMV1, T016 und T1 während der Infektion von humanen vaginalen Epithelzellen bei 37 °C und 5% CO₂. Der Stamm FMV1 zeigt eine vollständig amöboide Gestalt mit lang ausgestreckten Pseudopodien, die über die Dauer der Aufnahme bestehen bleiben. Eine ovoide Form ist nicht erkennbar, während die Flagellen nach wie vor sichtbar sind. Der Stamm T016 zeigt über die Zeit amöboide Ansätze, wie das Ausbilden von Pseudopodien (t=0''), welche wieder eingezogen werden (t=48'') bei dem Gleiten über die Vaginalzelle. Dennoch bleibt die ovoide Form der Zelle erkennbar. Die Zellen des Stammes T1 verbleiben dagegen über die gesamte Infektion über ovoid. Eine schwimmende, schnelle Bewegung ist erkennbar. Die Fokusebene zeigt die Vaginalzelle, während die zwei *T. vaginalis* Zellen etwas unscharf erscheinen. Somit liegen die Parasiten nicht auf der gleichen Ebene, sondern darüber. Alle Aufnahmen wurden ca. 20 min nach der Inokulation der Parasiten auf die Wirtszellen. Skalierungsbalken: 10 µm.

Observierung des Stammes FMV1 unter gleichen Bedingungen ergab sich eine höchst differente Morphologie. Der Parasit wurde vollständig amöboid und verlor die pyriforme Gestalt gänzlich. Bei der unteren Trichomonade in Abb. 5.1 FMV1 ist deutlich der Flagellenapparat als einzig verbliebenes Merkmal der frei-schwimmenden Zelle zu sehen. Weit ausgestreckte Pseudopodien werden an der posterioren Seite hinterhergezogen und die Zelle vergrößert konsequent über die Bildreihe ihre adhärenzte Fläche zum Objektträger. Die Trichomonade im oberen Teil des Bildes wandert auf eine Vaginalzelle und befindet sich bei $t = 245''$ vollständig auf dieser – ebenfalls mit Ausläufern der Zelle ersichtlich. Eine weitere Struktur, die trotz der amöboiden Gestalt weiterhin beobachtbar war, ist das rigide Axostyl, welches sich durch den Zellmedian erstreckt (Bilder nicht gezeigt; in Abb. 5.1 nicht deutlich erkennbar). Bis auf Flagellen und Axostyl ist der Phänotyp des infizierenden FMV1 Stammes ein komplett anderer verglichen zum pyriformen Stadium. Die Migrationsgeschwindigkeiten wurden für T016 und FMV1 ermittelt und betragen durchschnittlich $20 \mu\text{m}/\text{min}$ für T016 und $7 \mu\text{m}/\text{min}$ für FMV1 (s. Tab. 5.1).

Tabelle 5.1 Werte zur Ermittlung der Migrationsgeschwindigkeit von *T. vaginalis* T016 und FMV1. Bildmaterial wurde mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Die Distanzen, die amöboide Zellen zurückgelegt haben, wurden ausgemessen und mit der Zeit in Bezug gesetzt – somit lassen sich $\mu\text{m}/\text{sec}$ und $\mu\text{m}/\text{min}$ errechnen.

T016	Distanz [μm]	Sekunden	$\mu\text{m} / \text{sec}$	$\mu\text{m} / \text{min}$
1	15,4	48	0,32	19,25
2	33,6	107	0,31	18,84
3	25,1	64	0,39	23,53
4	27,5	76	0,36	21,71
5	8,8	35	0,25	15,09
6	21,4	56	0,38	22,93
Durchschnitt			0,34	20,22
FMV1	Distanz [μm]	Sekunden	$\mu\text{m} / \text{sec}$	$\mu\text{m} / \text{min}$
1	8,8	205	0,04	2,58
2	19,1	210	0,09	5,46
3	20,5	165	0,12	7,45
4	25,3	110	0,23	13,80
5	11	310	0,04	2,13
6	20,4	125	0,16	9,79
Durchschnitt			0,11	6,87

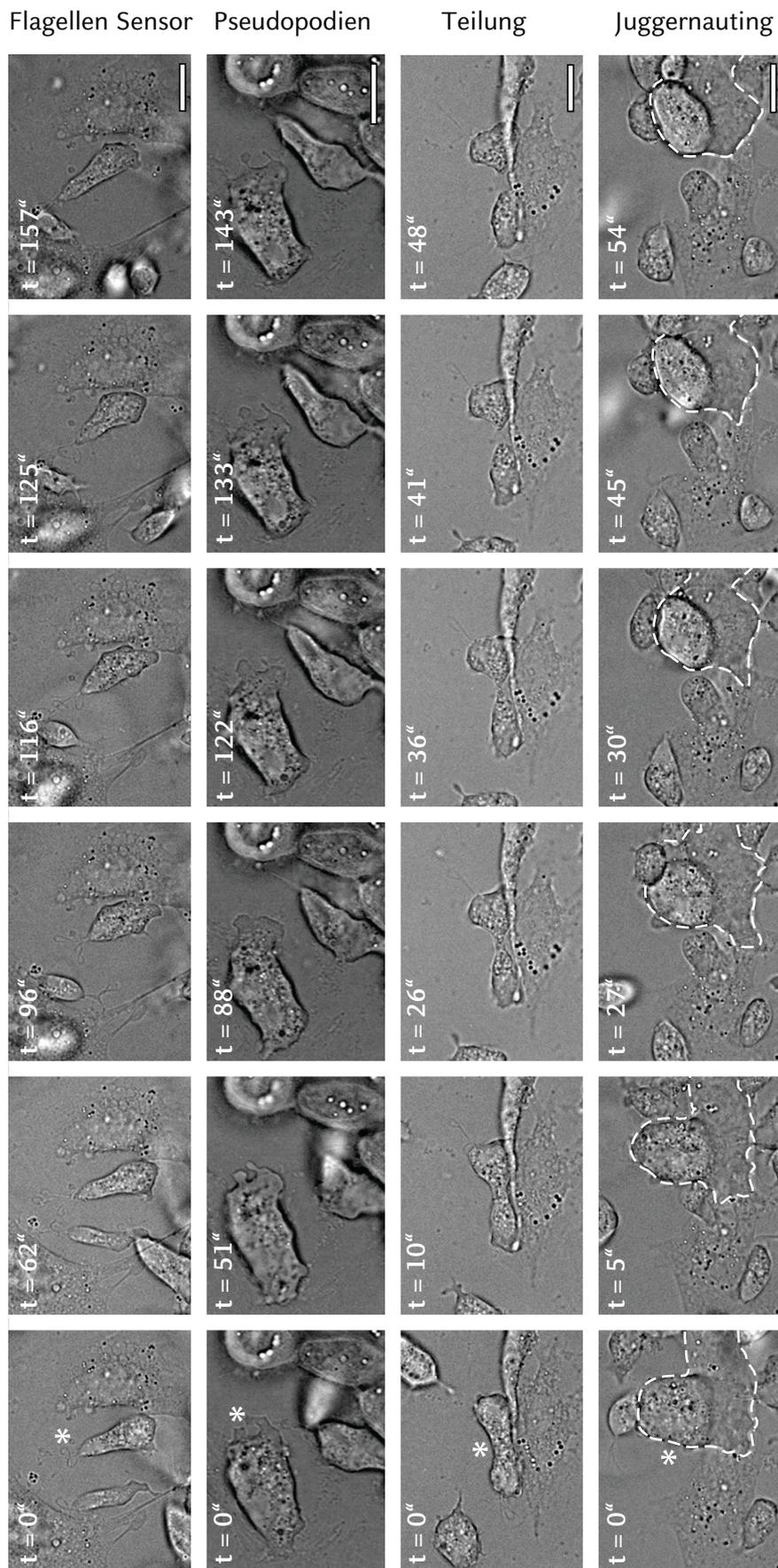


Abbildung 5.2 Lichtmikroskopische Aufnahmen von *T. vaginalis* T016 während der Infektion von Vaginalzellen. Der Parasit bewegt sich stets in anteriorer Richtung und scheint dabei seine Flagellen als eine Art Sensor zu nutzen, die die Umgebung „abtasten“ (Flagellen Sensor). Pseudopodien werden während der amöboiden Bewegung ausgebildet (Pseudopodien). Während sich *T. vaginalis* Zellen teilen (Teilung), bilden sich massiv große Zellen (Teilung), bilden sich massiv große Zellen (Teilung), welche multi-nukleär zu sein scheinen. Merkmale sind im ersten Bild der Reihe stets mit einem Stern hervorgehoben, Skalierungsbalken: 10 µm. Nach Kusdian et al. 2013.

Somit weist der Stamm T016 eine mehr als doppelt so schnelle Migrationsgeschwindigkeit auf als FMV1.

Es wurden weitere Bewegungsanalysen durchgeführt, welche die unterschiedlichen Morphologien repräsentieren. Dabei wurde erneut der Stamm T016 verwendet. Die Flagellen tasten ihre Umgebung ab und sind richtungsweisend für den Organismus (Abb. 5.2, Flagellen Sensor), während sich in der amöboiden Phase deutliche Pseudopodien ausbilden (Abb. 5.2, Pseudopodien). Der Parasit zeigt während der Infektion mitotische Eigenschaften, bei der die duplizierten Flagellenapparate in die entgegengesetzte Richtung ziehen, um die Teilung zu unterstützen (Abb. 5.2, Teilung). Ein weiteres Phänomen wurde beobachtet, bei dem eine Zelle von enormer Größe im Vergleich zu einzelnen Trichomonaden über Wirtszellen gleitet (Abb. 5.2, Juggernauting), indiziert mit einer gestrichelten Linie. Diese sind multi-nukleär unter Berücksichtigung von Abb. 7.3 (K), bei der eine DAPI-Färbung mehrere Zellkerne in einer Zelle zeigt. Wichtige Merkmale sind stets mit einem Stern im ersten Bild jeder Reihe gekennzeichnet.

5.2 Die Rolle von Aktin im Zytoskelett

Das Zytoskelett von *Trichomonas vaginalis* kann sich zwischen den zwei Phänotypen pyriform, frei-schwimmend und amöboid, adhärent rapide umformen. Dieses Merkmal ist nicht weit verbreitet innerhalb der fünf großen Gruppen der Eukaryoten: SAR (Stramenopile, Alveolaten, Rhizaria), Archaeplastida, Excavata, Amoebozoa und Opisthokonta. Einige Vertreter der Gruppen wurden ausgewählt und in einem phylogenetischen Baum in Bezug gesetzt (s. Abb. 5.3), wobei auf einen gemeinsamen Ursprung aufgrund des evolutiven Verlaufs und Abstammung der fünf Gruppen verzichtet wurde. Ob der Organismus einen frei-schwimmenden und/oder amöboiden Phänotyp aufweist, ist mit einem Symbol (Pyriform und Sternform) gekennzeichnet. Die einzigen Vertreter in dieser Auswahl, die beide Phänotypen aufweisen, sind *Plasmodium falciparum* – ein einzelliger Humanparasit, welcher Malaria auslösen kann; *Toxoplasma gondii* – ein bogenförmiger, parasitärer Protist; *Bigelowiella natans* – eine einzellige Alge; *Naegleria*

gruberi – ein nicht-pathogener Einzeller; *Trichomonas vaginalis*; *Physarum polycephalum* – ein Schleimpilz; *Homo sapiens* – gemeint sind unterschiedliche Zelltypen, wie Spermatozoen (frei-schwimmend) oder Makrophagen (amöboid) und *Nematostella vectensis* – eine Seeanemone, welche ebenfalls beide Phänotypen während ihres Lebenszyklus aufweist.

Das amöboide Gleiten gilt als hauptsächlich Aktin-gesteuert (Fukui 2002), während die frei-schwimmende Fortbewegung mit schwimm-ähnlichen Bewegungen von Flagellen oder Cilien realisiert wird und somit als Tubulin-gesteuert gilt (Mohri et al. 2012). Dies repräsentiert die *Heatmap* in Abb. 5.3, in der Gensequenzen von Aktin, Tubulin und einer Auswahl ihrer interagierenden Proteine miteinander verglichen wurden. Als Basis dienten dabei meist Sequenzen aus *Homo sapiens* als Referenz, die mittels BLAST (Altschul et al. 1990) in den entsprechenden Genomen gesucht wurden. Die Genome von fünf der dargestellten Organismen sind bisher nicht vollständig sequenziert, so dass EST-basierte Homologien aufgeführt wurden (s. Kap. 4.11). Die Felder sind absteigend von links nach rechts entsprechend ihrer prozentualen Werte sortiert (Farbcode auf der rechten Seite); die Rohsequenzen sind in Tab. 7.1 und 7.2 ersichtlich. Als Beispiel für Vertreter, die nur einen frei-schwimmenden Phänotyp aufweisen, dient *Giardia lamblia*, ein flagellierter Humanparasit verantwortlich für Giardiasis, der weitestgehend alle Tubulin und Tubulin-Interaktionspartner codierenden Gene besitzt, jedoch wenige für Aktin-assoziierte Proteine (Paredes et al. 2011). Im Gegensatz dazu fasst *Entamoeba histolytica* – ein rein amöboider Parasit, verantwortlich für Amöbiasis bei Menschen – nahezu alle codierenden Gene für Aktin und Aktin-assoziierte Proteine, während keine Homologien zu Tubulin-assoziierten Proteinen gefunden wurden (Meza et al. 2006). Der Protist *Trichomonas vaginalis* dagegen, welcher beide Phänotypen annehmen kann, birgt die wichtigsten Gene für Aktin, Tubulin und deren assoziierte Proteine. So codiert der Parasit Gene für ARP (*actin-related protein*), Profilin, Coronin, Fimbrin u. a., jedoch nicht für Myosin, die einzig bekannte Motorprotein-Klasse für Aktinfilamente. Auf der Tubulin-Seite sind neben den Untereinheiten α - und β -Tubulin, Katanin, Trypanin und zahlreichen IFT Genen (*interflagellar transport proteins*) auch Gene für Dynein-Untereinheiten, das Motorprotein bei Mikrotubuli, vorhanden. Während die assoziierten Proteine eine geringe Homologie zu denen anderer Organismen

teilen (ca. 20 – 40%), sind die Untereinheiten Aktin und Tubulin stets hoch konserviert (ca. 80%). Der Fokus lag in erster Linie auf Aktin und seinen assoziierten Proteinen, um den amöboiden Phänotypen näher zu charakterisieren. Dazu sollte Aktin quantitativ während der Morphogenese bestimmt werden.

5.2.1 Während der Infektion steigt die Menge an Aktin

Trichomonas vaginalis kann sich auf Plastik spontan zu seiner amöboiden Gestalt umwandeln (Gold und Ofek 1992), welche von der Virulenz des Stammes abhängig ist (Gold 1993). Die Gestaltveränderung ist dabei im Gegensatz zu einer induzierten Umwandlung des Parasiten mittels immobilisiertem Fibronectin oder Laminin, Glykoproteine der extrazellulären Matrix meist tierischer Zellen, eher gering (Casta e Silva



Abbildung 5.4 Immunodetektion zur Quantifizierung von Aktin im Infektionsverlauf. Trichomonaden wurden mittels Fibronectin zur amöboiden Gestalt umgewandelt. Es folgte ein Zellaufschluss nach 5, 20 und 60 min (Sternform). Nicht-amöboide Zellen fungierten als Startpunkt (Pyriform). Es wurden jeweils 20 µg Proteinextrakt aufgetragen. Erstantikörper: α-Aktin (Maus, 1:1500), Zweitantikörper: α-Maus Peroxidasegekoppelt (1:5000)

20 und 60 min) gewählt, um den Aktin-Gehalt über die Zeit zu analysieren. Der Proteingehalt wurde fluorometrisch bestimmt (Dreifachbestimmung) und 20 µg jeder Probe in einer SDS-PAGE getrennt. Der anschließende Western Blot und die Immunodetektion mit α-Aktin ergab Signale in jeder Probe, welche mit der molekularen Masse von Aktin (42 kDa) korrelieren (s. Abb. 5.4). Dabei ist deutlich, dass die Intensität der Signale über die Zeit der Infektion zunimmt.

Filho et al. 1988; Crouch und Alderete 1999). Deshalb wurde auf die Umwandlung durch Fibronectin zurückgegriffen. In diesem Versuch sollte der Aktin-Gehalt in einem Gesamtzellextrakt quantitativ mittels Immunodetektion ermittelt werden. Dazu wurden frei-schwimmende Zellen des Wildtyps FMV1 via Ultraschall aufgeschlossen, ebenso wie amöboide Zellen auf Fibronectin in einer Zellkulturflasche. Dabei wurden drei unterschiedliche Zeitpunkte der Umwandlung (5,

5.2.2 Aktin lokalisiert während der amöboiden Phase in fibrösen Strukturen

Das Gen TVAG_337240 ist mit 288.145 a.u. (*arbitrary unit*) das am stärksten exprimierte Aktin-Derivat in *Trichomonas vaginalis* (s. Tab. 3.2). Dieses Gen wurde genutzt, um das Protein mittels Markierung mit einem Di-Hämagglutinin (HA) innerhalb der Zelle zu lokalisieren (*TvAKT1::HA*, 44 kDa). Dazu kam der Expressionsvektor *pTv_HA* basierend auf *pTagvag2* (Hrdy et al. 2004) zum Einsatz, welcher das inserierte Gen unter dem Promotor der hydrogenosomalen Succinyl-CoA-Synthetase (TVAG_047890, durchschnittliche Expression: 42.645 a.u., Gould et al. 2013) exprimiert. Diesen Werten nach ist somit die eigentliche Expression des Aktin-Derivats auf 1/7 verringert.

Nach erfolgreicher Klonierung und Sequenzierung wurde der *T. vaginalis* Stamm FMV1 mit dem Konstrukt transfiziert und anschließend mit G418 selektiert. Lebensfähige Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen, um eine Immunodetektion zur Überprüfung des Transfektionserfolgs durchzuführen. Die Immunodetektion zeigt eine Bande bei ca. 44 kDa, was mit der molekularen Masse des Fusionsproteins übereinstimmt (s. Abb. 7.2A (*TvAKT1::HA*)). Anschließend wurden *TvAKT1::HA* exprimierende Zellen fixiert um die Lokalisation in Immunofluoreszenzaufnahmen des Fusionsproteins zu bestimmen. Dazu diente der Ansatz mit frei-schwimmenden Zellen und amöboiden, welche vaginale Epithelzellen infizierten. In den ersten beiden Zeilen sind frei-schwimmende Trichomonaden zu erkennen in denen *TvAKT1::HA* cytosolisch lokalisiert (s. Abb. 4.5), deutlich durch die grüne Fluoreszenz innerhalb der gesamten Zelle. Hierbei sind zusätzlich intensivere Punkte zu sehen, die sich bei der runden Zelle in der ersten Zeile (s. Abb. 5.5) überwiegend an der Zellperipherie akkumulieren. Die Flagellen der Zellen – sichtbar im Durchlicht – weisen kein *TvAKT1::HA* auf; der Zellkern ist mittels DAPI Färbung in blau angezeigt. In der zweiten Zeile (Abb. 5.5) ist die Fluoreszenz weiterhin diffus, wobei Fluoreszenzpunkte innerhalb der Zelle dennoch ersichtlich sind. Bei amöboiden Zellen zeigt die Fluoreszenz ein feineres Muster verglichen mit der von

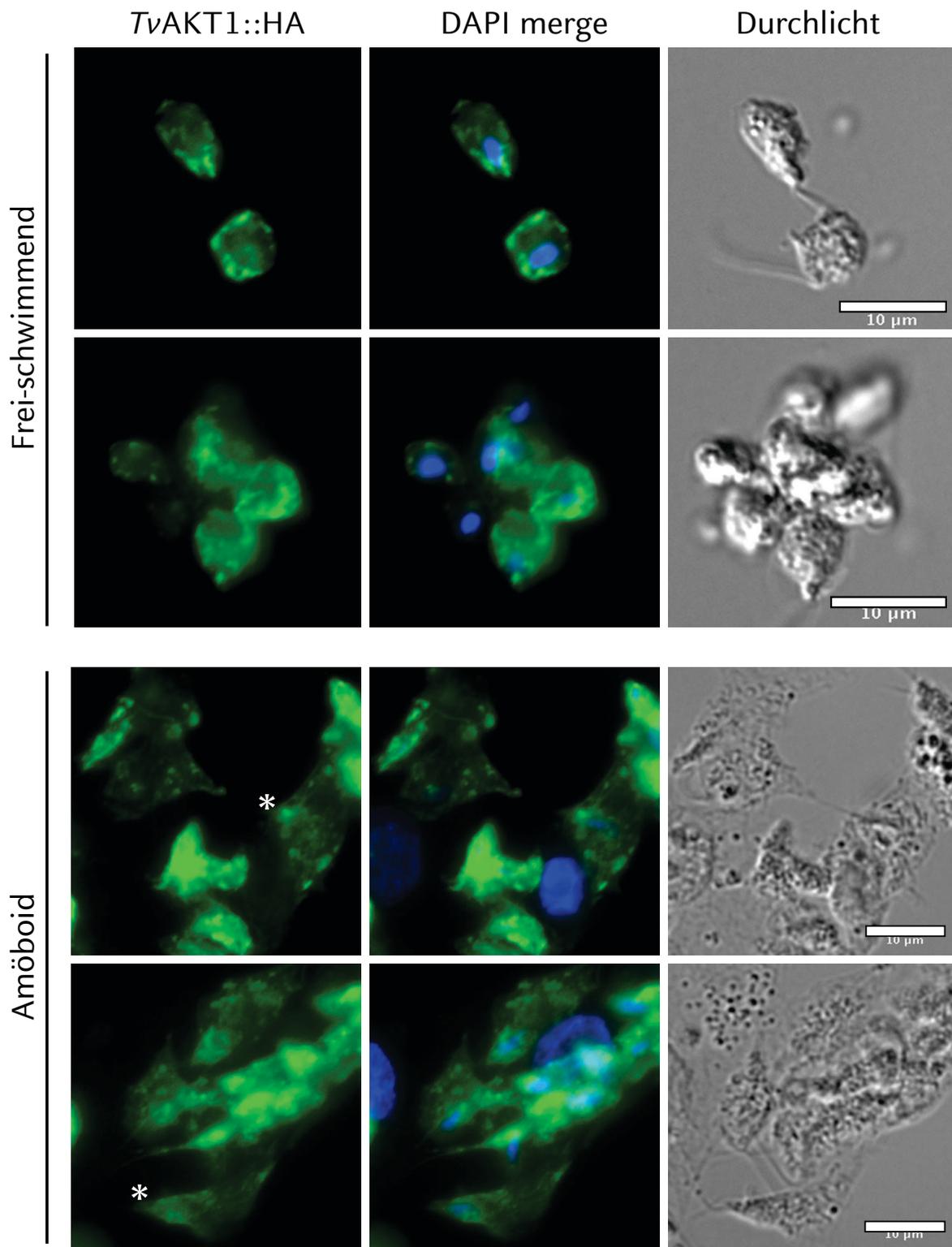


Abbildung 5.5 Immunofluoreszenzaufnahmen von TvAKT1::HA in frei-schwimmenden und amöboiden *T. vaginalis* Zellen auf humanen, vaginalen Epithelzellen. Während in frei-schwimmenden Zellen TvAKT1::HA (grüner Kanal) cytosolisch und in punktuellen Anreicherungen lokalisiert ist, ist es in amöboiden Zellen in fibrösen Strukturen zu beobachten. Diese Strukturen sind in der gesamten Zelle lokalisiert, vornehmlich jedoch an der hervorstehenden Seite in Bewegungsrichtung (s. Stern). Die erste Spalte zeigt TvAKT1::HA und zusammen mit DAPI (blauer Kanal) in der zweiten Spalte. In der dritten Spalte ist der Durchlicht-Kanal zu sehen. Erstantikörper: α -HA (1:2000), Zweitantikörper: Alexa fluor 488 α -Maus (1:5000). Skalierungsbalken: 10 μ m.

frei-schwimmenden Zellen. In der dritten und vierten Zeile (Abb. 5.5) sind ausgebreitete, abgeflachte Trichomonaden auf Vaginalzellen abgebildet. Die DAPI Färbung zeigt neben den Zellkernen der Parasiten ebenfalls die der Wirtszellen, während *TvAKT1::HA* ausschließlich in *T. vaginalis* observiert wurde. Das Protein assoziiert hier mit feinen, fadenartigen Strukturen innerhalb der Zelle. In der dritten Zeile (Abb. 5.5) sind erneut Proteinakkumulationen in Form von Punkten sichtbar, die sich in der Nähe der Plasmamembran befinden. Vornehmlich ist *TvAKT1::HA* in einem fadenartigen Netzwerk lokalisiert, welches sich beispielsweise in der vierten Zeile (Abb. 5.5) mehr am apikalen Ende der unteren Zelle konzentriert (s. Stern), was an den Flagellen im Durchlichtkanal ersichtlich ist. Die Flagellen sind erneut nicht fluoreszierend. Während die fibröse Struktur in der rechten Zelle der dritten Zeile und der unteren Zelle der vierten Zeile eine eher geordnete, parallele Orientierung aufweist, ist sie in den anderen Zellen ungeordnet verteilt und zeigt mehr Punktakkumulationen als Fäden. Somit stellt die Lokalisation von *TvAKT1::HA* in amöboiden *T. vaginalis* Zellen einen Kontrast zu der Lokalisation in frei-schwimmenden Zellen dar.

5.2.3 Interaktionspartner von Aktin

Für die Identifizierung von Interaktionspartnern von Aktin wurde eine Reinigung des Proteins über Affinitätschromatographie mit unterschiedlichen Parametern durchgeführt. Das Prinzip basiert auf der biochemischen Isolierung eines Proteins *in vitro* mittels immunologischer Affinität zu dem Zielmolekül (s. Kap. 4.10.2.7). Die dabei isolierten Proteine können ggf. auf eine Protein-Protein-Interaktion hinweisen. In diesem Fall galt es, putative Interaktionspartner von F-Aktin (filamentöses Aktin) zu identifizieren, weshalb die Chemikalie Phalloidin eingesetzt wurde. Phalloidin ist ein Cyclopeptid aus *Amanita phalloides* und bindet spezifisch und irreversibel an F-Aktin, um dieses zu stabilisieren. Phalloidin-gebundene Aktinfilamente sind an der Depolymerisierung gehindert (Dancker et al. 1975). Die *T. vaginalis* Kultur wurde stets mit Phalloidin inkubiert, gefolgt von einem Zellaufschluss mit unterschiedlichen Lysispuffern. Im ersten Ansatz wurde die

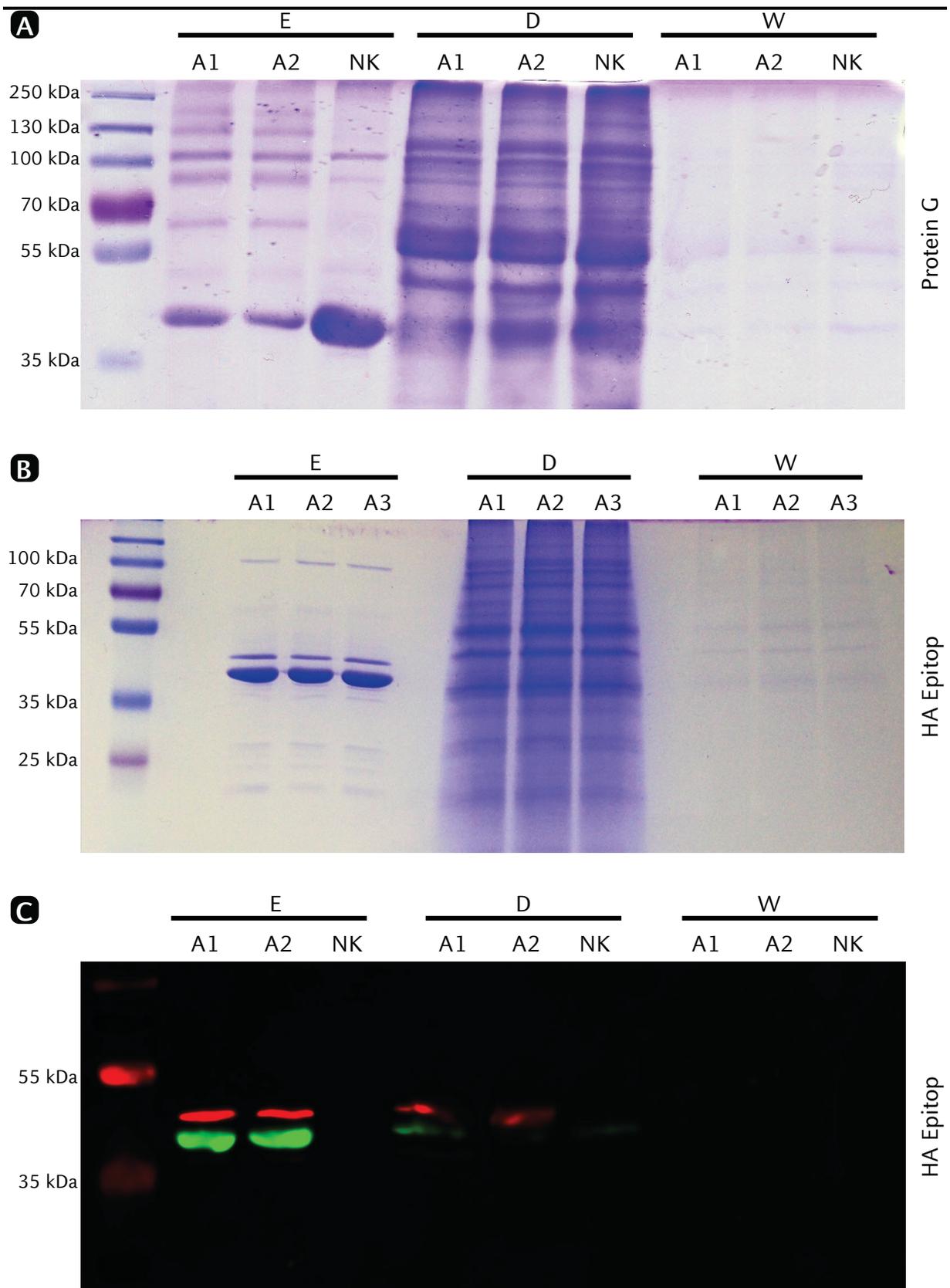


Abbildung 5.6 SDS-PAGE und Immunodetektion der Affinitätschromatographie (AC) von Aktin aus *Trichomonas vaginalis*. E = Eluat, D = Durchfluss, W = Waschschrift, NK = Negativkontrolle. A) Coomassie-gefärbtes 12% SDS-Gel mit Proben aus einer Protein G AC und α -Aktin. A1 = Ansatz mit Standard-Lysispuffer (SL), A2 = Ansatz mit Lysispuffer nach (Palm et al. 2005) (PL). NK = Ansatz ohne α -Aktin. B) Coomassie-gefärbtes 12% SDS-Gel mit Proben aus einer HA Epitop AC von TvAKT1::HA. A1-A3 sind identische Ansätze mit PL. C) Multiplex Fluoreszenz Western Blot mit Proben aus einer HA Epitop AC von TvAKT1::HA. A1=SL, A2=PL, NK=TvCEN1::HA Kultur. Erstantikörper: α -HA Kaninchen (rot) und α -Aktin Maus (grün) (jeweils 1:5000). Zweitantikörper: Alexa fluor 488 α -Maus und Alexa fluor 680 α -Kaninchen (jeweils 1:5000, s. Text für nähere Informationen).

Affinitätschromatographie mit der Affinität von Protein G zu Immunglobulinen diverser Säugetiere, unter anderem Mäusen (in denen α -Aktin synthetisiert wurde), durchgeführt (s. Abb. 5.6A). Es wurde in drei Ansätzen mit einem Standard-Lysispuffer (A1, s. Kap. 4.10.2.7), einem speziell für Zytoskelettproteine geeignetem Lysispuffer nach (Palm et al. 2005) (A2) und einer Negativkontrolle (NK), bei der kein α -Aktin eingesetzt wurde, überprüft, ob Interaktionspartner mit-isoliert werden. Der Durchfluss (D) der Proben und die Waschschrte (W) neben dem Eluat (E) wurden in einem 12% SDS-Gel getrennt, das anschließend mit Coomassie gefärbt wurde. Für den Durchfluss und die Waschschrte sind zwischen A1, A2 und NK keine signifikanten Unterschiede zu sehen, ebenso wie in den Eluaten zwischen A1 und A2. Die Negativkontrolle des Eluats (NK, E) zeigt eine prominente Bande bei ca. 40 kDa und zwei schwache unterhalb und in der Höhe von 100 kDa. Diese drei Banden sind ebenfalls in A1 und A2 zu sehen, wobei die 40 kDa Bande weniger distinkt ist als die in der NK. Zusätzlich weisen die Spuren von A1 und A2 weitere Banden bei ca. 200, 130 und 65 kDa auf, die bei der NK nicht erscheinen.

Um eine spezifischere Isolierung von Aktin zu erhalten, wurde als zweiter Ansatz eine Affinitätschromatographie über ein Hämagglutinin (HA) Epitop durchgeführt (s. Abb. 5.6B). In diesem Fall wurde die *Tv*AKT1::HA exprimierende *T. vaginalis* FMV1 Kultur in drei identischen Ansätzen mit dem Lysispuffer nach (Palm et al. 2005) aufgeschlossen und für die Affinitätschromatographie genutzt, um die Ausbeute an putativen Interaktionspartnern zu maximieren. Die Proben – aufgeteilt in Eluat (E), Durchfluss (D) und Waschschrte (W) – wurden in einem 12% SDS-Gel getrennt und dieser einer Coomassie-Färbung unterzogen. Die Färbung zeigt für A1 bis A3 das gleiche Muster: Bei ca. 40 kDa ist eine distinkte Bande erkennbar zusammen mit einer geringfügig langsamer migrierenden Bande bei etwa 45 kDa, welche zusätzlich schwächer ist. Weiterhin sind schwache Banden bei ca. 20, 26, 35 und 100 kDa angefärbt worden.

Zur näheren Identifizierung der Banden wurde in einem separaten Ansatz nach der SDS-PAGE eine Immunodetektion angeschlossen (s. Abb. 5.6C). Erneut wurden die Fraktionen E, D und W von *Tv*AKT1::HA exprimierenden Trichomonaden aufgeschlossen mit einem Standard-Lysispuffer (A1), dem Lysispuffer nach (Palm et al. 2005) (A2) bzw. *Tv*CEN1::HA (s. Kap. 5.5) Lysat exprimierender Zellen als Negativkontrolle (NK)

aufgetragen. Nach der SDS-PAGE folgte der Western Transfer und die Immunodetektion. Hier kamen zwei unterschiedliche Erstantikörper zum Einsatz: α -Aktin und α -HA, welche in einem Multiplex Fluoreszenz Western Blot detektiert wurden. Im roten Kanal ist α -HA mit einer deutlichen Bande bei ca. 45 kDa sichtbar, im grünen Kanal α -Aktin mit einer klaren Bande bei etwa 40 kDa. Die schwachen Banden in der Durchfluss-Fraktion korrelieren mit der Höhe der beiden Banden aus dem Eluat. In der Negativkontrolle, bei der *TvCEN1::HA* (22 kDa) isoliert werden sollte, ist ein schwaches Signal (grün) detektiert worden, jedoch im zugeschnittenen Bild nicht sichtbar. Die Banden des Markers sind aufgrund ihrer Autofluoreszenz in rot sichtbar.

Nach der Etablierung der Affinitätschromatographie über den spezifischen HA-Tag

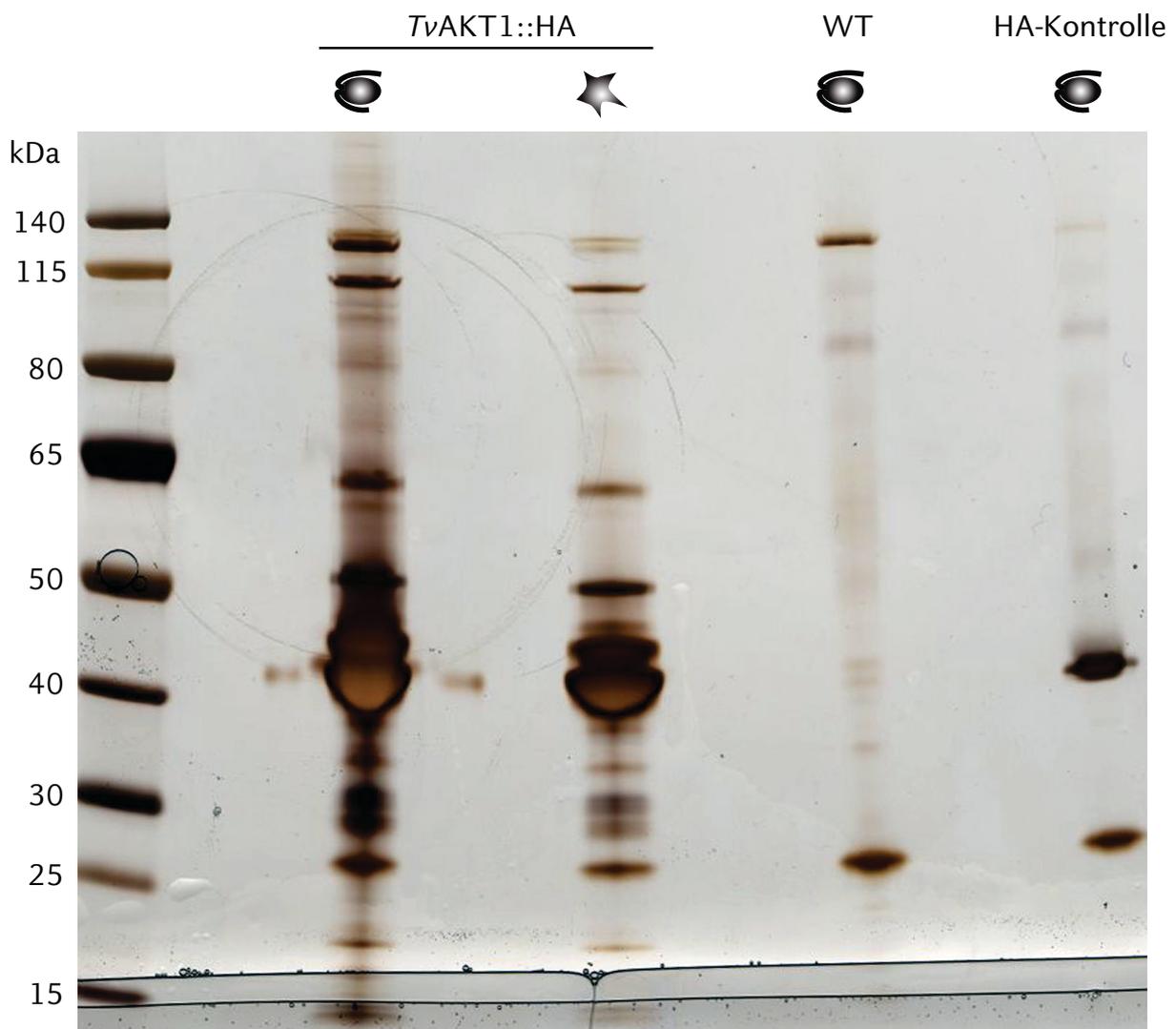


Abbildung 5.7 SDS-PAGE der eluierten Proben der Affinitätschromatographie von *TvAKT1::HA* aus freischwimmenden (Pyriform) und amöboiden (Sternform) Trichomonaden, Wildtyp-Zellen und einer HA-Kontrolle (*TVAG_562550::HA*; 44 kDa, stets FMV1) zur Prüfung der Spezifität der Affinitätschromatographie. Das Gel wurde silbergefärbt.

Tabelle 5.2 Identifizierte Proteine über sequenzierte Peptide der eluierten Proben der Affinitätschromatographie nach Zytoskelett-Funktion gefiltert. Die Sequenzierung erfolgte über MALDI-TOF im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum. Dargestellt sind die TVAG-Nummern nach TrichDB, die Annotierung des Proteins bzw. die über BLAST gefundenen Homologien und die entsprechenden PSM-Werte (*peptide spectrum match*), welche die Abundanz der Proteine innerhalb der Proben repräsentieren. Die Sequenzierung wurde für die Proben TvAKT1::HA freischwimmend und amöboid, gefolgt von einer HA-Kontrolle (TVAG_562550::HA) durchgeführt. Schließlich ist das Molekulargewicht (MW) in kDa angezeigt.

TVAG-Nummer	Annotierung	#PSM frei-schwimmend	#PSM amöboid	#PSM HA-Kontrolle	MW [kDa]
TVAG_351310	Fimbrin	36	11		67,8
TVAG_124870	Coronin	34	14		48,1
TVAG_222320	Coronin	27	12		48,4
TVAG_239310	α -Aktinin	27	6		127,8
TVAG_190450	α -Aktinin	24	13		106,2
TVAG_177180	Coronin	24			48,2
TVAG_163000	HSP70	17			71,1
TVAG_407250	Adenylyl cyclase protein	9			46,2
TVAG_470230	AF capping protein	8	22		29,1
TVAG_092490	HSP70	6			71,3
TVAG_369030	Clathrin heavy chain	5		6	84,5
TVAG_148390	Tubulin ϵ chain	5			28,1
TVAG_271090	Formin	4	16		308,8
TVAG_407150	Arp2/3 complex	4	7		15,1
TVAG_212270	AF capping protein	4	6		30,9
TVAG_485580	Synaptotagmin	4	5		144,1
TVAG_519620	Tubulin β chain	4			39,5
TVAG_156680	Spectraplakin	4			69
TVAG_180570	hypothetical (FERM)	4			613,2
TVAG_094060	AF capping protein	3	3		30,8
TVAG_354020	Contractin	3			44,1
TVAG_532880	Clathrin heavy chain	3			94,9
TVAG_234160	Arp2/3 complex	2	2		19,6
TVAG_456670	Ankyrin	2			66,4
TVAG_333620	WD40 repeat	2			64,5
TVAG_369020	Clathrin heavy chain	2			68,4
TVAG_153560	HSP90	2			83,6
TVAG_539120	Cell wall surface anchor			7	32,1
TVAG_087140	Arp2/3 complex			6	34,7
TVAG_245580	Cadherin homology			4	265,7
TVAG_402260	Cofilin			2	16
TVAG_296920	Glutamic acid rich protein			2	14,7
TVAG_271840	AF capping protein			2	30,3

wurde ein Ansatz für eine massenspektrometrische Analyse der Proteine im *Molecular Proteomics Laboratory* (MPL) des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) vorbereitet. Hierzu wurde ein Gesamtzellextrakt aus frei-schwimmenden und amöboiden Zellen (Induktion durch Fibronectin) von *T. vaginalis* FMV1 genutzt. Als Spezifitätskontrolle der HA-Affinitätschromatographie wurde Gesamtzellextrakt aus wildtypischen und HA-Fusionsprotein (TVAG_562550::HA, 44 kDa) exprimierenden Zellen eingesetzt. Die Proben wurden in einem 12%igem SDS-Gel getrennt, welches anschließend einer Silberfärbung unterzogen wurde (s. Abb. 5.7).

Es sind erneut die distinkten Doppelbanden von Aktin zu sehen, wie in Abb. 5.6, zusammen mit einer Vielzahl von Banden auf unterschiedlichen Höhen, welche Interaktionspartner darstellen könnten. Im Wildtyp-Ansatz ist eine deutliche Bande bei 120 und 25 kDa mit einem leichten Hintergrund erkennbar, während für die HA-Kontrolle das markierte Protein eluiert wurde (44 kDa). Auch hier ist ein Hintergrund im gesamten Migrationsverlauf der Probe ersichtlich. Auffällig dabei sind die unterschiedlichen Mengen an Proteinen der geladenen Fraktionen. Das MPL sequenzierte anschließend die Peptide mittels MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time of Flight*, (Yip und Hutchens 1992)) aus beiden *TvAKT1::HA* Proben und der HA-Kontrolle, wobei die Bereiche des Gels um 40 kDa nicht berücksichtigt wurden. Um die Sequenzierung der putativen Interaktionspartner zu optimieren, wurden diese Banden weggelassen, da diese bereits mittels Immunodetektion identifiziert wurden (s. Abb. 5.6). Die sequenzierten Peptide wurden zusammengefasst und mit Referenzsequenzen aus TrichDB verglichen, um diesen dann TVAG-Nummern zuzuordnen. Der PSM-Wert (*peptide spectrum match*, (Frank 2009)) ist eine semi-quantitative Messung der Abundanz der Peptide innerhalb der sequenzierten Probe (s. Tab. 5.2). Die Liste an identifizierten Kandidaten beinhalteten Proteine, die am Zytoskelett, dem Metabolismus, der Signaltransduktion und der Translation beteiligt sind. Die Kandidaten, die keine Annotierung aufwiesen, wurden mittels BLAST-Analyse geprüft und nach größter Homologie identifiziert. Anschließend erfolgte eine Filterung der Proteine nach Funktion: Kandidaten, welche nicht mit dem Zytoskelett assoziiert sind, wurden ausgenommen (s. Tab. 7.5). Diese Tabelle beinhaltet abundante Proteine der hydrogenosomalen Maschinerie, wie zum Beispiel die

Malatdehydrogenase, die Succinyl-CoA-Synthetase oder die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase. Weiterhin wurden ribosomale Proteine oder Transkriptions- und Translationsfaktoren identifiziert. Die Mehrzahl der identifizierten Kandidaten aus Tabelle 5.2 assoziiert mit Aktin oder sind membranständige Proteine, die ebenfalls eine wichtige Rolle im Zytoskelett erfüllen. So wurden Aktin-bindende Proteine, wie Fimbrin, Coronin, Formin und α -Aktinin identifiziert. Es konnten zwei Tubulin-Monomere identifiziert werden und weitere Proteine, die zwischen den Netzwerken der Filamentarten interagieren (s. Tab. 5.2).

5.3 TvFIM1 als Aktin-interagierendes Protein

Proteine der Fimbrin-Familie sind in der Literatur als Aktinfilament-bündelnde Proteine charakterisiert (Gerke und Weber 1983; Hanein et al. 1998). In *Trichomonas vaginalis* wurden zwei Homologe von Fimbrin/Plastin identifiziert: TvPLN1 (TVAG_351310) und TvPLN2 (TVAG_116370) (Kusdian 2011). Aufgrund der universellen Nomenklatur „Fimbrin“, welche der Überbegriff dieser Klasse an Proteinen ist und Plastine beinhaltet, wurden diese Proteine als TvFIM1 und TvFIM2 definiert. TvFIM1 wurde mittels Reverser Transkriptase (RT-PCR) als ein exprimiertes Gen in *T. vaginalis* (Stamm T1) nachgewiesen und in frei-schwimmenden Zellen in der Zellperipherie lokalisiert. Aufgrund der fehlenden Ko-Lokalisierung mit Aktin und die Abwesenheit von Aktin in einer Affinitätschromatographie von HA-markiertem TvFIM1 konnte die Interaktion zwischen TvFIM1 und Aktin nicht nachgewiesen werden (Kusdian 2011).

Fimbrine bestehen aus dem Aminosäuremotiv EF-Hand am N-Terminus, welches Calcium-Ionen bindet (Zhou et al. 2009), gefolgt von vier Calponin Homologie Domänen als Aktin-bindende Regionen (Korenbaum und Rivero 2002). Verglichen zu anderen Fimbrin Proteinen aus unterschiedlichen Eukaryoten zeigt TvFIM1 auf Aminosäure-Ebene eine hohe Homologie und weist bereits charakterisierte Binde- bzw. Suppressorstellen, markiert mit einem Punkt unterhalb des Alignments (Abb. 5.8A), auf (Klein et al. 2004). Das Alignment ist mit einem Farbcode von blau (= geringe Übereinstimmung) bis rot (=

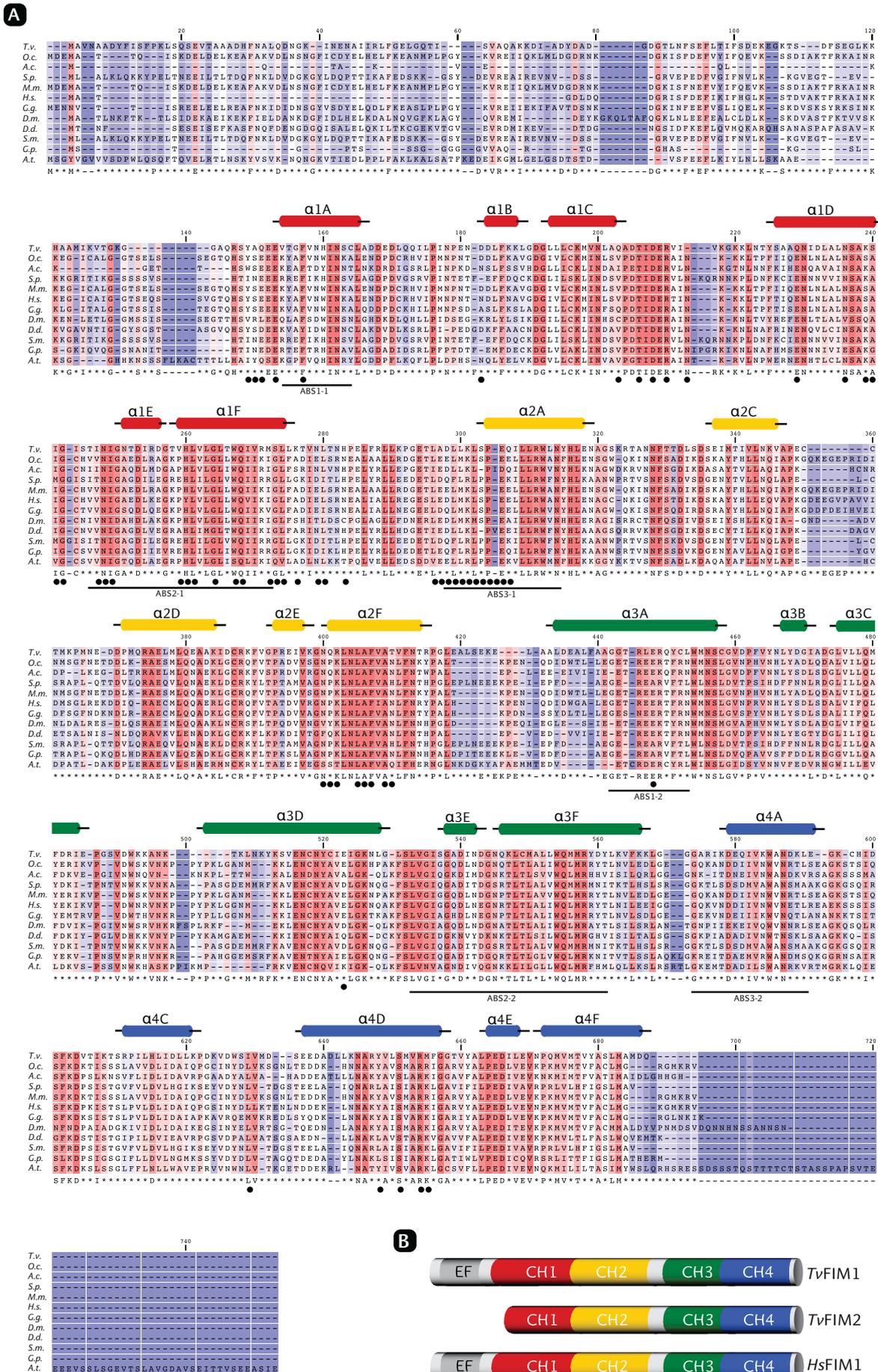


Abbildung 5.8 A) Alignment von TvFIM1 und seiner Homologe aus einer Auswahl von Eukaryoten. Bekannte α -helikale Strukturen der entsprechenden Calponin Homologie Domänen (CH) sind oberhalb des Alignments angezeigt, während Aminosäuren, welche als konservierte Bindestellen für F-Aktin oder Suppressor-Stellen agieren, mit einem Punkt markiert sind. Bekannte Aktin-Bindestellen (ABS) sind unterhalb des Alignments gekennzeichnet (basierend auf (Klein et al. 2004)). B) TvFIM1 weist sowohl die EF-Hand als auch vier Calponin Homologie Domänen (CH) auf, während TvFIM2 am N-Terminus verkürzt ist. Zum Vergleich dient das humane Fimbrin Protein (*HsFIM1*, L-Plastin), welches lediglich 16 Aminosäuren länger ist und eine Sequenzidentität mit TvFIM1 von 43% aufweist. Das Alignment wurde mit CLC Workbench (www.clcbio.com) mit Standard-Einstellungen und folgenden Proteinsequenzen generiert: O.c. = *Oryctolagus cuniculus* (XP_002720283.1); A.c. = *Acanthamoeba castellanii* (ELR12888.1); S.p. = *Schizosaccharomyces pombe* (NP596289.1); M.m. = *Mus musculus* (AAH05459.1); H.s. = *Homo sapiens* (AAB02845.1); G.g. = *Gallus gallus* (P19179); D.m. = *Drosophila melanogaster* (AAF48722.1); D.d. = *Dictyostelium discoideum* (P54680); S.m. = *Schistosoma mansoni* (AAC14025.1); G.p. = *Gibberella pulicaris* (CAA10667.1); A.t. = *Arabidopsis thaliana* (AAC39359.1). Nach (Kusdian et al. 2013).

hohe Übereinstimmung) versehen, zusammen mit dem Konsens der Aminosäuren in der untersten Zeile. Die vier Calponin-homologe Domänen sind in den Farben rot, gelb, grün und blau markiert und zeigen bereits charakterisierte Positionen ihrer α -helikalen Strukturen an. Die Regionen, an denen filamentöses Aktin gebunden wird, sind mit einem Balken unterhalb des Alignments gekennzeichnet (ABS = *actin binding site*). Die Illustration von TvFIM1 und TvFIM2 in Abb. 5.8B zeigt den schematischen Aufbau des Proteins im Überblick. TvFIM2 ist N-terminal verkürzt und weist dadurch keine EF-Hand auf. Zusätzlich ist die erste Calponin Homologie Domäne von TvFIM2 kürzer als die von TvFIM1. Im Vergleich zu L-Plastin, einem humanen Protein der Fimbrin-Familie (*HsFIM1*), ist die Sequenz von TvFIM1 um 16 Aminosäuren reduziert und besitzt eine Sequenzidentität von 43%.

5.3.1 TvFIM1 bündelt Aktinfilamente

Für die Charakterisierung eines Fimbrin Proteins in *Trichomonas vaginalis* wurde TvFIM1 gewählt, da es mit seiner stärkeren Homologie gegenüber bekannten Fimbrinen anderer Organismen TvFIM2 überwiegt. TvFIM1 wurde heterolog in dem *E. coli* Stamm C41 überexprimiert (Kusdian 2011) und wurde im Rahmen der folgenden *in vitro* Experimente über Flüssigkeitschromatographie (*Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC) gereinigt (s. Abb. 7.1A). TvFIM1 wurde über einen Polyhistidin(6xHis)-Tag mittels Affinitätschromatographie isoliert. Die Fraktionen des Gesamtzellextrakts nicht induzierter, jedoch transformierter *E. coli* Zellen (1), induzierter *E. coli* Zellen (2) und das via Affinitätschromatographie eluierte TvFIM1 (3) sind in einem Coomassie-gefärbten 12%

SDS-Gel zu sehen (s. Abb. 7.1B). Die Proben wurden aliquotiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung für Analysen in der *Summer School on Actin Dynamics* in Regensburg auf Trockeneis gelagert. In diesem Kurs lag der Fokus auf Aktin und seine interagierenden Proteine, die Polymerisierung von Monomeren mittels Interaktionspartner und deren Funktion bei der Bildung komplexer Aktinnetzwerke.

Ein erstes Experiment sollte die generelle Interaktion von *TvFIM1* mit Aktin nachweisen, indem die Fluoreszenzpolarisations-Anisotropie des Proteinkomplexes gemessen wurde (s. Kap. 4.10.2.9). Die Anisotropie wird durch die Fluoreszenz markierter Proteine bestimmt. Der Wert ist einzigartig für jedes Protein und ändert sich dementsprechend bei Bindung und Interaktion mit anderen Proteinen (Pollard 2010). Dabei fallen Wertänderungen von maximal $\pm 0,04$ a.u. bei Protein-Protein-Interaktion in der Anisotropie eher gering aus, bedeuten jedoch eine signifikante Änderung (Vinson et al. 1998). Für *TvFIM1* wurde *Oregon Green*-markiertes Aktin aus *Acanthamoeba* genutzt. Es ergab sich im Vergleich zu dem Ansatz ohne *TvFIM1* eine Anisotropie-Änderung von $+ 0,02$ (s. Tab. 5.3). Diese Werte bilden den Durchschnitt aus zehn Messungen.

Tabelle 5.3 Fluoreszenzpolarisations-Anisotropie Messung von *Oregon Green*-markiertem Aktin aus *Acanthamoeba* in Ab- und Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ *TvFIM1*. Werte sind in willkürlichen Einheiten dargestellt (*arbitrary units* = a.u.).

Negativkontrolle	+ $10 \mu\text{M}$ <i>TvFIM1</i>	Änderung
0,13065 a.u.	0,15128 a.u.	+ 0,02063 a.u.

Die Wirkung von *TvFIM1* auf die Polymerisierungsrate von Aktinfilamenten sollte in einer fluorometrischen Messung über die Zeit bestimmt werden. In diesem Versuch wurden in vier einzelnen Ansätzen die Polymerisierungsraten von Aktin aus Kaninchen (*RbAKT*) und aus *Acanthamoeba* (*AcAKT*) in Ab- und Anwesenheit von $4 \mu\text{M}$ *TvFIM1* untersucht. Dabei waren 5% der Aktin-Monomere mit Pyren als Fluorophor markiert. Die Messung ergab, dass die Polymerisierungsrate für *RbAKT* durch die Anwesenheit von *TvFIM1* nicht bzw. marginal beeinflusst wurde (s. Abb. 4.9A, blaue Kurven), jedoch die Rate von *AcAKT* erhöht war (s. Abb. 5.9A, braune Kurven). Die Saturation der Polymerisierung von *AcAKT* tritt bei Anwesenheit von *TvFIM1* bereits nach ca. 1200 sec ein, was bei der Negativkontrolle erst nach 1600 sec (ca. 27 min) der Fall ist.

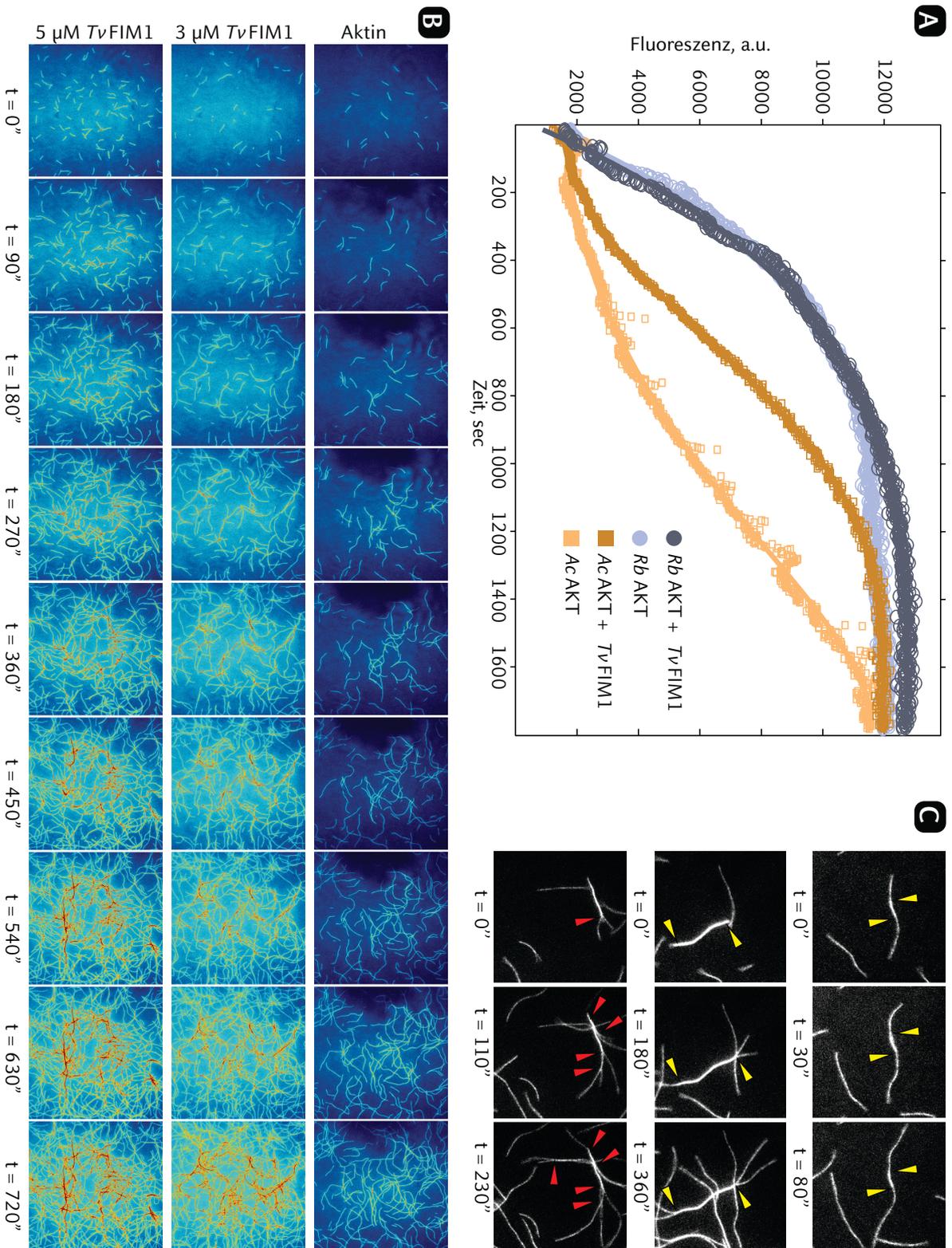


Abbildung 5.9 *In vitro* Effekt von TvFIM1 auf die Aktin-Polymerisierung (Poly.). A) Poly. von Pyren-markiertem *Acanthamoeba* (AcAKT) und Kaninchen Aktin (RbAKT) in An- und Abwesenheit von 4 μM TvFIM1. Während keine signifikante Änderung für die Polymerisation von RbAKT beobachtet wurde, war die Rate für AcAKT erhöht. B) RbAKT Poly. wurde in An- und Abwesenheit von 3 und 5 μM TvFIM1 mittels TIRF Mikroskopie beobachtet und ergab sowohl eine erhöhte Polymerisationsrate als auch ein starkes anti- und paralleles Bündeln von F-Aktin. C) Details der Bündelaktivität von TvFIM1. Gebündeltes F-Aktin polymerisiert entweder in die gleiche

Schließlich wurden *TvFIM1* und einzelne, fluoreszierende Aktinfilamente mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF) untersucht. Diese Technik eignet sich besonders für die Observierung von Molekülen, die sich sehr nah am Objektträger befinden (Axelrod et al. 1983). Abbildung 4.8B zeigt das Ergebnis, in dem erneut *RbAKT* Monomere genutzt wurden, von denen 7% mit Alexa fluor 568 markiert waren. Der genutzte Polymerisierungspuffer sorgt für die spontane Assemblierung der Monomere zu Filamenten, welche aufgrund der akkumulierten Fluoreszenz sichtbar werden. Die Zugabe von 3 und 5 μM *TvFIM1* hat eine erhöhte Polymerisierungsrate der Aktin-Monomere zur Folge, dass durch die Pseudofarben von dunkelblau (= keine Fluoreszenz) bis rot (= sehr starke Fluoreszenz) deutlich wird. Bei genauerer Betrachtung ist das Bündeln von Aktinfilamenten sichtbar (s. Abb. 5.9C), das anhand der erhöhten Fluoreszenz in dem Bereich und den Verzweigungsstellen der Filamente deutlich wird (gelbe Pfeilköpfe). Dabei werden die Filamente parallel und anti-parallel gebündelt und polymerisieren weiter (rote Pfeilköpfe). Eine bevorzugte Orientierung konnte nicht determiniert werden.

5.3.2 *TvFIM1* re-lokalisiert in amöboiden Zellen in Akkumulationen

Mit der laboratorischen Etablierung der virulenten *T. vaginalis* Stämme T016 und FMV1, welche die amöboide Umwandlung vollziehen können, sollte die Lokalisierung von *TvFIM1* intrazellulär investigiert werden. Mit der Erkenntnis der mangelnden Ko-Lokalisation von *TvFIM1* und Aktin im frei-schwimmenden Stadium von *T. vaginalis* T1 (Kusdian 2011) wurde der Stamm T016 in Ab- und Anwesenheit von vaginalen Epithelzellen fixiert und immunologisch mit α -*TvFIM1* (grün; s. Abb. 7.4 für Kontrollen dieses Antikörpers) und α -Aktin (rot) behandelt (s. Abb. 5.10). Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen frei-schwimmende Trichomonaden, in denen sich *TvFIM1* an der Zellperipherie befindet (Abb. 5.10A), ohne mit Aktin zu ko-lokalisieren (Abb. 5.10C), während sich das Protein in der Umwandlungsphase auf Vaginalzellen re-organisiert und nun mit Aktin ko-lokalisiert, deutlich an der gelben Färbung (Abb. 5.10G). Dabei ist *TvFIM1* in einer sich zum Fixierungspunkt amöboid werdenden Zelle in einem abgegrenzten Ring nahe der Plasmamembran situiert (Pfeil) und zeigt in einer vollständig amöboiden Zelle ein cluster-ähnliches Muster (Pfeilkopf). Weitere erkennbare Strukturen sind fadenartig (5.10I und

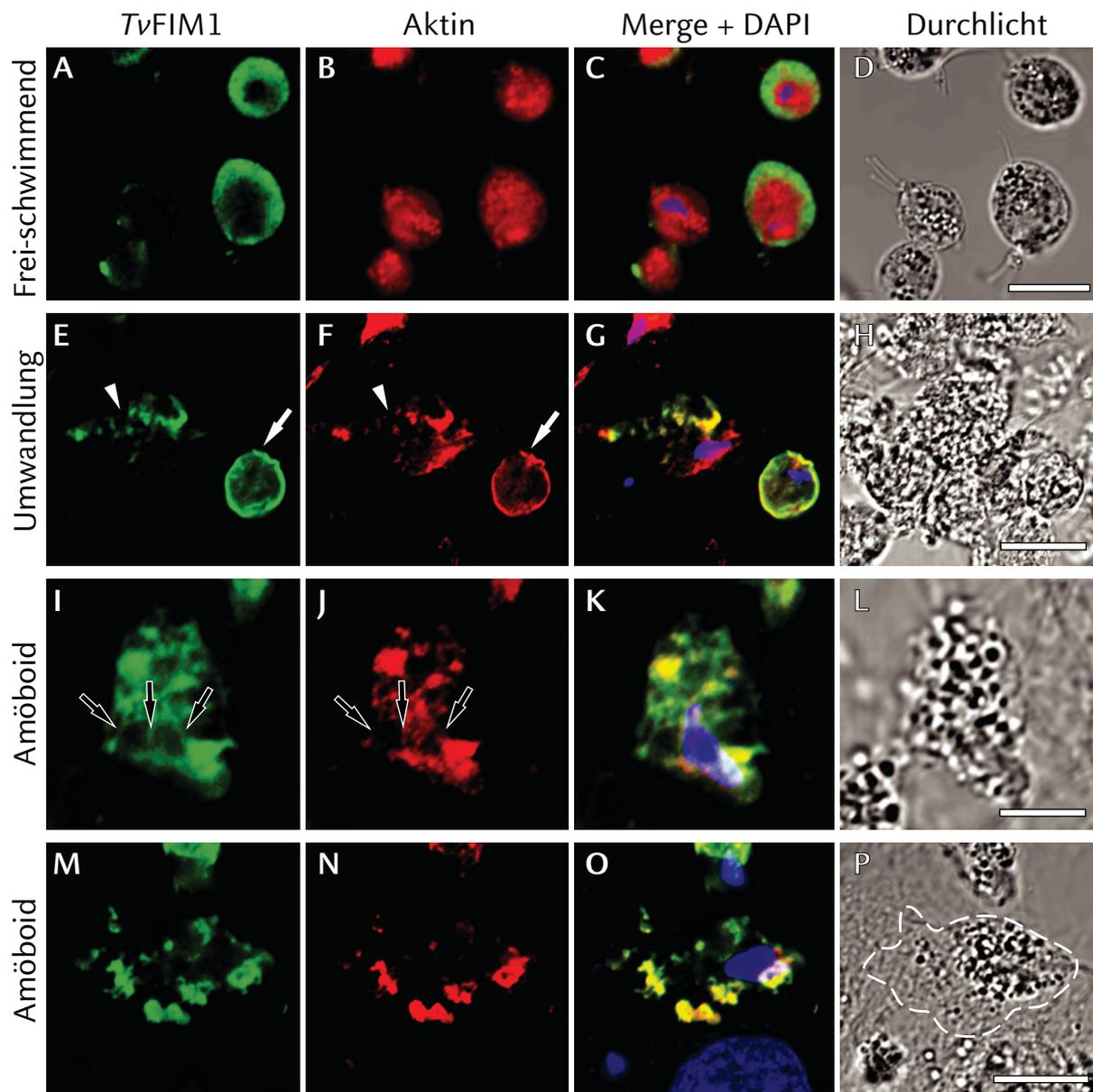


Abbildung 5.10 Immunofluoreszenzaufnahmen von *TvFIM1* in frei-schwimmenden und amöboiden Trichomonaden. In frei-schwimmenden Zellen lokalisiert *TvFIM1* (grüner Kanal) auf einer gradienten-ähnlichen Weise in der Zellperipherie ohne eine Ko-Lokalisierung mit Aktin (roter Kanal) zu zeigen (A-D). Die Überlagerung (Merge) zeigt zusätzlich die DAPI Färbung (blauer Kanal). In Zellen, die auf vaginale Epithelzellen gegeben wurden (E-P), ko-lokalisiert *TvFIM1* mit Aktin und assoziiert mit Strukturen, welche Aktin-Kabeln ähneln (Pfeile in I und J) und zeigt eine periphere Anreicherung mit Aktin (M-O). In (E-G) ist eine noch pyriforme Zelle neben einer amöboiden Zelle sichtbar, in der *TvFIM1* in einem abgegrenzten Ring mit Aktin ko-lokalisiert (Pfeil) und damit ein gänzlich anderes Lokalisierungsmuster als die amöboide Zelle zeigt (Pfeilkopf). Die gestrichelte Linie in (P) zeigt den Umriss der Zelle basierend auf dem Fluoreszenzkanal. Erstantikörper: α -*TvFIM1* (Ratte) und α -Aktin (Maus) mit jeweils 1:2000). Zweitantikörper: Alexa fluor 633 α -Ratte und Alexa fluor 488 α -Maus (jeweils 1:5000). Skalierungsbalken: 10 μ m. Nach Kusdian et al. 2013.

5.10J, Pfeile) und akkumulierte Bereiche an der Plasmamembran in Bewegungsrichtung (5.10M–O) werden durch die gestrichelte Linie des Zellumrisses ersichtlich (5.10P). Die DAPI Färbung zeigt die Zellkerne sowohl von Parasiten als auch von Wirtszellen (5.10O), wobei die Aktin-Markierung hauptsächlich in *T. vaginalis* erfolgreich war, nicht jedoch in den vaginalen Epithelzellen. Dies ist wiederum konträr zu der Immunfluoreszenz-

aufnahme in Abb. 7.3. Hier wurde statt α -Aktin fluoreszierendes Phalloidin (Texas Red[®]) zur Färbung der Aktinfilamente genutzt. Dies hatte zur Folge, dass das Aktin-Netzwerk der Vaginalzellen sichtbar wurde (7.3B), jedoch nicht in *T. vaginalis* (7.3A). TvFIM1 ist weiterhin in Akkumulationen an der Plasmamembran in Bewegungsrichtung lokalisiert, erneut indiziert durch den Zellumriss in 7.3D und zeigt zudem eine wellenartige Struktur auf (7.3E). In (7.3I–L) ist eine ganze Population von *T. vaginalis* Zellen zu sehen, in denen TvFIM1 vornehmlich in der Zellperipherie lokalisiert. Der DAPI Kanal zeigt multi-nukleäre Zellen mit zwei oder vier Zellkernen (7.3K, Pfeilköpfe).

Für die Lokalisierung von TvFIM1 während der Morphogenese von lebenden Zellen sollte der HaloTag[®] etabliert werden (s. Abb. 7.5). Das Gen wurde inklusive Tag transkribiert (7.5A), jedoch konnte es nicht mittels des zusätzlichen HA-Tags auf translationaler Ebene detektiert werden (7.5B). Für die Observierung von lebenden Zellen wird ein Ligand benötigt (s. Kap. 4.3), welcher jedoch keine Fluoreszenz erbrachte.

Daher wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Marker benutzt. Als Expressionsvektor wurde der Vektor pTv_GFP genutzt (s. Kap. 4.8), der eine für *T. vaginalis* codon-optimierte GFP Sequenz codiert und das inserierte Gen unter dem SCS Promotor exprimiert. Der *T. vaginalis* Stamm FMV1 wurde mit dem TvFIM1::GFP Konstrukt transfiziert und selektiert. Der Transfektionserfolg wurde anschließend überprüft und zeigt in der Western Blot Analyse ein Signal bei ca. 100 kDa (Abb. 7.5). Die Kultur konnte somit ohne immunologische Behandlung auf speziellen Objektträgern, die zuvor mit vaginalen Epithelzellen inokuliert wurden, observiert werden (s. Kap. 4.10.2.6). Die Observierung wurde bei 37 °C und 5% CO₂ durchgeführt, so dass die *T. vaginalis* Zellen keine umweltbedingten Stresseinflüsse erfuhren. Die Fluoreszenzaufnahmen über die Zeit zeigen neben einem cytosolischen Hintergrund spezifische Signale innerhalb der Parasiten (s. Abb. 5.11). Bei der Teilung einer Trichomonade ist im Fluoreszenzkanal der Zellkern stets ausgespart und zeigt bei t = 36'' eine Akkumulation von TvFIM1::GFP am abgeschnürten Ende der Tochterzelle (Pfeilköpfe), indiziert mit einem Stern (Abb. 5.11, Teilung). In der Durchlicht-Aufnahme ist zu erkennen, dass die Tochterzelle ihre Flagellen aktiv nutzt, um aus der Mutterzelle hervorzugehen. In einer migrierenden Zelle sind punktförmige Signale an der Plasmamembran in Bewegungsrichtung zu sehen, die

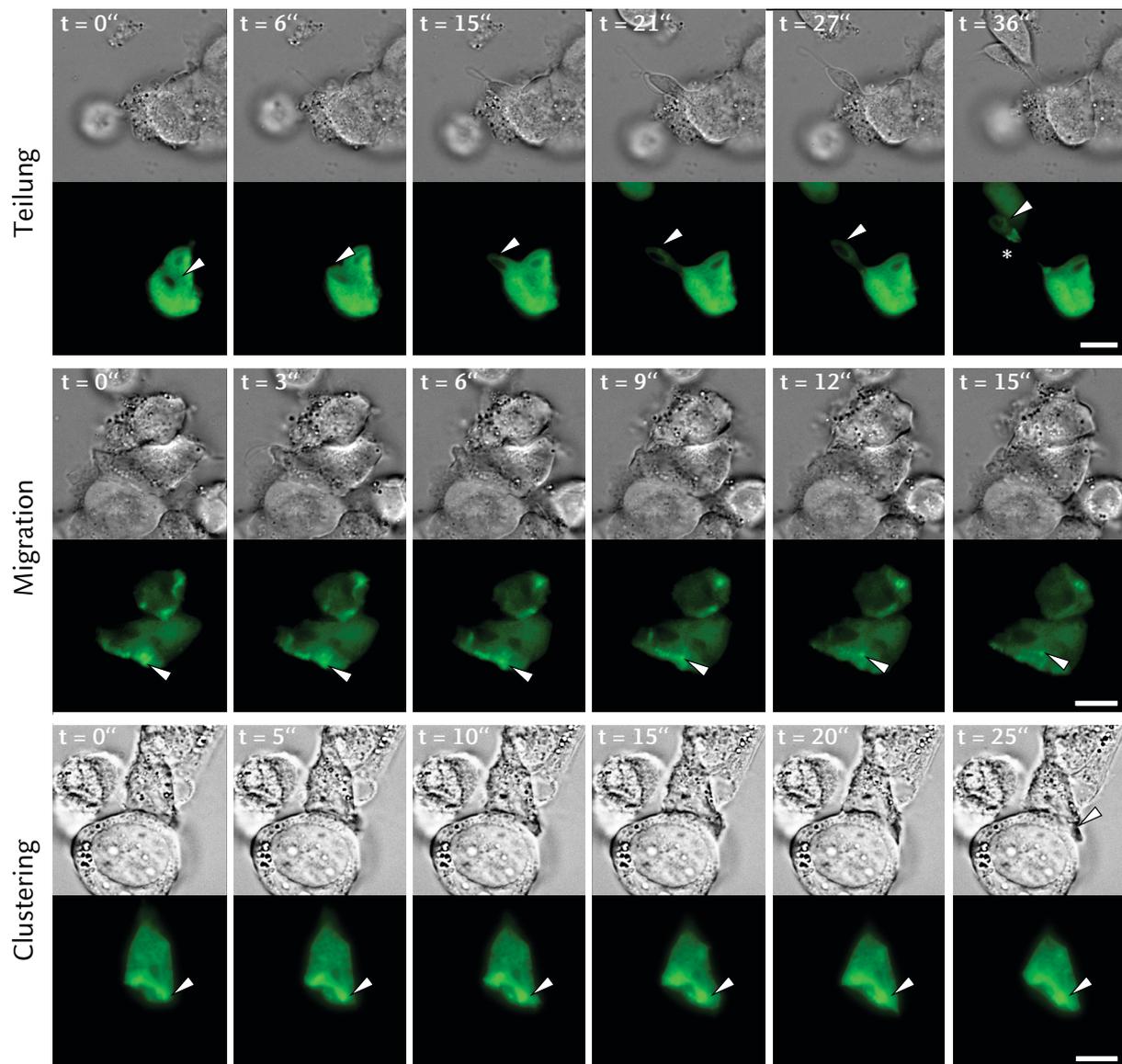


Abbildung 5.11 Lebendzellaufnahmen von *Trichomonas vaginalis* FMV1 mit *TvFIM1::GFP* während der Infektion von vaginalen Epithelzellen. In der ersten Zeile ist eine Tochterzelle zu sehen, die aus der Mutterzelle hervorgeht. Dabei lokalisiert *TvFIM1::GFP* in einer Struktur ähnlich eines kontraktilen Rings (Stern) am basalen Ende der Tochterzelle während der Segregation. Während der amöboiden Migration auf den Wirtszellen sind individuelle Wellen von *TvFIM1::GFP* sichtbar (Pfeilköpfe in mittlerer Zeile), welche von der peripheren Seite der Zelle nach innen wandern. Die Anreicherung (Clustering) von *TvFIM1::GFP* wurde größtenteils an der ersten Kontaktseite zur Wirtszelle beobachtet (Pfeilköpfe in der unteren Zeile). Aufnahmen wurden 15 min (Clustering) und 70 min (Teilung und Migration) nach der Gabe von *T. vaginalis* auf die Wirtszellen erstellt. Skalierungsbalken: 10 μm . Nach Kusdian et al. 2013.

während des Verlaufs wellenartig in das Zellinnere wandern (Pfeilköpfe, Abb. 5.11, Migration). Adhärenente Trichomonaden zeigten an den Kontaktstellen zu Wirtszellen eine cluster-förmige Anreicherungen von *TvFIM1::GFP* auf, die nur kurzzeitig sichtbar waren (Pfeilköpfe, Abb. 5.11, Clustering).

5.3.3 Phagozytose von Hefe und die Lokalisation von TvFIM1

Trichomonas vaginalis phagozytiert unter anderem Bakterien, Leukozyten, Erythrozyten und Zellen des Urogenitaltrakts (Demirezen et al. 2000). Die Phagozytose von *T. vaginalis* wurde in einer Studie mit *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) analysiert und ergab eine verminderte Effektivität bei Zugabe von Cytochalasin (s. Kap. 3.3), welches diesen

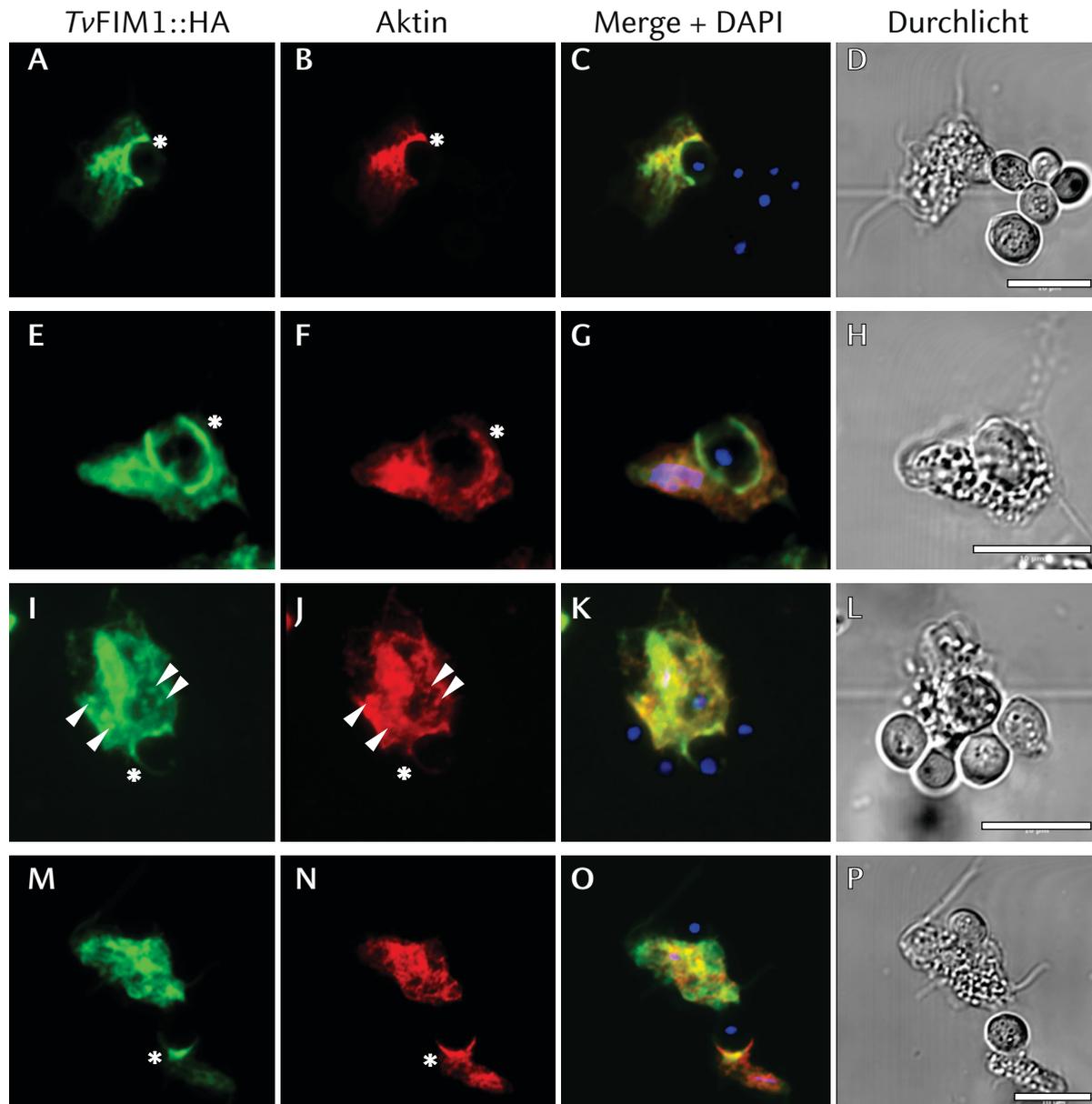


Abbildung 5.12 Immunofluoreszenzaufnahmen von TvFIM1::HA (grüner Kanal) und Aktin (roter Kanal) in *T. vaginalis* T016 bei der Phagozytose von Hefe. Die Überlagerung (Merge) zeigt zusätzlich die DAPI Färbung (blauer Kanal). Aktin und sein bündelndes Protein TvFIM1 ko-lokalisieren in Clustern von angrenzenden phagozytotischen Vesikeln (Pfeilköpfe). Ähnliche Strukturen wie bei der Infektion von Vaginalzellen (s. Abb. 4.9) sind erkennbar zusammen mit einer Akkumulation des Proteins an der Aufnahme- und Akkumulationsseite der Hefe in einer umschließenden Struktur (Stern). Erstantikörper: α -HA (Kaninchen) und α -Aktin (Maus) mit jeweils 1:2000. Zweitantikörper: Alexa fluor 633 α -Kaninchen und Alexa fluor 488 α -Maus (jeweils 1:5000). Skalierungsbalken: 10 μ m. Nach Kusdian et al. 2013.

Mechanismus ebenfalls als Aktin-basierend charakterisiert (Pereira-Neves und Benchimol 2007). Daher sollte die Lokalisierung von TvFIM1 während der Phagozytose von *S. cerevisiae* untersucht werden. Hierzu wurde eine TvFIM1::HA exprimierende *T. vaginalis* T016 Kultur (s. Abb. 7.4B für den Transfektionserfolg) mit Hefe im Verhältnis 1:10 in speziellen Objektträgern gemischt und nach einer Inkubation von 20 min fixiert und immunologisch mit α -HA und α -Aktin behandelt (s. Kap. 4.9.1.2). Das genutzte Protokoll der Immunofluoreszenz-Fixierung (s. Kap. 4.10.2.5) ist nicht für Hefezellen geeignet (Pringle et al. 1991) und bedarf einer gesonderten Behandlung der Hefe-Zellwand (Silver 2009). Daher fehlt die Aktinfärbung in den Hefezellen.

TvFIM1 zeigt auch hier eine Ko-Lokalisation mit Aktin, erkennbar an der gelblichen Färbung in der Überlagerung beider Kanäle mit DAPI (Abb. 5.12C, G, K und O). Das Protein akkumuliert an dem Bereich der Plasmamembran, der die Hefezellen umringt (Abb. 5.12M–O) bzw. umschließt (Abb. 5.12E–G) (s. Stern) und weist punktuelle Strukturen innerhalb der Zelle auf (s. Pfeilköpfe in Abb. 5.12I und 5.12J). Die DAPI Färbung zeigt sowohl Zellkerne der Trichomonaden als auch Hefen, während sich die Aktinfärbung auf erstere beschränkt. Der Durchlichtkanal zeigt, dass es keine Präferenzen der Einschluss-Stelle in *T. vaginalis* gibt. Die Hefezellen werden von dem Parasiten lateral (Abb. 5.12P, obere Zelle) und posterior (Abb. 5.12D) aufgenommen. Weiterhin ist für TvFIM1 und Aktin die fadenartige Struktur erkennbar, ähnlich der in Abb. 5.5 und 7.3 gezeigten Struktur.

5.3.4 Transkriptionsanalysen von TvFim1

Parallel zu den proteomischen Untersuchungen sollten die Gene *TvFim1* und *TvFim2* auf Transkriptionsebene analysiert werden. Dies wurde bereits in frei-schwimmenden *T. vaginalis* Zellen (Stamm T1) durchgeführt und eine Transkription von *TvFim1* wurde verifiziert (Kusdian 2011). In der *Trichomonas* Genomdatenbank TrichDB (Aurrecochea et al. 2009) ist *TvFim1* mit 145 *expressed sequence tags* (ESTs) annotiert. Trotz der Tatsache, dass die ESTs aus mRNA (*messenger RNA*) von Trichomonaden unter verschiedenen Bedingungen, wie erniedrigter Glukosegehalt oder Fibronektin-induzierter

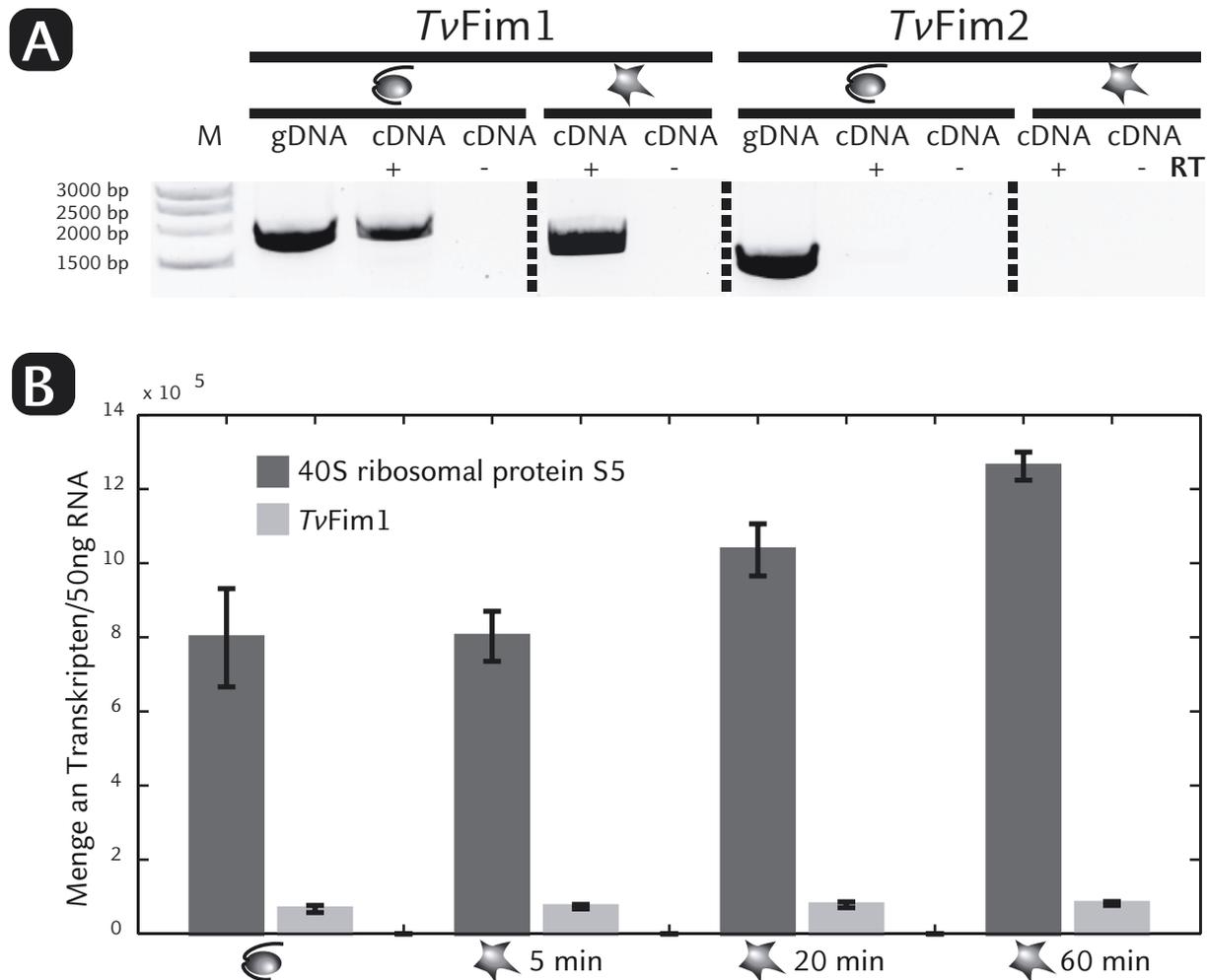


Abbildung 5.13 A) Reverse Transkriptase (RT)-PCR auf cDNA aus frei-schwimmenden (Pyriform) und amöboiden (Sternform) *T. vaginalis* T016 Zellen in Anwesenheit von Reverser Transkriptase (+RT) und in Abwesenheit (-RT) als Kontrolle zeigt lediglich eine Transkription von *TvFim1*. Eine Kontroll-PCR wurde mit genomischer DNA durchgeführt (gDNA). B) Quantitative Echtzeit-PCR zeigt in einer absoluten Quantifizierung, dass *TvFim1* während der amöboiden Form nicht hochreguliert wird, im Gegensatz zu einer Kopie des 40S ribosomalen Proteins S5 (TVAG_158720). Nach Kusdian et al. 2013.

Adhärenz, stammen, sind keine ESTs für *TvFim2* annotiert. Die Verifizierung, ob diese Gene transkribiert werden, wurde mittels Reverser Transkriptase (RT)-PCR realisiert, indem RNA aus *T. vaginalis* Stamm T016 im frei-schwimmenden (Pyriform) und amöboiden Stadium (Sternform) isoliert wurde (s. Abb. 5.13A). Die RNA wurde in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben und diente als Grundlage einer PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden (+RT). Dabei dienten Ansätze ohne die Zugabe der Reversen Transkriptase als Negativkontrolle (-RT) und eine PCR mit genomischer DNA als Matrize als eine weitere Kontrolle (gDNA). Für *TvFim1* konnte sowohl in frei-schwimmenden als auch in amöboiden *T. vaginalis* Zellen das Fragment mit einer distinkten Bande bei ca. 1.800 bp amplifiziert werden (Genlänge *TvFim1*: 1.833 bp), während bei *TvFim2* lediglich

eine Bande in der Kontrolle mit genomischer DNA (Genlänge *TvFim2*: 1.344 bp) nachgewiesen werden konnte. Die Negativkontrollen (-RT) weisen keine Amplifikate auf.

Im nächsten Schritt wurde die Transkription von *TvFim1* mit einer quantitativen Echtzeit-PCR (*quantitative real-time PCR*, qRT-PCR) bestimmt (s. Abb. 5.13B). Spezifische Oligonukleotide zur Detektion von *TvFim1* und einem Kontrollgen (40S ribosomales Protein S5, TVAG_158720) wurden in cDNA-Ansätzen aus RNA frei-schwimmender (Pyriform) und Fibronectin-induzierter, amöboider (Sternform) *T. vaginalis* T016 Zellen nach 5, 20 und 60 min eingesetzt und anschließend in einer absoluten Quantifizierung analysiert. Dabei wurden biologische und technische Triplikate erstellt. *TvFim1* weist ca. 75.000 Transkripte pro 50 ng RNA auf und bleibt während der Morphogenese auf diesem Niveau. Das Kontrollgen mit 700.000 Transkripten/50 ng RNA in frei-schwimmenden Zellen einen sehr viel höheren Wert auf, der über die Zeit auf fast 1.300.000 Transkripte ansteigt. Die Standardabweichung wird als Fehlerbalken angezeigt. Die Rohdaten sind in Tab. 7.3 zu finden.

Schließlich sollte ein Knockdown, welcher auf Interferenz-RNA (RNAi) basiert, der weiteren Charakterisierung von *TvFim1* dienen. Dabei werden endogene mRNAs durch einen komplementären Strang

(*anti-sense*) gebunden und somit inhibiert (Boyle et al. 2003). Eine Translation ist nicht mehr möglich. In *T. vaginalis* wurde bereits ein solcher Ansatz zwecks Funktionsdeterminierung des Myb2 Proteins als Transkriptionsfaktor durchgeführt (Ong et al. 2007) und diente im Rahmen dieser Arbeit als Basis. Der Expressionsvektor pTagvag2

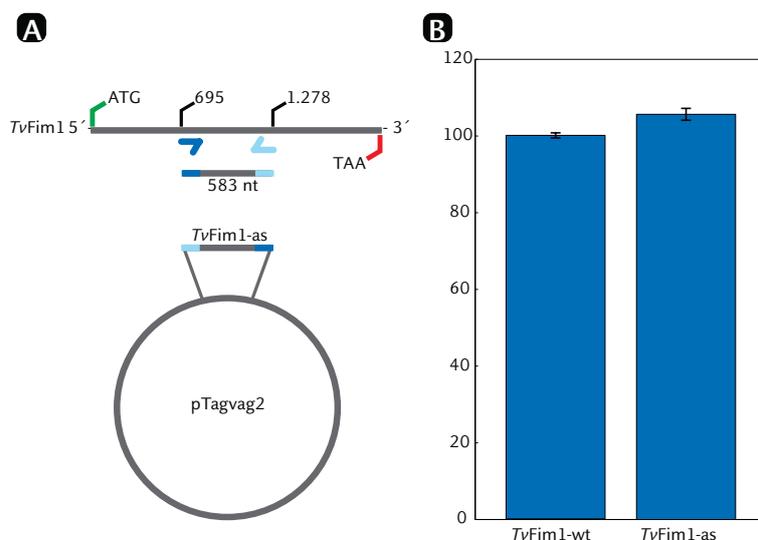


Abbildung 5.14 Versuch eines Knockdowns von *TvFim1* in *T. vaginalis* T016 Zellen mit *anti-sense* RNA nach (Ong et al. 2007). A) Die *anti-sense* Region wurde mittig der codierenden Sequenz von *TvFim1* gewählt und in den Expressionsvektor pTagvag2 kloniert. B) Transfizierte Trichomonaden zeigten mittels quantitativer Echtzeit-PCR keine signifikante Herunterregulierung des Gens (-as) im Vergleich zum Wildtyp (-wt). Nach Kusdian et al. 2013.

(Hrdy et al. 2004) wurde dahingehend modifiziert, dass die revers-komplementäre Sequenz des mittleren Bereichs des *TvFim1*-Gens inseriert wurde (s. Abb. 5.14A). Unter dem artifiziellen SCS-Promotor wird der *anti-sense* (as) Strang transkribiert und soll zur Translations-Inhibition an die endogene mRNA von *TvFim1* binden. *T. vaginalis* T016 wurde mit dem Konstrukt transfiziert und selektiert. Anschließend wurde aus Wildtyp (*TvFim1*-wt) und transfizierter Kultur (*TvFim1*-as) RNA isoliert und mittels qRT-PCR und Fragment-spezifischen Oligonukleotiden analysiert. Dabei wurden erneut biologische und technische Triplikate berücksichtigt. Bei der komparablen Quantifizierung wird die Kontrolle (*TvFim1*-wt) als Referenz definiert und die Werte (*TvFim1*-as) in Relation dazu gesetzt (s. Ab. 5.14B). Die Untersuchung ergab keine Herunterregulierung des Gens *TvFim1* und somit keine erfolgreiche Einführung eines Knockdowns.

5.4 GFP in *T. vaginalis* als Lebendzell-Marker

Die Nutzung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) als alleinigen Lebendzell-Marker in *Trichomonas vaginalis* ist bisher nicht publiziert. In diesem Zusammenhang wurden lediglich GFP-Transkripte basierend auf dem *T. vaginalis* Virus (TVV, Familie der Totiviridae) in Trichomonaden eingebracht (Li et al. 2012) oder Systeme mit *split*-GFP (Cabantous und Waldo 2006), in denen nur eine kleine Untereinheit der GFP-Sequenz im Parasiten verbleibt, etabliert. Erst in Verbindung mit dem fehlenden Rest der GFP-Sequenz in Wirtszellen konnte die Interaktion von parasitären Exosomen in Wirtszellen durch die GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden (Twu et al. 2013).

Für die Fluoreszenz von GFP wird molekularer Sauerstoff benötigt (s. Kap. 3.4). Daher sollte der Effekt von Sauerstoff auf das Wachstum von *T. vaginalis* bestimmt werden. Bei einer Begasung einer Inkubationskammer mit 5% CO₂ beträgt der Sauerstoffanteil in der Kammer etwa 16%. Dies ist im Vergleich zum Sauerstoffanteil der normalen Atmosphäre (21% und letal für *T. vaginalis*: Daten nicht gezeigt) erniedrigt, jedoch im Gegensatz zu der anaeroben Kultivierung in geschlossenen Kulturröhrchen

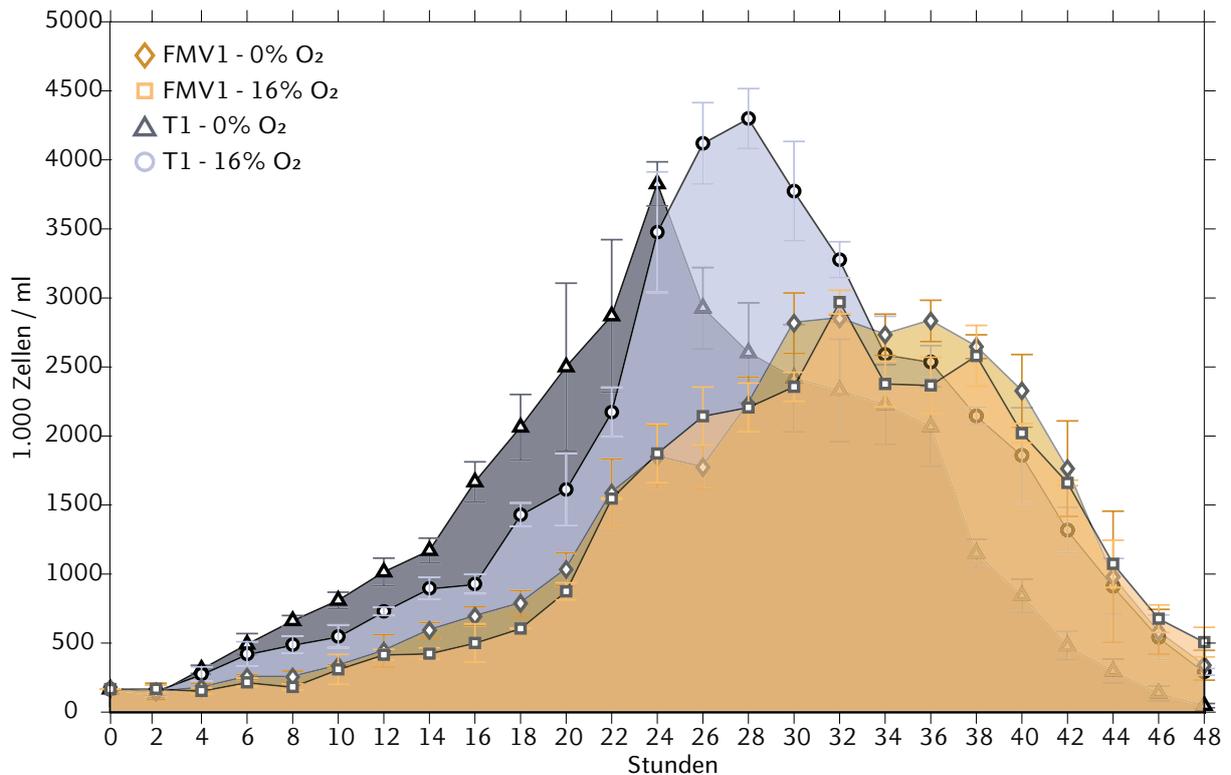


Abbildung 5.15 Vergleich der Wachstumsraten von *T. vaginalis* Stamm FMV1 (brauner Graph) und T1 (blauer Graph) unter anaeroben (0% O₂, FMV1 = Raute; T1 = Dreieck) und aeroben (16% O₂, FMV1 = Viereck; T1 = Kreis) Bedingungen bei 37°C über 48 Stunden. Es wurden biologische Triplikate gezählt und die Standardabweichung ist als Balken an den Messpunkten indiziert. Zu Beginn wurden 12 ml TYM Medium mit 2x10⁶ Zellen inokuliert und anschließend alle zwei Stunden die Zellzahl bestimmt. Es besteht kein deutlicher Unterschied zwischen anaerob und der Kultivierung bei 16% O₂.

(nahezu 0%) erhöht. Die beiden wildtypischen *T. vaginalis* Stämme T1 (blaue Graphen) und FMV1 (braune Graphen) wurden in An- (aerob) und Abwesenheit (anaerob) von 16% Sauerstoff untersucht (s. Abb. 5.15). Die Zellen der Kulturen wurden in biologischen Triplikaten im 2-Stunden-Takt über 48 Stunden kontinuierlich gezählt. Die Standardabweichung ist in Fehlerbalken angezeigt. Der Stamm FMV1 wächst stetig an und erreicht sein exponentielles Wachstum nach ca. 20 Stunden. Die Saturation mit knapp 3.000 lebenden Zellen pro ml tritt nach etwa 30 Stunden ein und ein Rückgang derer konnte nach 38 Stunden beobachtet werden. Dabei ist kein signifikanter Unterschied zwischen anaerob und aerober Kultivierung erkennbar. Das Wachstum des Stammes T1 erreicht das exponentielle Wachstum bereits nach etwa 16 Stunden und steigt auf ca. 4.000 lebende Zellen pro ml nach 24 Stunden (Saturation). Das Absterben der Zellkultur setzt nach 30 Stunden an. Zwischen anaerob und aerober Kultivierung ist ein versetztes Erreichen der Amplitude zu observieren. Somit ist ein Rückschluss über eine verlangsamte Wachstumsrate möglich, doch hat Sauerstoff keinen Einfluss auf die Zellkulturichte. Der

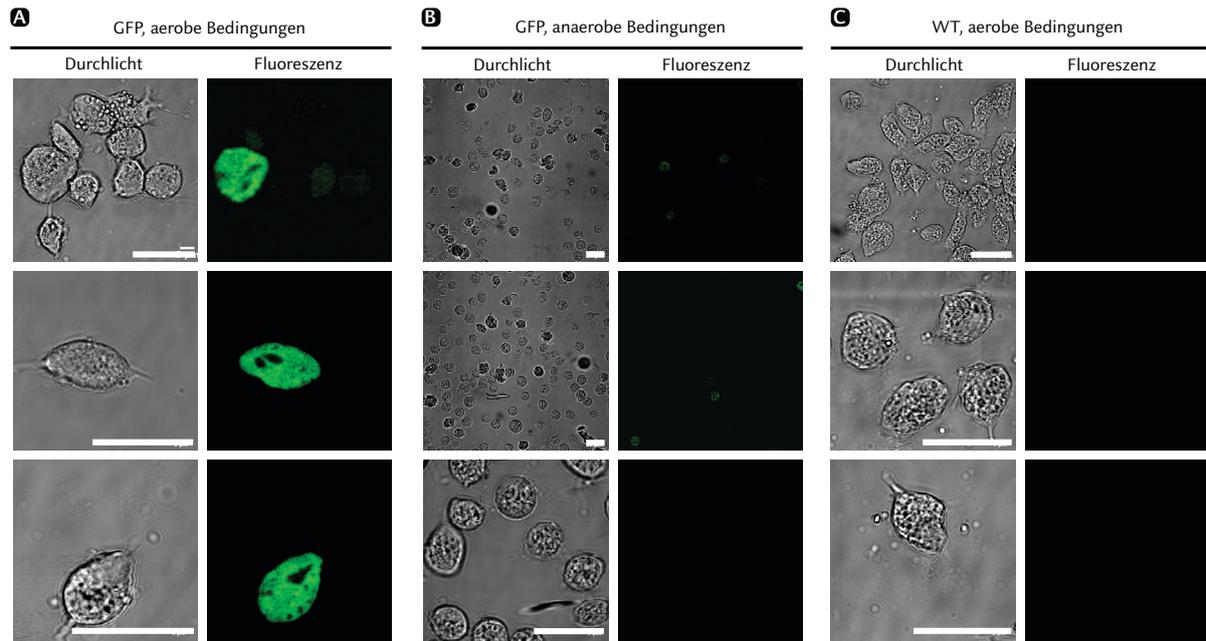


Abbildung 5.16 Lebendzellaufnahmen von *T. vaginalis* Stamm T1 als Kontrollen der GFP-Fluoreszenz. A) zeigt transfizierte Trichomonaden mit dem Leervektor pTv_GFP unter aeroben Bedingungen (16% O₂). GFP leuchtet, obgleich nicht in allen Zellen, und lokalisiert im Cytosol. Unter anaeroben Bedingungen (B) ist eine mäßige bis keine GFP-Fluoreszenz sichtbar. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde der Wildtyp unter aeroben Bedingungen wie in A) observiert und zeigt keine Fluoreszenz. Bilder teilweise aus (Aschenbroich 2012). Skalierungsbalken: 10 µm.

Sauerstoff, der für die aktive Form von GFP nötig ist, ist für *T. vaginalis* in einer Konzentration von 16% also unproblematisch. Die GFP-Sequenz in dem Expressionsvektor pTv_GFP ist für den Organismus codon-optimiert nach (Meade et al. 1997). Die Expression von cytosolischem GFP wurde mittels Transfektion von *T. vaginalis* T1 mit dem Leervektor pTv_GFP überprüft (Aschenbroich 2012). Die Immunodetektion (s. Abb. 7.4) zeigt eine distinkte Bande bei etwa 27 kDa. Die GFP-exprimierende Kultur wurde anschließend am Fluoreszenzmikroskop unter verschiedenen Bedingungen observiert (s. Abb. 5.16). Unter aeroben Bedingungen (Umwelt-Atmosphäre, 21% Sauerstoff) zeigen *T. vaginalis* T1 Zellen eine cytosolische GFP-Fluoreszenz (s. Abb. 5.16A). Im ersten Bild wird deutlich, dass die Fluoreszenz in einigen Zellen abgeschwächt bzw. nicht vorhanden ist. Bei einer Auswertung von 200 observierten *T. vaginalis* Zellen wiesen 37% der Zellen eine GFP-Fluoreszenz auf (Daten nicht gezeigt). Unter anaeroben Bedingungen wurde bei gleicher Anregung der Fluorophore eine erheblich geringere Anzahl an fluoreszierenden Zellen beobachtet (s. Abb. 5.16B). Als zusätzliche Negativkontrolle diente der T1 Wildtyp um eine putative Autofluoreszenz auszuschließen. Unter aeroben Bedingungen konnte erneut keine Fluoreszenz detektiert werden (s. Abb. 5.16C).

5.5 Centrin lokalisiert an der undulierenden Membran in *T. vaginalis*

Centrin als ein mit Tubulin-Strukturen interagierendes Protein spielt eine wichtige Rolle in Centrosomen und Flagellen (s. Kap. 3.1.1). Für *T. vaginalis* wurde das Protein mittels Antikörper am Basalkörper und an der undulierenden Membran lokalisiert (Bruggerolle et al. 2000). Mit der Sequenzierung des Genoms (Carlton et al. 2007) und vielfältiger Analysen, wie Transkriptome unter verschiedenen Bedingungen (Gould et al. 2013), ist eine tiefgreifendere Untersuchung von Centrin Homologen in *T. vaginalis* möglich. Ferner kann somit die Rolle von Centrin im Zytoskelett des Parasiten näher bestimmt werden.

T. vaginalis codiert acht Centrin Homologe (s. Tab. 5.4), welche eine ähnliche molekulare Masse und eine Sequenzidentität von etwa 20–40% aufweisen (s. Tab. 7.3).

Tabelle 5.4 Acht Centrin Homologe in *Trichomonas vaginalis*, aufgezeigt mit ihrer molekularen Masse nach TrichDB.

Name	TVAG Nummer	Mol. Masse	Name	TVAG Nummer	Mol. Masse
TvCEN1	TVAG_497930	17,9 kDa	TvCEN5	TVAG_119000	19,5 kDa
TvCEN2	TVAG_009160	19,1 kDa	TvCEN6	TVAG_291570	16,7 kDa
TvCEN3	TVAG_320970	18,7 kDa	TvCEN7	TVAG_482420	17,2 kDa
TvCEN4	TVAG_120190	18,3 kDa	TvCEN8	TVAG_335140	17,4 kDa

Centrin Proteine gehören der EF-Hand-Überfamilie an und weisen vier EF-Hand Domänen als Calcium-bindende Stellen auf (Salisbury 1995). Alle *Trichomonas vaginalis* Centrine weisen ebenfalls diese vier Domänen auf. Ungewöhnlich ist dabei die relativ hohe Anzahl an Kopien dieses Gens, verglichen zu seinem Wirt *Homo sapiens* mit drei Centrin Genen (*National Center for Biotechnology Information* (NCBI), GenBank – CETN1, ID: 1068; CETN2, ID: 1069 und CETN3, ID: 1070). Eine Transkriptomanalyse von *T. vaginalis* sollte Aufschluss über die Expression aller Kopien geben (Abb. 5.17). In diesem Balkendiagramm wird deutlich, dass die acht Centrin-Homologe unterschiedliche Expressionswerte aufweisen. Als Basis diente dabei eine Datenbank an ESTs, erstellt aus Sauerstoff-adaptierten *T. vaginalis* Zellen bei 16% Sauerstoff (Ad0), welche auf vaginale Epithelzellen gegeben wurden (AdOxInf). Die RNA wurde in diesen Ansätzen jeweils nach 5, 30 und 120 min isoliert (Gould et al. 2013). Die Werte repräsentieren indirekt

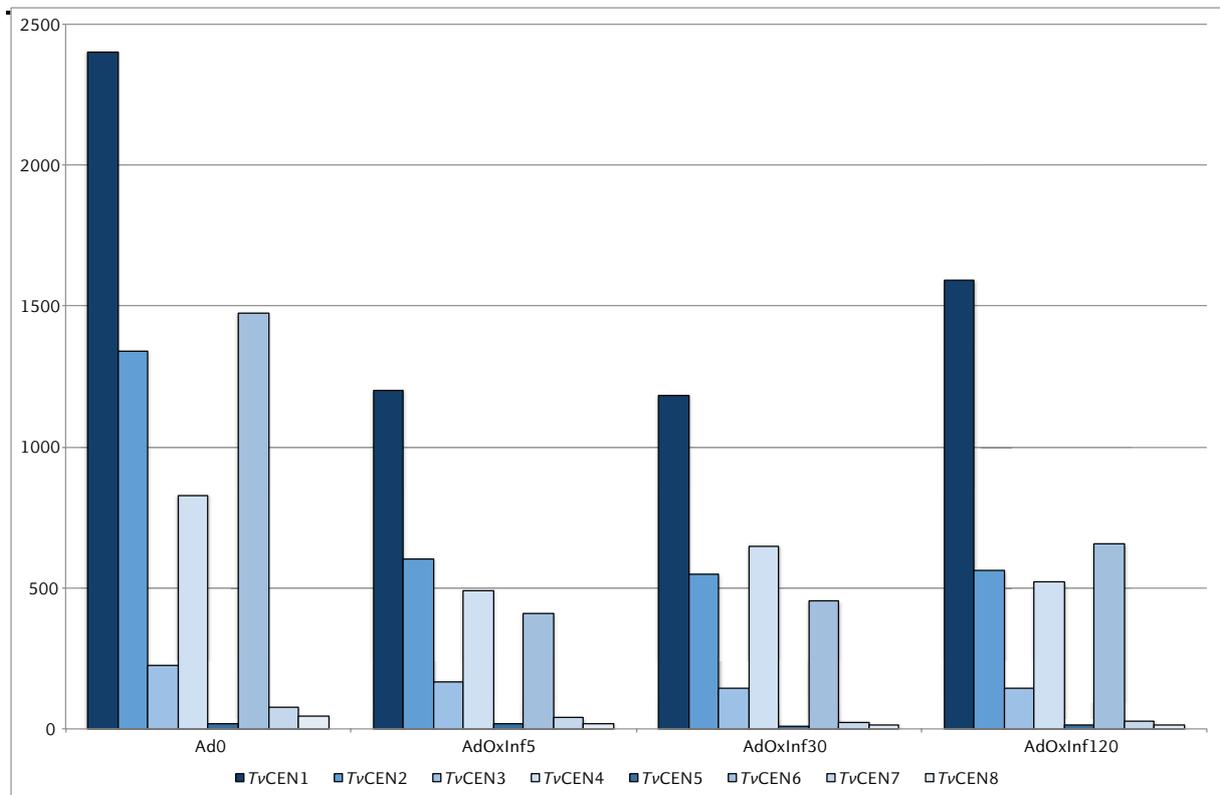


Abbildung 5.17 Vergleich der Expressionswerte von acht Centrin Homologen in *Trichomonas vaginalis* T016. Die y-Achse zeigt eine willkürliche Einheit (*arbitrary units*, a.u.) und repräsentiert die Anzahl sequenzierter mRNAs in vier Datenbanken. Ad0 = Sauerstoff-adaptierte Zellen, welche auf vaginale Epithelzellen gegeben wurden und nach 5 (AdOxInf5), 30 (AdOxInf30) und 120 min (AdOxInf120) zwecks RNA-Isolierung aufgeschlossen wurden. Die Expressionswerte von TvCEN1, 2, 4 und 6 sind höher, verglichen mit den anderen Kandidaten und zeigen eine geringe Herunterregulierung während der Infektion. Werte nach Gould et al. 2013.

sequenzierte mRNAs, so dass ein Rückschluss auf die Expression des Gens in der Zelle möglich ist. Deutlich wird, dass die Expression aller Centrin Homologe in Relation zu der Referenzprobe Ad0 zuerst herunterreguliert wird, im Verlauf der Infektion jedoch wieder leicht ansteigt. Dabei fällt die Expression von TvCEN3, 5, 7 und 8 eher gering aus, so dass diese vernachlässigt wurden. Die Analyse im Rahmen dieser Arbeit beschränkt sich somit auf die Gene TvCEN1, 2, 4 und 6. Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit der Homologe bei der Lokalisierung innerhalb der Zelle mittels Immunfluoreszenzaufnahmen wurde auf den artifiziellen Promotor SCS verzichtet. Stattdessen wurde der endogene Promotor der Gene verwendet (s. Kap. 4.8). Da die Promotorregion von Genen in *T. vaginalis* nicht annotiert und teilweise unbekannt ist (Smith und Johnson 2011; Smith et al. 2011), wurde eine 200 bp lange Sequenz im untranslatierten Bereich (*untranslated region*, UTR) in 5'-Richtung des Gens genutzt, um die putative Promotorregion abzudecken. Als Protein-Marker wurde der HA-Tag genutzt. Der *T. vaginalis* Stamm FMV1 wurde mit den Konstrukten TvCEN1::HA, TvCEN2::HA, TvCEN4::HA und TvCEN6::HA transfiziert und

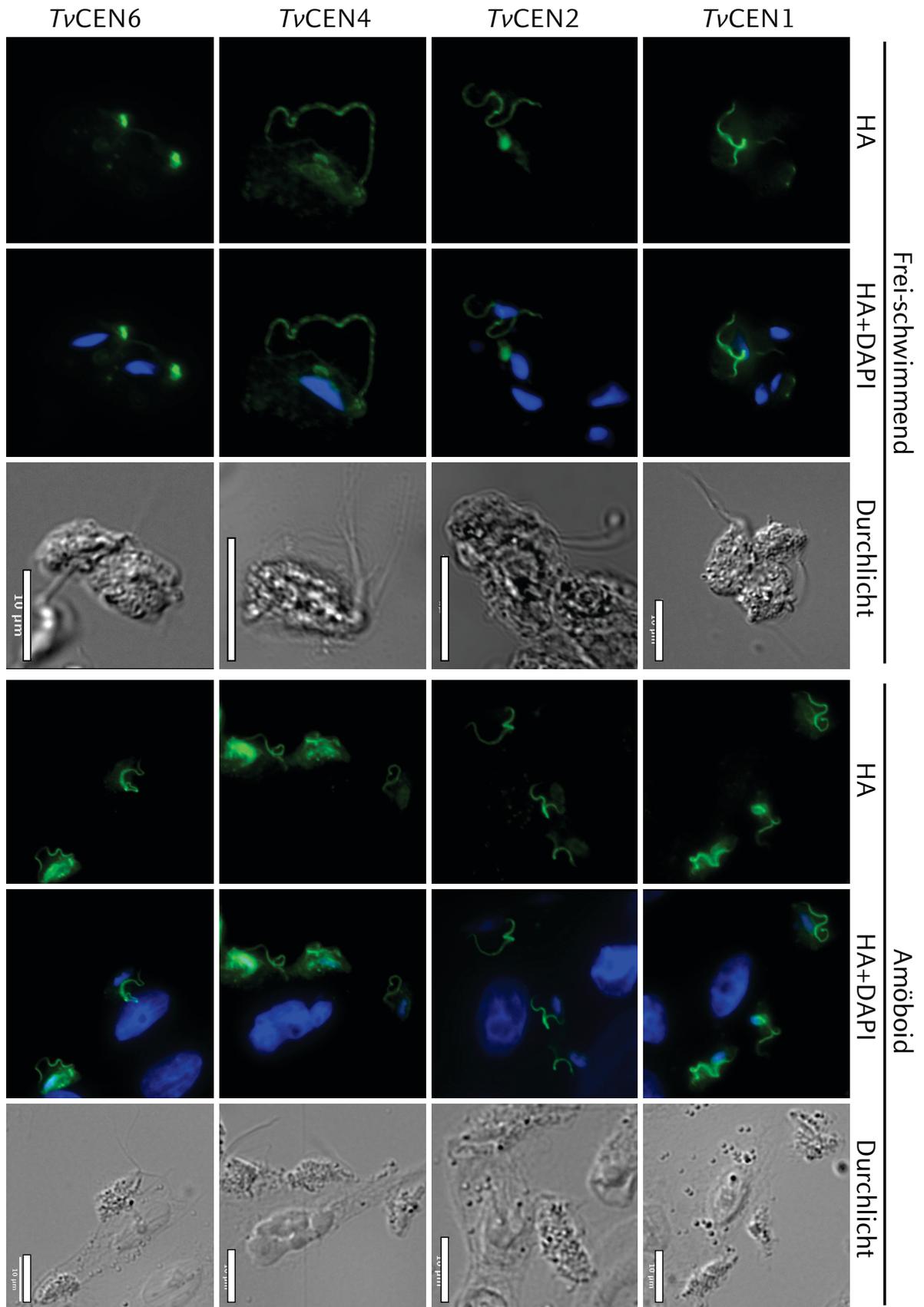


Abbildung 5.18 Immunfluoreszenzaufnahme von TvCEN1, 2, 4 und 6::HA (grüner Kanal) in frei-schwimmenden und amöboiden *T. vaginalis* FMV1 Zellen unter endogenem Promotor. Die Überlagerung mit der DAPI Färbung (blauer Kanal) zeigt die Zellkerne von Parasit- und Wirtszellen. In frei-schwimmenden Zellen lokalisiert TvCEN1::HA mit der undulierenden Membran, ebenfalls wie TvCEN2::HA und TvCEN4::HA. Lediglich TvCEN6::HA ist assoziiert mit dem Atraktophor, zeigte in anderen Zellen jedoch auch eine Lokalisierung mit der undulierenden Membran (nicht gezeigt). Das Muster ändert sich nicht in die amöboiden Form, da die unterschiedlichen Centrin Homologe nach wie vor mit der undulierenden Membran assoziiert sind. Für TvCEN6::HA ist im amöboiden Zustand erneut eine leichte Akkumulation im Atraktophor ersichtlich. Erstantikörper: α -HA (Maus, 1:2000). Zweitantikörper: Alexa fluor 488 α -Maus (1:5000). Skalierungsbalken: 10 μ m.

selektiert. Der Transfektionserfolg wurde mittels Western Blot Analyse überprüft (s. Abb. 7.2B). Durch den HA-Tag ergeben sich für die Kandidaten folgende ungefähre, molekularen Massen: 20 kDa für TvCEN1::HA, 21 kDa für TvCEN2::HA, 20 kDa für TvCEN4::HA und 19 kDa für TvCEN6::HA. Die detektierten Banden in Abb. 7.2B korrelieren mit den Größen – bei TvCEN2::HA ist eine Doppelbande sichtbar.

Die Kulturen wurden anschließend in An- und Abwesenheit von vaginalen Epithelzellen fixiert und immunologisch mit α -HA behandelt (s. Abb. 5.18). Die Lokalisation von allen vier untersuchten Proteinen ist annähernd identisch. Sowohl in frei-schwimmenden als auch in amöboiden Zellen assoziieren die Proteine stets mit der undulierenden Membran und deutlich schwächer am apikalen Ende der Zelle (Atraktophor). Bei TvCEN6::HA erscheint die Akkumulation des Proteins hauptsächlich im Atraktophor in frei-schwimmenden Zellen – das Bild wurde exemplarisch gewählt, da dort vereinzelt diese Lokalisierung auftrat. Weitgehend assoziierte auch hier das Protein mit der undulierenden Membran. Selten konnte eine cytosolische Lokalisierung mit punktuellen Strukturen observiert werden, wie für TvCEN4::HA und TvCEN6::HA (amöboid). Die

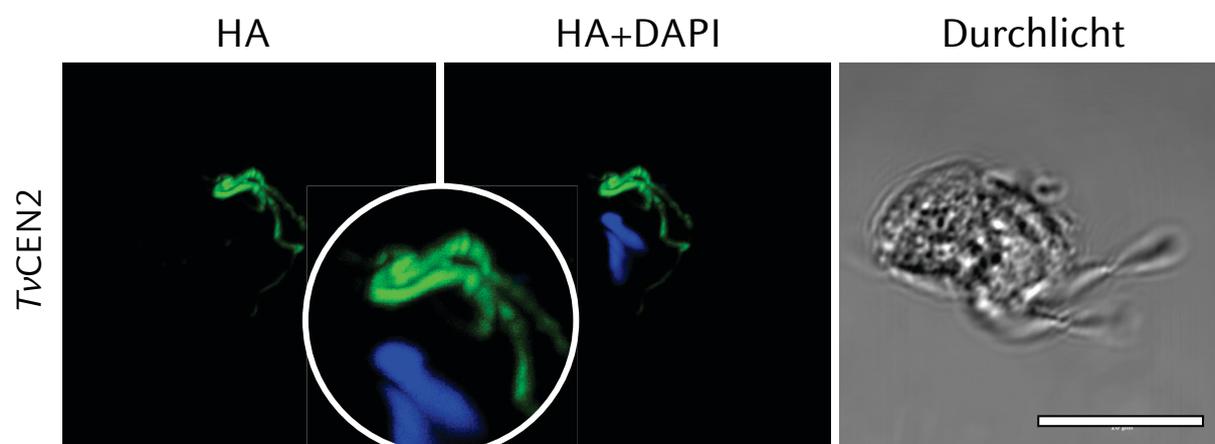


Abbildung 5.19 Immunfluoreszenzaufnahme von einer sich teilenden *T. vaginalis* FMV1 Zelle mit TvCEN2::HA. Das Bild stellt im grünen (HA) und blauen (DAPI) Kanal eine 3D Rekonstruktion eines Z-Stapels der observierten Zelle dar. Es sind deutlich zwei undulierende Membranen zu sehen, zusammen mit zwei Zellkernen (s. Vergrößerung im Kreis). Das Durchlichtbild ist ein Einzelbild aus dem Stapel und stellt daher nur eine Ebene dar. Erstantikörper: α -HA (Maus, 1:2000). Zweitantikörper: α -Maus Alexa fluor 488 (1:5000). Skalierungsbalken: 10 μ m.

Assoziation mit der undulierenden Membran ist sehr spezifisch und lokalisiert nicht in den restlichen vier Flagellen, erkennbar im Durchlichtkanal.

Bei der Observierung fixierter, *TvCEN2::HA* exprimierender *T. vaginalis* Zellen wurde eine sich teilende Zelle observiert (s. Abb. 5.19). Die Probe wurde in einem Z-Stapel observiert und anschließend als 3D-Bild rekonstruiert. Auch hier assoziiert das Protein mit der undulierenden Membran, welche in zweifacher Ausführung im grünen Fluoreszenzkanal zu sehen ist (s. Vergrößerung im Kreis). Der DAPI Kanal zeigt zwei bereits getrennte Zellkerne. Im Durchlicht handelt es sich um ein Einzelbild aus dem Stapel, das wegen der limitierten Ebene unscharfe Strukturen aufweist.

5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Protist *T. vaginalis* besitzt Gene für sowohl Aktin- als auch Tubulin-assoziierte Gene. Bei der Umwandlung zur amöboiden Gestalt greift die Aktin-Maschinerie ein – bewiesen durch quantitative Western Blot Analyse und Lokalisierung des am stärksten exprimierten Aktin-Derivats. Putative Interaktionspartner von Aktinfilamenten sollten identifiziert werden, von denen eines *TvFIM1* ist. Es wurde in *in vitro* Experimenten gezeigt, dass *TvFIM1* eine verstärkte Aktin-Polymerisierung als auch das parallele und anti-parallele Bündeln von Aktinfilamenten bewirkt. Während der amöboiden Bewegung und der Phagozytose von Hefe ko-lokalisiert *TvFIM1* mit Aktin innerhalb der Zelle. Eine dynamische Lokalisation von *TvFIM1* an der Zell-Peripherie und in Cluster konnte mithilfe von GFP als Lebendzell-Marker gezeigt werden. Sauerstoff, welcher für GFP benötigt wird, beeinflusst die Wachstumsrate des anaeroben Parasiten bei einer Konzentration von 16% nicht, so dass GFP als Marker genutzt werden kann. Jedoch ist die Ausbeute an fluoreszenten Zellen mit 37% in einer transfizierten Kultur eher gering. Auf transkriptioneller Ebene ist nur *TvFim1* aktiv (nicht aber *TvFim2*), welches im Verlauf der amöboiden Umwandlung nicht hoch- oder herunterreguliert, sondern gleichbleibend transkribiert wird. Der Versuch eines Knockdowns basierend auf RNAi blieb erfolglos. Als u. a. Tubulin-assoziiertes Protein wurden acht Centrin-Homologe in *T. vaginalis* analysiert. Sie lokalisieren stets in der undulierenden Membran und im Atraktophor des Protisten –

sowohl im frei-schwimmenden als auch amöboiden Stadium. Auch bei der Zellteilung ändert sich die Lokalisierung nicht und stellt somit eine differente Funktion von klassischen Centrin Proteinen dar.

6 Diskussion

6.1 Das Zytoskelett von *Trichomonas vaginalis* während der Infektion von Wirtszellen

Das Zytoskelett der Organismen innerhalb der Trichomonadida wurde bereits detailliert untersucht (s. Kap. 3.2, Brugerolle 1991, Brugerolle et al. 1996). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Observierungen des Zytoskeletts des Parasiten *T. vaginalis* geben einen Einblick in die rapide Umformung in seine amöboide Form. Innerhalb der Ordnung Trichomonadida gibt es nur wenige Vertreter, die ebenfalls auf diese Fähigkeit zurückgreifen können: i) *Dientamoeba fragilis* – ein parasitärer Organismus im Magen-Darm-Trakt von Mensch, Schwein und Gorilla. Dabei ist anzumerken, dass sowohl im amöboiden als auch frei-schwimmenden Stadium keine Flagellen vorhanden sind (Windsor und Johnson 1999). ii) *Gigantomonas herculea* – ein Parasit im Dickdarm von Termiten (Brugerolle 2005). Beide Protisten gehören zur Familie der Monocercomonadidae. Innerhalb der Familie der Trichomonadidae ist die amöboide Umformung in bisherigen Publikationen ein Alleinmerkmal von *T. vaginalis* und *T. gallinae* (Mesa et al. 1961).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Grad der amöboiden Umwandlung unter den Stämmen T1, T016 und FMV1 sehr variiert (s. Abb. 5.1). Unterstützt wird diese Beobachtung durch eine Untersuchung von 26 verschiedenen *T. vaginalis* Stämmen und ihre divers ausgeprägte cytotoxische Wirkung auf Wirtszellen (Lustig et al. 2013). Der Grad der amöboiden Umwandlung ist sowohl an die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen gekoppelt (s. Tab. 5.1), was durch eine *in silico* Simulation bestätigt wurde (Lim et al. 2013), als auch an die Cytotoxizität gegenüber den Wirtszellen. Da die amöboide Form der Oberflächenmaximierung zur Substrataufnahme dient (Arroyo et al. 1993), verbleiben abgeflachte Zellen eher stationär, statt sich zu bewegen.

Die Motilitätsanalyse des *T. vaginalis* Stamms T016 (s. Abb. 5.2) zeigt eine sehr dynamische Bewegung auf Wirtszellen. Der Parasit nutzt seine Flagellen in abtastenden Bewegungen (s. Abb. 5.2, Flagellen Sensor) und wurde bereits zuvor observiert (Casta e Silva Filho et al. 1988). Eine mögliche sensorische Funktion wird durch die Erkenntnisse über Tetraspanin (*TvTSP6*) gestützt, welches in den Flagellen lokalisiert und dort der sensorischen Rezeption dient (de Miguel et al. 2012). Das bisher prokaryotische Paradigma des *Quorum sensing* dient der Messung der Zelldichte einer Population mittels chemischer Kommunikation und steht eng in Bezug zu der Motilität von Flagellen (Zan et al. 2013). Eine mögliche Adaptation dieser Fähigkeit in Eukaryoten wurde postuliert (Sprague und Winans 2006) und bleibt für *T. vaginalis* zu investigieren. Zusätzlich nutzt *T. vaginalis* seine Flagellen klassisch zur schwimmenden Fortbewegung, die aktiv an der Zellteilung beteiligt sind (s. Abb. 5.2, Teilung), ähnlich dem Mechanismus in *Trypanosoma brucei* (Ralston et al. 2006). Dort konnte bei Knockdown-Kulturen von essentiellen Genen der Flagellen eine fehlgeschlagene Zellteilung observiert werden. Juggernauts (riesig im Vergleich zu frei-schwimmenden *T. vaginalis* Zellen mit mehreren Zellkernen, s. Abb. 5.2 Juggernauting und Abb. 7.3K) entstehen durch die Teilung der Zellkerne und Flagellenapparate, ohne eine Cytokinese zu vollziehen (Brugerolle et al. 1996).

In der amöboiden Phase bildet der Parasit Pseudopodien aus (s. Abb. 5.2, Pseudopodien), welche ein hauptsächlich Aktin-gesteuertes Merkmal ist (Lammermann und Sixt 2009). Die Heatmap-Analyse zeigt, dass Aktin und die wichtigsten Aktin-regulierenden Proteine von *T. vaginalis* codiert sind (s. Abb. 5.3). Die genaue Anzahl an Aktin-Derivaten im Protisten wurde auf 12 determiniert, zusammen mit 11 Homologen der Aktin-Familie (Elmendorf et al. 2010). Laut TrichDB gibt es insgesamt 29 Genkopien der Aktin-Familie, von denen 24 exprimiert werden (Aurrecochea et al. 2009; Gould et al. 2013). Die Diversität der Sequenz innerhalb der Aktin-Homologe ist spezifisch genug, um PCR-gestützte Bestimmungen unterschiedlicher Stämme durchzuführen (Crucitti et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Korrelation des Aktin-Netzwerks und der amöboiden Gestalt, da mehr Aktin vorhanden ist (s. Abb. 5.4) und innerhalb der Zelle in fibrösen Strukturen lokalisiert (s. Abb. 5.5). Die Erhöhung des Aktingehalts in der amöboiden Form ist in der Immunfluoreszenzaufnahme nicht erkennbar, da es sich um

HA-getaggetes Aktin handelt (*TvAKT1::HA*), welches unter dem SCS-Promotor exprimiert wird. Eine netzartige Struktur der Aktinfilamente in amöboiden *T. vaginalis* Zellen wurde bereits immunhistochemisch nachgewiesen (Chen et al. 2004). Die Parasiten der Gruppe Apicomplexa *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum* besitzen ebenfalls die Fähigkeit der amöboiden Umwandlung (s. Kap. 5.2), bei der das amöboide Gleiten (sogenannt: *glideosome*) auf Aktinfilamente zurückgreift (Santos et al. 2009; Skillman et al. 2011).

Aktin-interagierende Proteine in *T. vaginalis*, die an der amöboiden Morphogenese beteiligt sind, wurden bisher begrenzt charakterisiert. Coronin gehört zu solchen Proteinen und wurde erstmals in *Dictyostelium discoideum* charakterisiert (de Hostos et al. 1991). Dort assoziiert das Protein mit Aktinfilamenten und in Knockout-Kulturen wurde eine verlangsamte, amöboide Fortbewegung der Zellen festgestellt (de Hostos et al. 1993) und die Phagozytose deprimiert (Maniak et al. 1995). Für *T. vaginalis* wurde dem Protein eine ebenfalls wichtige Rolle in der Reorganisation des Aktinfilament-Netzwerks zugeschrieben, da es an der Zellperipherie amöboider Zellen lokalisierte (Bricheux et al. 2000). In anderen eukaryotischen Systemen sind Aktin-regulierende Proteine an vielen Bewegungsprozessen innerhalb und von der Zelle beteiligt (dos Remedios et al. 2003; Eichinger et al. 1999; Golsteyn et al. 1997; Xue et al. 2010). *T. vaginalis* codiert die meisten dieser Proteine (s. Abb. 5.3), was für eine gemeinschaftliche Aktivität mehrerer Proteine spricht, um Änderungen der Zellmorphologie zu bewerkstelligen. Weitere Aktin-regulierende Proteine in *T. vaginalis* sind α -Aktinin (Addis et al. 1998; Bricheux et al. 1998), welches zusätzlich als Transkriptionsfaktor fungieren soll (Calla-Choque et al. 2014) und eine Untereinheit des Arp2/3-Komplexes, dessen Expression durch die Eisenkonzentration reguliert wird (Horvathova et al. 2012). Auch Profilin wurde als Aktin-bindendes Protein in *T. vaginalis* untersucht (Runde 2013). Durch die Bindung an Aktin-Monomeren, kann das Protein die Konzentration an freien Aktin-Monomeren regulieren und verbessert zusätzlich die *Treadmilling*-Rate (Didry et al. 1998; Witke 2004). In amöboiden *T. vaginalis* Zellen lokalisiert das Protein cytosolisch mit Aktin in leichten Akkumulationen an der Zellperipherie (Runde 2013). Mit den Ergebnissen über *TvFIM1* lässt sich ein weiteres Aktin-interagierendes Protein in *T. vaginalis* klassifizieren (s. Kap. 5.2).

Der Versuch, weitere Aktin-bindende und -regulierende Proteine zu identifizieren, wurde mittels Co-Immunopräzipitation realisiert (s. Abb. 5.6). Dabei zeigte sich, dass eine Co-Immunopräzipitation über einen HA-Tag weitaus spezifischer als über den kommerziellen Aktin-Antikörper ist und zusätzlich die Analyse von Interaktionspartnern zulässt, sichtbar an den Coomassie-gefärbten Banden, welche nicht in der Höhe von 42 kDa liegen (s. Abb. 5.6B). Bei der Affinitätschromatographie über den endogenen Aktin-Antikörper (s. Abb. 5.6A) wurden einige Banden zusammen mit einem leichten Hintergrund Coomassie-gefärbt. Dies spricht für eine unspezifische Bindung von Proteinkomplexen. Durch die Zellyse sind Proteine, die zuvor in diskreten, zellulären Kompartimenten separiert sind, nun gemischt, was zu einer nicht-physiologischen Bindung zum Zielkomplex führen kann – insbesondere bei einem solch abundanten Protein wie Aktin (Phizicky und Fields 1995).

Der Ansatz der Massenspektrometrie diente als erster Schritt zur Charakterisierung der Interaktionspartner von Aktin. Es wurden für alle drei Ansätze insgesamt 54 Proteine identifiziert, von denen 33 Proteine putative Interaktionspartner von Aktin sein könnten. Die BLAST-Analyse ergab, dass die meisten der 33 Proteine Aktin- oder im weiteren Sinne Zytoskelett-assoziiert sind. Neben Aktin-bindenden Proteinen, wie Fimbrin, Coronin und α -Aktinin konnten übergreifende Proteinklassen identifiziert werden, die mit allen drei Filamentarten des Zytoskeletts interagieren. So gehören Synaptotagmin – ein Membranprotein, welches bei der Exozytose involviert ist – und Spectraplaklin sowie FERM Proteine zu eben dieser Proteinklasse (Bosanquet et al. 2014; Brown 2008; Rao et al. 2014; Suozzi et al. 2012). Weiterhin wurden Homologe von Hitzeschockproteinen identifiziert, die eine Aktin-ähnliche ATPase Domäne aufweisen. Solche Hitzeschockproteine wurden bereits in Nierenzellen von Ratten mit dem Zytoskelett assoziiert (Bidmon et al. 2002). Ankyrine, die mit Membranproteinen interagieren und deren Position bestimmen, wurden ebenfalls sequenziert (Ishida et al. 2014; Ni et al. 2013). Zusätzlich wurden Proteine im amöboiden Ansatz identifiziert, die Cadherin (Adhäsionsprotein) und ein Protein, das mit der Zellwandoberfläche assoziiert ist, beinhalten (Hirata et al. 2014). Dies erscheint plausibel, da *T. vaginalis* sich während der amöboiden Umwandlung an Wirtszellen anhaftet und somit das Aktin-Netzwerk

ausweitet. Im Gegenzug sind die identifizierten Proteine der HA-Kontrolle sehr gering ausgefallen, was auch mit der geladenen Proteinmenge korreliert (s. Abb. 5.7). Bei der HA-Kontrolle handelt es sich um ein Clathrin-Homolog aus *T. vaginalis*, welches auch mittels MALDI-TOF sequenziert wurde (s. Tab. 5.2) – sowohl in der HA-Kontrolle als auch im Aktin-Ansatz (frei-schwimmend). Clathrin ist verantwortlich für die Bildung endozytotischer Vesikel und interagiert dabei ebenfalls mit Aktin (Grassart et al. 2014).

Bisher wurden keine Motorproteine für Aktinfilamente in *T. vaginalis* entdeckt. Dennoch sind 69 Myosin- oder Myosin-ähnliche Proteine in TrichDB annotiert, die bei einer BLAST-Analyse eine sehr geringe Homologie zu bekannten Myosin-Proteinen zeigen. Der evolutionär verwandte Organismus *Giardia lamblia* greift auf noch weniger Aktin-bindende Proteine zurück (s. Abb. 5.3) und ihm fehlen ebenfalls codierende Gene für Myosin-ähnliche Motorproteine (Paredes et al. 2011). Ein alternatives Set an neuartigen Zytoskelett-Genen wurde bereits für basale Protisten der Excavata postuliert und ist aufgrund der zahlreichen unbekannt, hypothetischen Gene innerhalb der Organismen möglich (Dawson und Paredes 2013). Durch eine ähnliche Herangehensweise wurden für *G. lamblia* über 80 Aktin-interagierende Proteine identifiziert, von denen einige eine Homologie zu bekannten Interaktionspartnern von Aktin aufweisen. Sieben dieser Proteine wurden lokalisiert und könnten ein unabdingbares Set an Aktin-regulierenden Proteinen als ursprünglichste Form des Aktin-Zytoskeletts repräsentieren (Paredes et al. 2014).

Myosin als einzig bekanntes Motorprotein für Aktinfilamente besteht im Allgemeinen aus einer schweren (ca. 220 kDa) und unterschiedlich vielen leichten Ketten (ca. 20 kDa). Dabei weist die schwere Kette stets eine konservierte Kopfdomäne aus, welche die katalytische ATPase-Eigenschaft aufweist (Sweeney und Houdusse 2010b). Insbesondere in Protisten der Apicomplexa wurden Myosin-Sequenzen verglichen und evaluiert (Foth et al. 2006). Zahlreiche Studien über das Zusammenspiel von Myosin und Aktin bestätigen die Relevanz des Proteins: So wurde eine Interaktion von α -Aktinin, Fimbrin und Myosin II zur Organisation der Aktomyosin-Bündel während des Aufbaus des kontraktiven Rings bei der Zellteilung in Hefe festgestellt (Laporte et al. 2012). Der Hebelarm der Myosin-Klassen V und VI ist verantwortlich für die kollektive Bewegung des

Aktinfilament-Netzwerks in Keratozyten (Hariadi et al. 2014) und anhand der Architektur von Aktinfilament-Netzwerken kann die Art und Aktivität von Myosin-Proteinen determiniert werden (Reymann et al. 2012). In *T. gondii* dient Myosin der Motilität während des amöboiden Gleitens, ist dabei jedoch nicht essentiell (Egarter et al. 2014; Meissner et al. 2002). Schließlich spielt das Motorprotein ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Umwandlung von der amöboiden zur flagellierten Form von *Naegleria gruberi* in Zusammenspiel mit Mikrotubuli (Walsh 2007). Die Abwesenheit solcher Motorproteine in *T. vaginalis* scheint unwahrscheinlich, jedoch haben Eukaryoten zur Steuerung des Aktinfilament-Netzwerks alternative Mechanismen mittels Mikrotubuli-Enden entwickelt (Basu und Chang 2007). Es wird angenommen, dass Myosin von dem Mikrotubuli-Motor Kinesin abstammt (Lowe und Amos 2009). Kinesin ist in *T. vaginalis* wiederum sehr abundant vorhanden (Carlton et al. 2007). So könnte *T. vaginalis* aufgrund seiner evolutiven Ursprünglichkeit als eine Art Interim-Organismus angesehen werden in dem Myosin-Proteine noch nicht in dem Stadium vorhanden sind, wie in weiter entwickelten Eukaryoten. Ein horizontaler Gentransfer von Prokaryoten wurde für *T. vaginalis* zahlreich identifiziert, was aufgrund der Phagozytose von Prokaryoten zurückzuführen wäre. Jene beinhalten jedoch eher metabolische Proteine (Alsmark et al. 2009; Alsmark et al. 2013).

6.2 Die Rolle von TvFIM1 im Aktin-basierten Zytoskelett

Mit der Charakterisierung der Fimbrin Proteinfamilie und der Lebendzell-Observierung von *Trichomonas vaginalis* wurden detaillierte Hinweise über die amöboide Morphogenese des Parasiten erbracht. Die Umwandlung von frei-schwimmenden zu amöboiden Zellen ist unter Protisten nicht weit verbreitet. *Naegleria gruberi*, ein aerober Protist aus der Gruppe der Excavata, besitzt im Gegensatz zu *T. vaginalis* im amöboiden Zustand keine Tubulin-basierten Strukturen, wie Flagellen, und muss diese bei Umwandlung zur frei-schwimmenden Zelle neu synthetisieren (Fritz-Laylin et al. 2010a; Fritz-Laylin et al. 2011). Daher dauert die Umwandlung über eine Stunde an, während sich *T. vaginalis* innerhalb weniger Minuten vollständig umwandeln kann. Die Ergebnisse über TvFIM1 sprechen für Beute-induzierte Komponenten, die jederzeit abrufbar sind, sobald die Umwandlung des

Cytoskeletts bevorsteht. Entsprechend zeigt die in einem Gradient verlaufende Lokalisation des Proteins an der Zellperipherie (Abb. 5.10A) von frei-schwimmenden Zellen eine Art Vorbereitung auf die Neuordnung des Aktin-Netzwerks. Diese Hypothese wird gestützt durch die gleich bleibende Transkription des *TvFim1* Gens während der Morphogenese im Vergleich zu dem 40S ribosomalen Protein S5, welches hochreguliert wird (Abb. 5.13B). Ein Homolog des Aktin-bindenden Proteins α -Aktinin wurde im Gegensatz dazu in einer semi-quantitativen Expressionsanalyse während der Infektion von *T. vaginalis* als hochreguliert determiniert (Noël et al. 2010). Gen-spezifische Untersuchungen auf Transkriptionsebene sind jedoch durch die zahlreichen, duplizierten Homologe im expandierten Genom erschwert (Cui et al. 2007).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Heatmap-Analyse zeigt die Existenz von zwei Genen der Aktin-bündelnden Fimbrin-Familie in *Trichomonas vaginalis* (TVAG_351310 und TVAG_116370). Bei *TvFim2* handelt es sich höchstwahrscheinlich um ein Pseudogen, da es eine am 5'-Ende verkürzte Kopie von *TvFim1* ist. Fimbrin Proteine bestehen aus einer N-terminalen EF-Hand (Kretsinger 1976) und vier Calponin Homologie Domänen (Korenbaum und Rivero 2002). Diese Motive gelten für *TvFIM1*, nicht jedoch für *TvFIM2*, da die EF-Hand fehlt, welche das regulatorische Modul der Fimbrine darstellt. Mit dem Verlust dieses Moduls während oder nach dem Genduplikations-Ereignis ging wahrscheinlich auch die Funktion des Proteins verloren. Diese These wird unterstützt durch den fehlenden Nachweis der Transkription des Gens (s. Abb. 5.13A) und der fehlenden Detektion auf Proteinebene via Western Blot (s. Abb. 7.4B). Der von der Firma Eurogentec synthetisierte Antikörper gegen *TvFIM1* bindet an das Epitop CRKFVGPREIVKGNQR, welches innerhalb der zweiten Calponin-Domäne liegt (s. Abb. 5.7B) und somit auch *TvFIM2* bei entsprechender Expression detektieren sollte. Das Epitop von *TvFIM2* unterscheidet sich lediglich um eine Aminosäure an Position 185, was jedoch keine Auswirkungen auf die Bindung des Antikörpers sein sollte (Heide 1967).

TvFIM1 bindet an Aktin (s. Tab. 5.3), erhöht die Polymerisierungsrate von Aktin-Monomeren aus *Acanthamoeba* zu Aktinfilamenten und bündelt solche, bestehend aus Kaninchen-Aktin (s. Abb. 5.9). Die Filamente werden dabei sowohl parallel als auch anti-parallel gebündelt – ein favorisierter Trend wurde nicht observiert. Proteine der Fimbrin-

Familie wurden in den letzten Jahren in zahlreichen Organismen charakterisiert, während Untersuchungen an dem humanen L-Plastin verstärkt aufzufinden sind (Deady et al. 2014; Morley 2013; Serrano-Pertierra et al. 2014). Dieses Protein wurde in T-Lymphozyten lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle in Aktin-basierenden Vorgängen, wie die Aktivierung und Motilität der Zellen, das Bilden von Lipidflößen (*lipid rafts*) in der Zellmembran oder die Rekrutierung von Alveolarmakrophagen (Serrano-Pertierra et al. 2014). Weiterhin wurden Fimbrin-Homologe in *Fusarium graminearum* und *Arabidopsis thaliana* identifiziert, bei denen die Proteine die Umformung des Aktinfilament-Netzwerkes im Zytoskelett als Funktion zugeschrieben werden (Matouskova et al. 2014; Zheng et al. 2014). Fimbrin gilt im Gegensatz zum ARP-Komplex oder Formin nicht als vorrangiges Protein der Aktin-Polymerisierung (Butler und Cooper 2009) und hat ähnliche Eigenschaft, wie das Aktinfilament-bündelnde Protein Fascin (Jansen et al. 2011).

Die Ergebnisse über *TvFIM1* erschließen nicht die genaue Potenz des Proteins, die Aktin-Polymerisierung zu beschleunigen, jedoch konnte ein falsch-positives Ergebnis ausgeschlossen werden. Dies zeigt die Verteilung der gemessenen Fluoreszenz im Polymerisierungsversuch mit Pyren-Aktin aus Kaninchen (s. Abb. 5.9A). *In vitro* Experimente mit *Trichomonas*-eigenem Aktin sind bisher nicht möglich gewesen, aufgrund der fehlgeschlagenen, heterologen Überexpression des Proteins (Kusdian 2011). In wie weit Fimbrin die Aktin-Polymerisierung verstärkt, ist in der Literatur nicht beschrieben, jedoch wurde in *S. cerevisiae* und *A. thaliana* Fimbrin-Homologen die Funktion der erniedrigten, kritischen Aktin-Konzentration zur Polymerisierung zugewiesen (Cheng et al. 1999; Kovar et al. 2000). *TvFIM1* hatte eine signifikante Erhöhung der Polymerisierungsrate von *Acanthamoeba*-Aktin zur Folge, nicht jedoch für das aus Kaninchen (s. Abb. 5.9A), obwohl Filamente aus diesem Aktin deutlich gebündelt wurden (s. Abb. 5.9C). Auf Aminosäure-Ebene weist *TvFIM1* die gleichen, konservierten Bindestellen für Aktin auf, wie andere eukaryotische Fimbrin-Homologe (s. Abb. 5.8A). Dahingehend kann kein Rückschluss auf die unterschiedliche Wirkung von *TvFIM1* auf Aktin-Monomere aus unterschiedlichen Organismen gezogen werden. Jedoch ist die Annahme möglich, dass Fimbrin in *T. vaginalis* nicht nur Aktinfilamente bündelt, sondern auch eine schwache Verstärkung der Aktin-Polymerisierung bewirkt.

Somit exprimiert *T. vaginalis* ein einziges zur Fimbrin-Familie gehörendes Protein, welches die klassischen Funktionen bereits charakterisierter Fimbrin-Proteine erfüllt und sich während der amöboiden Morphogenese und Phagozytose im Vergleich zu freischwimmenden Zellen re-lokalisiert. Ein Knockout oder Knockdown des Proteins würde erheblich zur Funktionsdeterminierung während der Infektion beitragen. Knockout-Kulturen sind im Fall von *T. vaginalis* mittels homologer Rekombination prinzipiell möglich, jedoch bisher nur in drei Fällen bekannt (Bras et al. 2013; Kusdian 2011; Land et al. 2004). In der vorangegangenen Diplomarbeit konnte ein Knockout von TvFIM1 im dem *T. vaginalis* Stamm T1 etabliert werden, der aufgrund seines Verlusts der amöboiden Umwandlung nicht für diese Untersuchungen geeignet war (Kusdian 2011). Auch der Ansatz eines Knockdowns führte nicht zu einer Herunterregulierung der Gentranskripte (s. Abb. 5.14). Sämtliche gentechnische Modifikationen von TvFim1 schienen einen Einfluss auf transfizierte *T. vaginalis* Zellen zu haben: i) Die TvFIM1::HA T016 Kultur zeigte eine verlangsamte Wachstumsrate, gemessen am Inokulationsrhythmus. ii) Diese Kultur zeigte bei der Western Blot Analyse eine schneller migrierende Bande bei etwa 50 kDa (s. Abb. 7.4B), die nicht in der Western Blot Analyse des endogenen Antikörpers auftaucht. Diese Bande stellt wahrscheinlich degradiertes Protein dar. iii) Ferner wurde das Gen in der HaloTag[®]-exprimierenden Kultur auf Transkriptionsebene, das Protein jedoch nicht auf Translationsebene nachgewiesen (s. Abb. 7.6), was entweder für eine transkriptionelle Inhibierung oder einer sofortigen post-translationalen Degradierung spricht. Schließlich wurde durch die Ko-Lokalisation mit Aktin während der amöboiden Morphogenese und der Phagozytose von Hefe gezeigt, dass die Funktion von TvFIM1 vielseitig ist.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass TvFIM1 vorwiegend während der Infektion von humanen, vaginalen Epithelzellen und der Phagozytose von Hefe aktiv ist. Anreicherungen des Proteins und distinkte Strukturen wurden stets in adhären-amöboiden *T. vaginalis* Zellen observiert (s. Abb. 5.10, 5.11, 5.12, 7.4). Die amöboide Form von *T. vaginalis* kann zwar durch Fibronectin oder Laminin künstlich hervorgerufen werden (Brugerolle et al. 1996), doch der Grad der amöboiden Umformung ist während der Infektion von Wirtszellen stärker. Dies spricht für eine Vielzahl von Signalmolekülen und

einer komplexen Signaltransduktionskaskade zur Erkennung der Wirtszellen von *T. vaginalis*, gestützt durch die Tatsache, dass der Parasit ganze Hefezellen phagozytiert. Dort wird ebenfalls eine koordinierte Reorganisation des Aktin-Netzwerks, bei der TvFIM1 mit Aktin ko-lokalisiert, vollzogen. Die Phagozytose sollte somit durch eine andere Signaltransduktion induziert werden, als das amöboide Gleiten über Wirtszellen, einschließlich weiterer unbekannter, regulatorischer Einheiten. Ob die EF-Hand zur Aktivierung des Proteins frei von Ca^{2+} verbleibt (Namba et al. 1992; Prassler et al. 1997) oder das Protein durch die Phosphorylierung bestimmter Serinreste reguliert wird (Shinomiya 2012), bleibt zu überprüfen. NetPhos, ein Programm zur Identifizierung putativer Phosphorylierungs-Stellen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) sagt 20 Stellen für TvFIM1 voraus.

Die unterschiedlichen Lokalisationsmuster von Aktin und TvFIM1 innerhalb des Parasiten während der morphologischen Umwandlung repräsentieren die Komplexität der Aktin- und Fimbrin-Dynamik in *T. vaginalis*. In der amöboiden Form ko-lokalisieren Aktin und TvFIM1 in punktförmigen Akkumulationen (s. Abb. 5.10M–O, Abb. 5.12, Abb. 7.3A–C) und weisen fadenartige Strukturen aus (s. Abb. 5.10I–K, Abb. 7.3E–G), welche zuvor bereits observiert wurden (Bricheux et al. 2000). Die fadenartigen Strukturen könnten Aktinkabel repräsentieren, welche eine Rolle bei dem Vesikeltransport während der Endozytose im Zusammenspiel mit anderen Aktin-interagierenden Proteinen spielen (Gould et al. 2014). Auch während der Phagozytose von Hefe wurden diese Strukturen in *T. vaginalis* observiert (s. Abb. 5.12J und N), wobei die Protein-Akkumulationen vorrangig den Rand der phagozytotischen Vakuole dominieren. Die punktuellen Strukturen während der Phagozytose (s. Abb. 5.12I und J) ähneln endozytotischen Vesikeln, die bereits in Hefe und Säugetieren charakterisiert wurden und in Verbindung mit Fimbrin-gebündelten Aktinfilamenten stehen (Hagiwara et al. 2011; Skau et al. 2011). Dies würde ebenfalls für eine Interaktion mit Rab-Proteinen sprechen (Hagiwara et al. 2011), die in *T. vaginalis* mit 65 codierenden Genen inklusive sechs neuen Organismus-spezifischen Rab-Klassen zahlreich vorhanden sind (Lal et al. 2005).

Das Bündeln von Aktinfilamenten durch TvFIM1 zeigt nur einen Teilaspekt der Proteinklassen, die an der Reorganisation des Aktin-Netzwerkes beteiligt sind (s. Kap. 6.1).

Doch die Ergebnisse sprechen dafür, dass TvFIM1 als Aktinfilament-bündelndes Protein an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt ist, die in diversen, evolutionär weit entfernten Eukaryoten konserviert sind. Im Parasiten *T. vaginalis* dient es in erster Linie der Aktin-basierten Morphogenese: Der amöboiden Umwandlung zur Oberflächenmaximierung zu Wirtszellen und zum amöboiden Gleiten. Eine weitere Funktion wäre das Aufnehmen von anderen eukaryotischen, aber auch prokaryotischen Organismen, als Abwehrmechanismus oder eine weitere Form der Nahrungsaufnahme. *T. vaginalis* phagozytiert eine Vielzahl von eu- und prokaryotischen Organismen, aber auch humane Spermien, Leuko- und Erythrozyten (Benchimol et al. 2008; Benchimol und de Souza 1995; Pereira-Neves und Benchimol 2007; Rendon-Maldonado et al. 1998; Street et al. 1984).

6.3 Die Rolle von Centrin in *Trichomonas vaginalis*

Das etwa 20 kDa schwere Protein Centrin, oder auch Caltractin, gehört zu der Familie der Calcium-bindenden Phosphoproteine und weist vier EF-Hand-Domänen auf (Chazin 2011). Neben der Charakterisierung des Proteins in der klassischen Zellbiologie als Bestandteil im Centrosom zur Duplikation der Centriolen, scheint Centrin in Protisten eine andere Rolle zu spielen. Der Modellorganismus für Forschung von eukaryotischen Flagellen ist *Chlamydomonas reinhardtii* und wird wegen seines haploiden Genoms, der einfachen Kultivierbarkeit im Labor und dem Besitz von Chloroplasten auch „grüne Hefe“ genannt (Goodenough 1992). Dort verbindet Centrin drei distinkte, kontraktile Fasern im Basalkörper der Flagellen, wobei die Kontraktion Ca^{2+} -abhängig ist (Taillon et al. 1992). Das Protein assoziiert somit eher mit Mikrotubuli-Strukturen, jedoch wurde bereits eine Interaktion mit Aktin gezeigt (Lauwaet et al. 2011; Paredez et al. 2014). Dabei handelt es sich um den *Trichomonas* phylogenetisch verwandten Organismus *Giardia lamblia*, bei dem Aktin in Flagellen nachgewiesen und in seiner monomerischen Form von Centrin gebunden wurde (Paredez et al. 2011).

In *C. reinhardtii* wurde ebenfalls Aktin in Flagellen lokalisiert, in dem es mit dem Innenarm von Dynein assoziiert (Watanabe et al. 2004; Yanagisawa und Kamiya 2001). Somit herrscht ein integratives Zusammenspiel zwischen Aktinfilament- und Mikrotubuli-

Netzwerken, wie es auch in Kapitel 3.1 beschrieben ist (s. Abb. 3.2). Intermediärfilament-Proteine wurden in *T. vaginalis* bisher nicht direkt beschrieben, doch eine Untersuchung eines 477 kDa schweren *coiled-coil* Proteins (P477), welches als struktureller Anker des Golgi-Centrosom-Komplexes fungiert, könnte ein solches Protein repräsentieren (Bricheux et al. 2007).

Centrin stellt eine Proteinklasse dar, die sowohl mit Mikrotubuli als auch Aktinfilament-Strukturen interagiert und wurde in *T. vaginalis* und anderen Organismen innerhalb der Trichomonadida bereits untersucht (Brugerolle et al. 2000). Mittels Antikörper gegen *Chlamydomonas* Centrin wurde das Protein in den Basalkörpern und der undulierenden Membran von *T. vaginalis*, *T. batrachorum* und *T. foetus* lokalisiert. Es ist nicht an der Teilung des Spindelapparats beteiligt, jedoch eine Komponente der neun Ankerarme des Basalkörpers und der Plasmamembran. Ferner assoziiert das Protein mit der hakenförmigen Lamina und den sigmoiden Fasern der Pelta-Axostyl-Verbindung, welches das MTOC des Atraktophors darstellt (s. Kap. 3.2). Es konnten zwei Proteinsequenzen ermittelt werden, deren phylogenetische Analyse eine engere Homologie zu Grünalgen als zu Hefe oder Alveolaten erbrachte. Eine Southern Blot Analyse ergab die Option auf mindestens drei Kopien des Gens in *T. vaginalis* (Brugerolle et al. 2000).

Durch die Veröffentlichung des Genoms des Humanparasiten konnte die genaue Kopieanzahl an Centrin Homologen auf acht determiniert werden (s. Kap. 5.5). Vier der acht Kandidaten weisen eine stärkere Expression auf Transkriptionsebene auf (s. Abb. 5.17) und wurden mittels HA-Tag unter endogenem Promotor in frei-schwimmenden und amöboiden *T. vaginalis* Zellen lokalisiert (s. Abb. 5.18). Das Protein lokalisiert vornehmlich in der undulierenden Membran und in Strukturen innerhalb des Atraktophors, ähnlich den zuvor bekannten Ergebnissen. Andere Kompartimente oder Organellen, wie beispielsweise das Axostyl, wurden nicht als Centrin-haltig identifiziert. In *Chilomastix cuspidata*, ein Vertreter der Excavata, lokalisiert Centrin mit dem sogenannten „Hakenband“ – eine Mikrotubuli-Struktur ähnlich dem Axostyl (Weerakoon et al. 1999). In *Holomastigotoides spp.*, ein anderer Protist innerhalb des Phylums Parabasalia, wurde Centrin im Axostyl, Spindelapparat und den Basalkörpern der bis zu 10.000 Flagellen einer Zelle identifiziert (Lingle und Salisbury 1997). Während Centrin somit oft mit dem Spindelapparat und der

Zellteilung assoziiert ist (Baum et al. 1986; Kilmartin 2003; Lechtreck und Grunow 1999; Spang et al. 1993), gilt dies nicht für die Centrine in *T. vaginalis* (s. Abb. 5.19), gestützt durch die Untersuchung des Spindelapparats und der damit assoziierten Membranen während der geschlossenen Mitose des Protisten (Ribeiro et al. 2002b). Der genaue Verlauf der Mitose von *T. vaginalis* ist umstritten, wird jedoch dominiert durch die Änderung des Mikrotubuli-Zytoskeletts. Der Verlauf teilt sich in die Depolymerisierung des Pelta-Axostylar-Komplexes und die Assemblierung der Flagellen während der Mitose ein, die vollständig ausgebildet sind, bevor die eigentliche Cytokinese beginnt (Noël et al. 2003). Eine vorangegangene Studie postuliert eine Aufrechterhaltung des Pelta-Axostylar-Komplexes, welcher somit während der Zellteilung nicht depolymerisiert wird (Ribeiro et al. 2000).

Die Homologie zwischen Centriolen und Basalkörpern wurde durch die Identifizierung von evolutiv konservierten Proteinen verstärkt (Beisson und Wright 2003). Während in den meisten Eukaryoten ein organisierendes Zentrum (Centrosom) vorherrscht, repräsentieren flagellierte Protisten eine besondere Klasse, bei der Basalkörper und Wurzelfasern (Kinetide) in einem spezifischen Muster an der Zelloberfläche angeordnet sind (Lynn und Small 1981). In dem Protisten *Naegleria gruberi*, welcher seine Mikrotubuli-assoziierten Strukturen während der Umformung in das flagellierte Stadium neu synthetisiert, werden ursprüngliche Centriolen-Gene hochreguliert und sind mit den Basalkörpern des Protisten assoziiert (Fritz-Laylin und Cande 2010; Mar und Walsh 2008). Centrin ist das einzige centrosomale Protein, welches bei Protisten eine spezielle Rolle einnimmt, da es sowohl im Centrosom, im Basalkörper als auch in Zytoskelett-assoziierten Strukturen aufzufinden ist (Beck et al. 2010; Correa et al. 2004; Hu et al. 2006; Ikeda und de Graffenried 2012; Konior et al. 2009; Lemullois et al. 2004; Vonderfecht et al. 2012).

Die Ergebnisse für *T. vaginalis* zeigen neben der Lokalisation im Atraktophor (= Basalkörper) eine Akkumulation von Centrin in der undulierenden Membran. Die Flagellen von *T. vaginalis* wurden untersucht und weisen die klassische 9+2 Struktur in dem Axonem auf (Jemilohun 1998). Die Zusammensetzung der Proteine wurde noch nicht hinreichend untersucht, jedoch konnten β -Tubuline als Bestandteil identifiziert werden (Katiyar und Edlind 1994). Vielmehr ist die Tatsache bemerkenswert, dass Centrin nur in

der fünften, posterior gerichteten Flagelle lokalisiert und nicht in den vier anterioren. Ein selektiver Transport von Centrin in eine der Flagellen ist unwahrscheinlich, da solche selektiven Mechanismen für Flagellen bisher nicht erschlossen wurden. Die fünfte Flagelle zeichnet sich durch eine Verschmelzung mit der Membran aus und ist über eine Schicht von Mikrofibrillen mit der Costa verbunden (s. Kap. 3.2, Abb. 3.5 und 3.6). Diese Mikrofibrillen bestehen weitestgehend aus Tubulin und interagieren mit der Calcium-abhängigen, kontraktilen Eigenschaft von Centrin, die bereits für andere Organismen bestätigt wurde (Correa et al. 2004; Jerka-Dziadosz et al. 2013; Lingle und Salisbury 1997; Salisbury 2004). Diese Eigenschaft wurde zwar für Centrine während der Internalisierung der Flagellen bei *T. vaginalis* postuliert (Stockdale 2008), jedoch ohne Angabe einer Referenz, wie dies überprüft wurde. Obgleich diese Aussage wahrscheinlich den Tatsachen entspricht – gestützt durch die Ergebnisse anderer Organismen bezüglich Centrin, bleibt dieser Rückschluss in *T. vaginalis* zu investigieren. Dies gilt ebenso für die mögliche Funktion der Stütze und Bewegung der undulierenden Membran.

Schließlich konnten die Ergebnisse der Literatur über Centrin in *T. vaginalis* verifiziert werden, zusammen mit der Erkenntnis, dass alle vier analysierten Homologe exprimiert werden, im Atraktophor und an der undulierenden Membran lokalisieren, sich die Lokalisierung während der zwei Stadien nicht ändert und Centrin nicht an Prozessen der Cytokinese beteiligt ist.

6.4 Erkenntnisse der Arbeit

Das Zytoskelett von *Trichomonas vaginalis* ist besonders, da durch das Zusammenspiel der vornehmlich zwei Säulen eukaryotischer Zytoskelette (Aktin und Tubulin) eine rapide Umwandlung der Morphologie zwischen frei-schwimmend und amöboid bei Kontakt mit Wirtszellen erzielt wird. Dabei ist der Grad der Umwandlung stamm-spezifisch. Videoaufnahmen zeigen erstmalig den Infektionsmechanismus in bewegten Bildern und erschließen Eigenschaften, wie tastende Bewegungen der Flagellen, Ausbildung von Pseudopodien und verschiedene Bewegungsabläufe (kriechend, stationär). Das amöboide Zytoskelett wird dominiert durch ein Netzwerk von Aktinfilamenten, in dem eine Vielzahl

von Aktin-interagierenden Proteinen involviert sind – jedoch eine Motorproteinklasse gänzlich fehlt. Neben bereits charakterisierten Aktin-interagierenden Proteinen lässt sich durch die Ergebnisse von TvFIM1 ein weiteres Protein zu dieser Klasse zählen. Die Funktion ist vergleichbar mit Fimbrinen anderer Organismen: Es bündelt Aktinfilamente auf parallele und anti-parallele Weise und erhöht die Polymersierungsrate von Aktin-Monomeren. Innerhalb der Zelle reorganisiert sich die Lokalisation des Proteins bei amöboider Umwandlung und ko-lokalisiert mit Aktin in distinkten Strukturen. Somit ist eine gemeinschaftliche Organisation des Aktin-Netzwerks, bei der mehrere Aktin-bindende Proteine involviert sind, wahrscheinlich.

Die Ergebnisse über TvFIM1::GFP zeigen, dass monomerisches eGFP ein potentieller Lebendzell-Marker in *Trichomonas vaginalis* sein kann (s. Kap. 5.4). Die Wachstumskurven bestätigen, dass die Kultivierung bei 5% CO₂ (16% O₂) keine Auswirkungen auf das Wachstum der *T. vaginalis* Stämme T1 und FMV1 hat (s. Abb. 5.15). Somit ist die Anwesenheit von Sauerstoff für die Fluoreszenz von GFP gegeben. Dennoch ist die Fluoreszenz von GFP nicht einheitlich in allen Zellen und kann auch vollständig abwesend sein (s. Abb. 5.16A). In *in vitro* Experimenten wurde eine Formation des Fluorophors mittels Sauerstoff innerhalb von 5 Stunden ermittelt (Heim et al. 1995), welches *in vivo* bereits nach einer Stunde auftritt (Nishiuchi et al. 1998). In einer Untersuchung von GFP-Eigenschaften bei Prokaryoten wurde L-Cystein als reduzierender Stoff von Sauerstoff genutzt. Anaerob kultivierte Zellen konnten ihre GFP-Fluoreszenz unter aeroben Bedingungen innerhalb von vier Minuten ausbilden und erhielten ihr Maximum an Fluoreszenz nach 16 Minuten (Hansen et al. 2001). Dies korreliert mit der Fluoreszenz-Entwicklung von GFP in *T. vaginalis*. Die Menge von molekularem Sauerstoff des Umfelds ist ein wichtiger Faktor für die Fluoreszenz von GFP und wird oft als physiologische Bedingung bezeichnet (Thews und Vaupel 1996). Diese Menge variiert zwischen 24 und 66 mmHg, was 3,1 bis 8,7% O₂ entspricht. GFP fluoresziert jedoch auch bei normaler Atmosphäre (23% Sauerstoff, Heim et al. 1994). Somit ist ein Rückschluss möglich, dass der Anteil von 16% Sauerstoff für GFP in einem akzeptablen Bereich liegt. Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass sich ein erniedrigter Anteil von Sauerstoff negativ auf die Translation, nicht jedoch auf die Transkription von GFP auswirkt (Coralli et

al. 2001; Heacock und Sutherland 1986). Transfizierte *T. vaginalis* Zellen wurden anaerob kultiviert und vor der mikroskopischen Observierung mindestens 30 min bei 5% CO₂ oxidiert. Innerhalb dieser Zeit ist eine nicht ausreichende Expression von GFP für eine messbare Fluoreszenz möglich. Auch der artifizielle SCS-Promotor könnte dabei eine Rolle spielen, wobei dies bei pTagvag2 nicht beobachtet werden konnte. Der pH-Wert ist ebenso ein nennenswerter Faktor für die GFP-Fluoreszenz, welcher zwischen 4,6 bis 8 liegt (Elslinger et al. 1999). Somit stellt der pH von 6,2 in dem TYM-Medium keine potentielle Fehlerquelle der mangelnden GFP-Fluoreszenz in transfizierten *T. vaginalis* Zellen dar. Ferner sind die Faltungseigenschaften von GFP bei 20 bis 65 °C optimal (Tsien 1998).

Bei der Aussetzung von *T. vaginalis* an Sauerstoff werden auf transkriptionaler Ebene Gene zur Sauerstoff-Detoxifizierung hochreguliert und vorrangig Cysteinproteasen herunterreguliert (Gould et al. 2013). Diese Tatsache und die relativ hohe Größe von GFP (27 kDa) führen zum Schluss, dass sich dieser Marker nicht für Proteine, welche am Metabolismus beteiligt sind, eignet. Dennoch kann GFP in *T. vaginalis* als Lebendzell-Marker ein wirkungsvolles Werkzeug zur Untersuchung von spezifischen Proteinen in bewegten Zellen sein.

Die Erkenntnisse über TvCEN1, 2, 4 und 6 geben einen ersten Einblick in die Funktion von Centrin in *T. vaginalis*. Das vornehmlich mit Mikrotubuli-assoziierte Protein ist in achtfacher Kopie codiert, welche untereinander eine recht niedrige Sequenzhomologie teilen. Vier der acht Homologe weisen eine signifikant hohe Expression auf und lokalisieren im Atraktophor und an der undulierenden Membran. Während der Infektion von humanen, vaginalen Epithelzellen re-lokalisiert das Protein im Gegensatz zu TvFIM1 nicht. Dies gilt auch während der Zellteilung. Somit ist der Rückschluss möglich, dass Centrin nicht die Funktion innerhalb des Centrosoms erfüllt, wie in den meisten Metazoa, sondern eine kontraktile Funktion in den Basalkörpern der Flagellen hat, wie es für viele Protisten der Fall ist, und in den Mikrofibrillen zwischen undulierender Membran und Costa lokalisiert.

6.5 Ausblick

Die genauen Signale zur Auslösung der amöboiden Umwandlung während der Infektion sind weitestgehend unbekannt, jedoch schufen die Erkenntnisse dieser Dissertation eine Grundlage dafür. Das amöboide Stadium von *T. vaginalis* basiert hauptsächlich auf Aktin-gesteuerten Prozessen. Durch die Lebendzellaufnahmen von TvFIM1::GFP exprimierenden *T. vaginalis* Zellen und der Ko-Lokalisierung von TvFIM1::HA und Aktin in amöboiden Zellen, ist indirekt ein Marker für Aktin etabliert. Auch durch Markierung von TvAKT1 mittels GFP wäre eine direkte Verfolgung von Aktinfilamenten innerhalb der Zelle möglich, doch wird dadurch nur eines der 29 Aktin-Homologe in *T. vaginalis* detektiert, was zusammen mit der Inkonsistenz der GFP-Fluoreszenz (s. Kap. 6.4), zu einem verfälschten Ergebnis führen kann. Durch die Implementierung eines Aktin-Lebendzell-Markers in dem Protisten, wie beispielsweise *Lifeact* (Riedl et al. 2008), wäre eine direkte Verfolgung des Aktin-Netzwerks inklusive aller Aktin-Homologe während der Morphogenese möglich.

Die massenspektrometrische Auswertung der eluierten Proteine der Affinitätschromatographie gibt einen ersten Einblick in weitere Aktin-interagierende Proteine im frei-schwimmenden und amöboiden Stadium von *T. vaginalis*. Die Ansätze sollen in Triplikaten und angeglichenen Proteinmengen vorbereitet werden, um einen quantitativen Vergleich zwischen den Stadien zu erstellen. Durch weitere bioinformatische Analysen soll eine Homologie zu anderen Proteinen identifiziert werden und schließlich durch molekularbiologische Methoden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in *T. vaginalis* charakterisiert werden. Ebenso wäre eine Identifizierung eines Motorproteins für Aktinfilamente möglich. Durch Optimierung der Affinitätschromatographie mittels *Crosslinker* könnte die Bindung zwischen Aktin und Interaktionspartnern, verstärkt werden. Eine Ermittlung eines abundanten Proteins, welches eine Schlüsselrolle in der amöboiden Umwandlung trägt, könnte ein neues Ziel von Medikamenten zur Behandlung von Trichomoniasis sein, da die amöboide Form für die Pathogenität erforderlich ist (Addis et al. 1998).

Die Funktion von TvFIM1 in *T. vaginalis* wurde weitestgehend erschlossen, jedoch könnte ein Knockout des Proteins zu einer ultimativen Funktionsdeterminierung führen. Ein Phänotyp für den Stamm T1 wurde etabliert (Kusdian 2011), doch eine Untersuchung des Grads der Umwandlung von infektiösen *T. vaginalis* Stämmen mit deletiertem TvFIM1 könnte eine genaue Korrelation von Protein und Morphogenese des Parasiten hervorbringen.

Um die Centrine in *T. vaginalis* näher zu charakterisieren, könnten Lokalisationsstudien von Zellen, welche sich durch Kälte-Induktion zu Pseudozysten umformen, durchgeführt werden (Pereira-Neves und Benchimol 2009). Somit könnte ein Zusammenhang der kontraktiven Eigenschaft des Proteins und dem Internalisieren der Flagellen aufgedeckt werden.

Das Zytoskelett in seiner Gesamtheit wurde in verschiedenen Spezies der Trichomonadidae untersucht (s. Kap. 3.2). In einem bisher unveröffentlichten Experiment sollen Transkriptome von fünf Organismen erstellt werden: *Trichomonas tenax* (Stamm HS-4), *Trichomonas gallinae* (Stamm GCB), *Tetratrichomonas gallinarum* (Stamm M3), *Pentatrichomonas hominis* (Stamm PhGII) und *Trichomitus batrachorum* (BUB) – freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. J. Tachezy, Prag, Tschechien. Studien über diese Vertreter der Trichomonadidae beschäftigen sich mit deren evolutionärer Verwandtschaft und somit der phylogenetischen Analyse. Als Basis diene dabei die Ermittlung der Sequenzhomologie eines 18S rRNA-Gens von 59 Trichomonadidae-Isolaten, denen eine mögliche Adaptation der Spezies gegenüber neuen Wirten in Aussicht gestellt wurde (Dimasuay et al. 2013; Dimasuay und Rivera 2013; Maritz et al. 2014). Die veröffentlichten Sequenzen der 18S rRNA-Gene dienten als Vorlage zur Reinheitsbestimmung der Kulturen mittels PCR. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und via Illumina-Sequenzierung analysiert.

Die Genome der Organismen sind bisher nicht veröffentlicht. Deswegen sollen die Sequenzierungsergebnisse zum einen *de novo* assembliert werden und zum anderen mit dem *T. vaginalis* Genom verglichen werden. Diese bioinformatische Auswertung soll in naher Zukunft fertiggestellt werden und kann vielfältige Vergleichsmöglichkeiten der Organismen innerhalb der Trichomonadidae bieten. Die Aufklärung der Expressionsstärke

bestimmter Proteinfamilien, wie Centrin oder Fimbrin, im Vergleich zu *T. vaginalis* oder eine Bestimmung der codierenden Genanzahl sind nur einige Beispiele der Analyse-Möglichkeiten für den Vergleich der verschiedenen Trichomadidae-Spezies.

7 Anhang

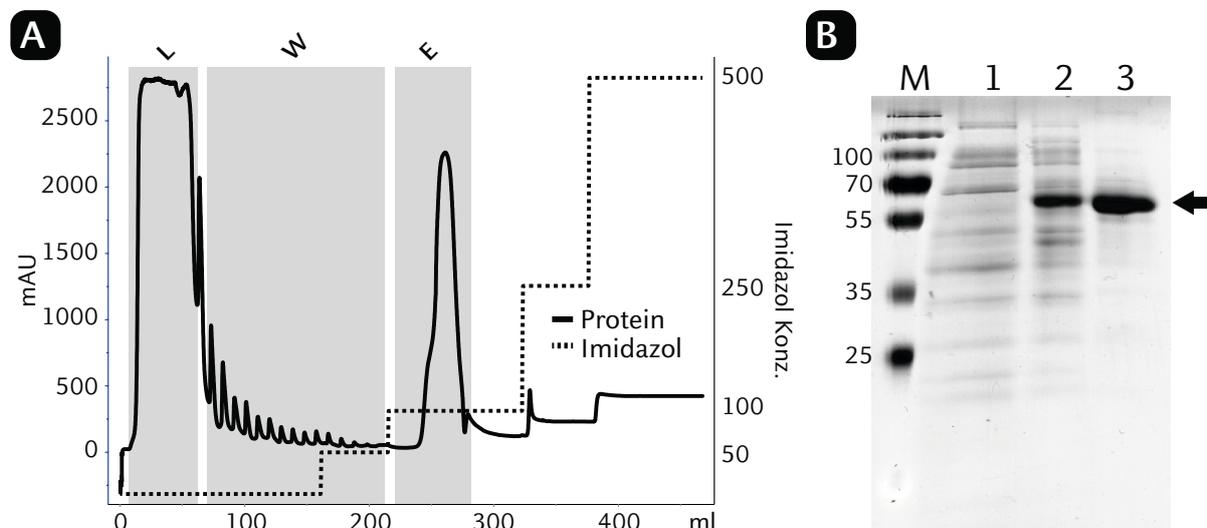


Abbildung 7.1 Reinigung von heterolog exprimiertem *TvFIM1* aus *Escherichia coli* Stamm C41 via Affinitätschromatographie. A) zeigt den Lauf mit dem Beladen (L), Waschen (W) und Eluieren (E) des HIS-getaggten *TvFIM1* bei einer Imidazol-Konzentration von 100 mM. B) Coomassie-gefärbtes, 12%iges SDS-Gel mit nicht-induzierten, transformierten *E. coli* Zellsatz (1), induzierten, transformierten *E. coli* Zellen (2) und eluiertes *TvFIM1* via FPLC (3) mit einer Größe von ca. 68 kDa (Pfeil). Nach Kusdian et al. 2013.

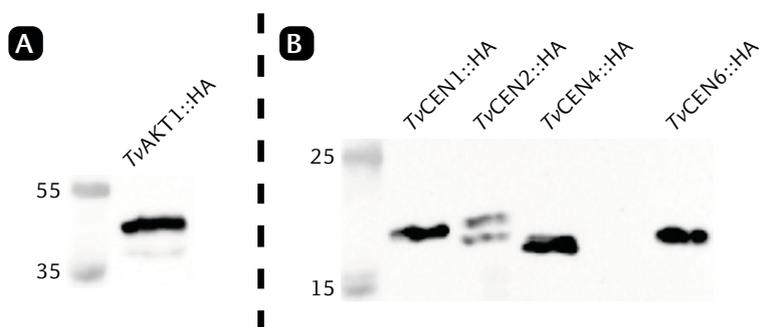


Abbildung 7.2 Immunodetektion. A) Detektion von *TvAKT1::HA* (TVAG_337240, 44 kDa) in 50 μ g Gesamtzell-extrakt von transfizierten FMV1 Trichomonaden. B) Detektion von *TvCEN1, 2, 4 und 6::HA* (ca. 20 kDa, s. Kapitel 4.5) in 50 μ g Gesamtzell-extrakt von transfizierten FMV1 Trichomonaden. Erstantikörper: α -HA (Maus, 1:2000). Zweitantikörper: α -Maus, Peroxidase-gekoppelt (1:5000).

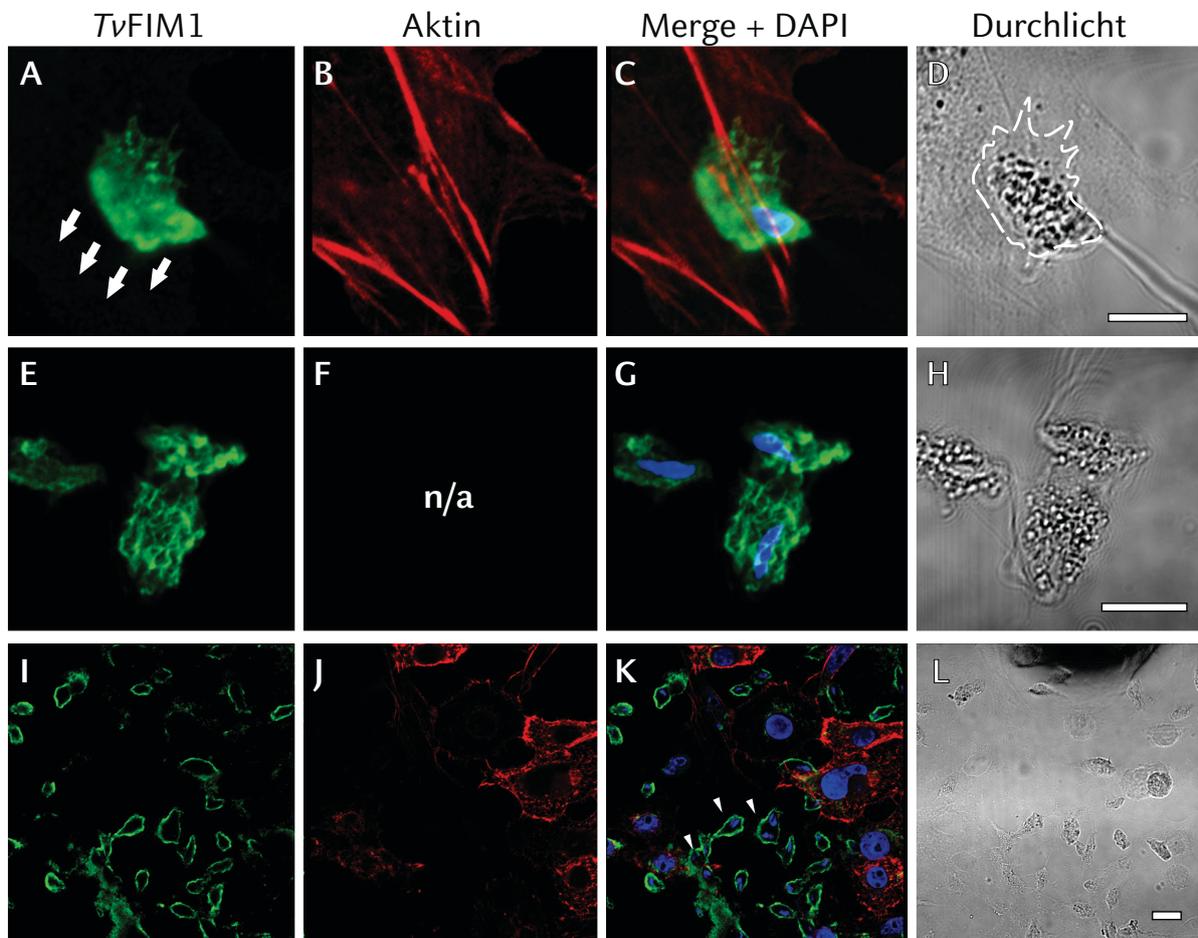


Abbildung 7.3 Immunfluoreszenzaufnahme von *TvFIM1* in amöboiden *T. vaginalis* T016 Zellen zur weiteren Lokalisationsanalyse des Proteins. (A–D) zeigt eine amöboide, gleitende Trichomonde, in der *TvFIM1* (grüner Kanal) sich an der hervorstehenden Seite in Bewegungsrichtung konzentriert. Die Kontur der Zelle wurde in (D) mit einer gestrichelten Linie auf Basis der Immunfluoreszenz gekennzeichnet. Im roten Kanal ist das Aktin-Zytoskelett der humanen Epithelzelle zu sehen. Das Protein assoziiert außerdem mit Strukturen die Aktin-Kabel ähneln (E–H) und die Parasiten werden multi-nukleär während der Infektion (Pfeilköpfe, K). *TvFIM1* lokalisiert hier vornehmlich an der Zellperipherie. Die Überlagerung (merge) zeigt zusätzlich die DAPI Färbung (blauer Kanal). Erstantikörper: α -*TvFIM1* (Ratte) und α -Aktin (Maus) mit jeweils 1:2000. Zweitantikörper: Alexa fluor 633 α -Ratte und Alexa fluor 488 α -Maus (1:5000). Skalierungsbalken: 10 μ m. Nach KUSDIAN et al. 2013.

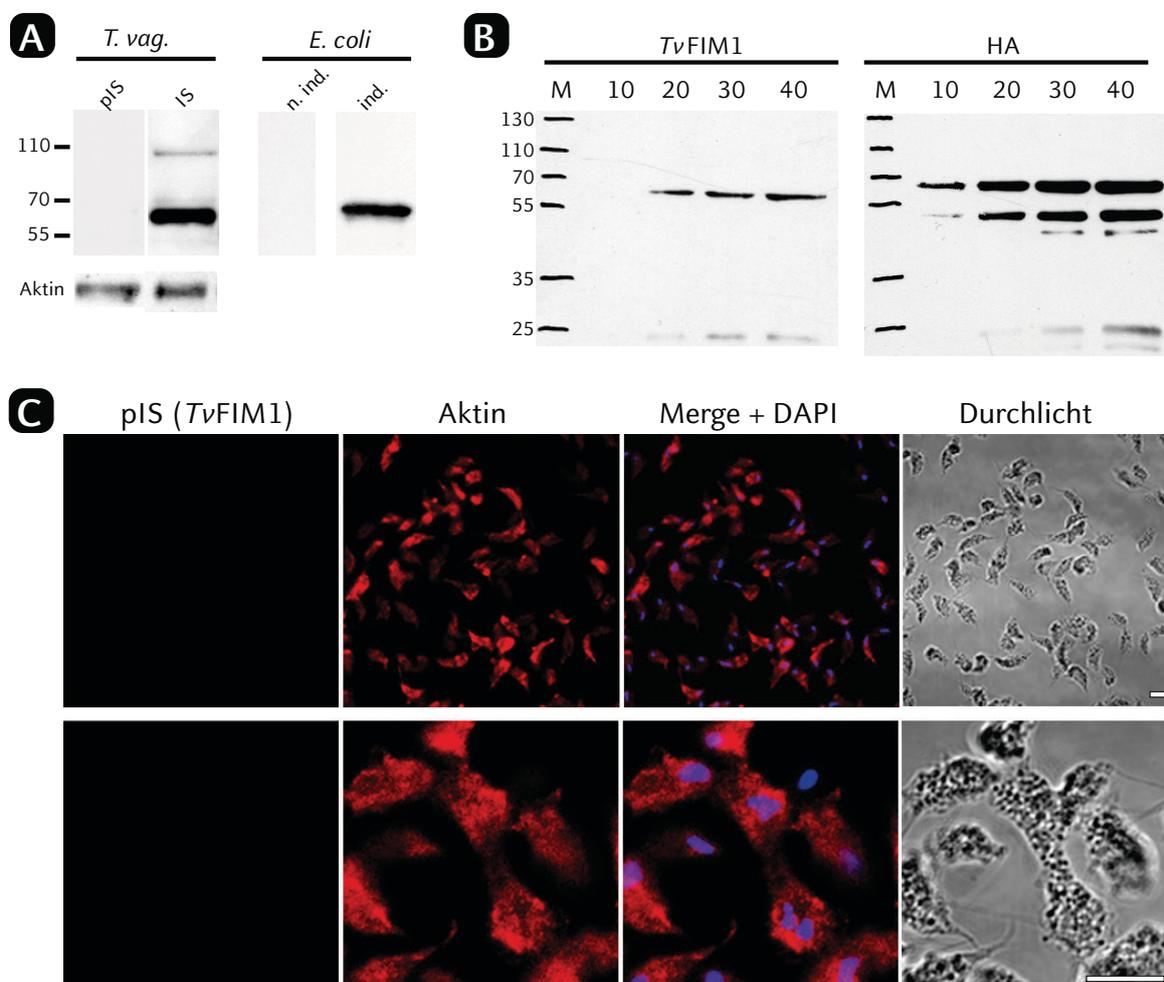


Abbildung 7.4 Kontrollen des *TvFIM1* Antikörpers und transfizierter *T. vaginalis* Kulturen. (A) Immunodetektion des Präimmenserums (pIS) auf Gesamtzellextrakt von *T. vaginalis* T016 (kein Signal), immunisiertes Rattenserum (IS) zeigt prominente Bande bei etwa 70 kDa (Molekulare Masse von *TvFIM1*: 68 kDa, jeweils 1:500) α -Aktin (1:1000) dient als Ladekontrolle. Gereinigter α -*TvFIM1* bei Western Blot Analyse von Gesamtzellextrakt nicht (keine Bande) und induzierter *E. coli* Zellen (Bande bei ca. 70 kDa, 1:1000). (B) Western Blot Analyse des aufgereinigten α -*TvFIM1* (1:1000) von Gesamtzellextrakt von wildtypischen *T. vaginalis* Zellen (T016) und α -HA (1:5000) und von Gesamtzellextrakt transfizierter *T. vaginalis* Zellen (*TvFIM1*::HA, T016) in jeweils einem Mengengradienten von 10-40 μ g. (C) Immunofluoreszenzaufnahmen von amöboiden T016 Trichomonaden (Fibronectin-induzierte Adhärenz) des Präimmenserums (1:100), α -Aktin im roten Kanal (1:1000) und DAPI Färbung (blau). Skalierungsbalken: 10 μ m. Nach Kudian et al. 2013.

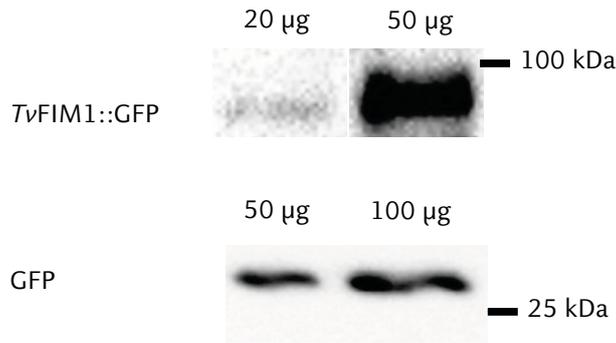


Abbildung 7.5 Immunodetektion der GFP Konstrukte in transfizierten *T. vaginalis* Zellen. C-terminal GFP markiertes TvFIM1 konnte in einer prominenten Bande bei ca. 100 kDa detektiert werden, welche bei erhöhter Proteinmenge intensiver wurde (TvFIM1::GFP: 90 kDa, Stamm: FMV-1). *T. vaginalis* T1 transfiziert mit dem Leervektor pTv_GFP erbrachte die Detektion einer Bande bei etwa 25 kDa (GFP: 27 kDa). Erstantikörper: α -GFP (Maus, 1:2000). Zweitantikörper: α -Maus, Peroxidasegekoppelt (1:5000).

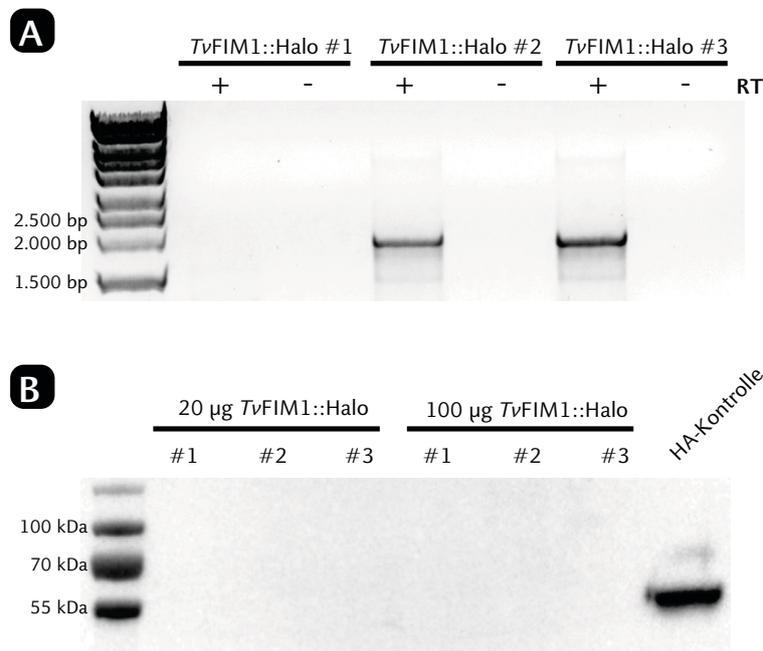


Abbildung 7.6 Expressionsanalyse des Fusionsproteins von TvFIM1 und HaloTag[®] als weiteren Lebendzell-Marker neben GFP nach (Martincova et al. 2012). *T. vaginalis* T016 wurde in drei Ansätzen mit dem Konstrukt transfiziert. A) Reverse Transkriptase PCR mit cDNA in An- (+) und Abwesenheit (-) der Reversen Transkriptase (RT) zeigten eine Transkription des Gens in Klon 2 und 3, (Fragmentgröße: 2742 bp). B) Die Western Blot Analyse erbrachte keine Signal für alle Klone bei einer geladenen Proteinmenge von 20 und 100 µg des Gesamtzellextraktes transfizierter T016 *T. vaginalis* Zellen, während die Positivkontrolle detektiert wurde (HaloTag[®] Plasmid weist zusätzlich ein HA-Tag am C-Terminus auf, erwartete Größe: 80 kDa). Erstantikörper: α -HA (Maus, 1:2000). Zweitantikörper: α -Maus, Peroxidasegekoppelt (1:5000). Nach Kusdian et al. 2013.

Tabelle 7.1 Quellen der in Abb. 4.3 genutzten Kernsequenzen. Die mit einem „*“ markierten Gene wurden während der Suche von Homolog-Clustern aufgrund fehlender Homologie oder zu starker Ähnlichkeit zu anderen Genfamilien ausgenommen.

Gen	Organismus	Nummer	Quelle	TVAG Homolog
Actin	<i>Homo sapiens</i>	P63261.1	SwissProt	TVAG_090470
ARP2/Centractin	<i>Homo sapiens</i>	P61160.1	SwissProt	TVAG_354040
ARP3	<i>Homo sapiens</i>	P61158.3	SwissProt	TVAG_371880
ARPC4	<i>Homo sapiens</i>	P59998.3	SwissProt	TVAG_470160
ADF/Cofilin	<i>Homo sapiens</i>	P23528.3	SwissProt	TVAG_192620
CAPZ beta	<i>Homo sapiens</i>	P47756.4	SwissProt	TVAG_396060
ARPC3	<i>Homo sapiens</i>	O15145.3	SwissProt	TVAG_083290
Coronin	<i>Homo sapiens</i>	Q6QEF8.2	SwissProt	TVAG_222320
Fimbrin/Plastin	<i>Homo sapiens</i>	P13797.4	SwissProt	TVAG_351310
ARPC1	<i>Homo sapiens</i>	O15143.3	SwissProt	TVAG_035180
Myosin heavy	<i>Homo sapiens</i>	P12882.3	SwissProt	-
CAPZ alpha	<i>Homo sapiens</i>	P52907.3	SwissProt	TVAG_212270
CAP/Srv2p	<i>Homo sapiens</i>	P40123.1	SwissProt	TVAG_407250
Alpha Actinin	<i>Homo sapiens</i>	P12814.2	SwissProt	TVAG_239310
Severin	<i>Dictyostelium discoideum</i>	P10733.1	SwissProt	TVAG_237690
WASP	<i>Homo sapiens</i>	P42768.4	SwissProt	TVAG_283280
Twinfilin	<i>Homo sapiens</i>	Q12792.3	SwissProt	TVAG_405170
Profilin	<i>Homo sapiens</i>	Q8NHR9.1	SwissProt	TVAG_454630
WASH	<i>Homo sapiens</i>	A8K0Z3.2	SwissProt	TVAG_267590
Sphingomyelinase	<i>Homo sapiens</i>	P17405.4	SwissProt	TVAG_352120
Ezrin/Radixin	<i>Homo sapiens</i>	P35241.1	SwissProt	-
Gelsolin/Brevin/Villin	<i>Homo sapiens</i>	P06396.1	SwissProt	-
Tropomyosin	<i>Homo sapiens</i>	P09493.2	SwissProt	-
Beta Spectrin	<i>Homo sapiens</i>	P11277.5	SwissProt	-
Fascin	<i>Homo sapiens</i>	Q16658.3	SwissProt	-
Coactosin	<i>Dictyostelium discoideum</i>	P34121.1	SwissProt	-
Filamin	<i>Homo sapiens</i>	P21333.4	SwissProt	-
Vinculin	<i>Homo sapiens</i>	P18206.4	SwissProt	-
Kaptin	<i>Homo sapiens</i>	Q9Y664.2	SwissProt	-
Nadrin	<i>Homo sapiens</i>	Q68EM7.1	SwissProt	-
LIM kinase	<i>Homo sapiens</i>	P53667.3	SwissProt	-
Actin regulating kinases*	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P40494.1	SwissProt	-
Dematin*	<i>Homo sapiens</i>	Q08495.3	SwissProt	-
Dynacortin*	<i>Dictyostelium discoideum</i>	AAF67107.1	GenBank	-
Dystrophin*	<i>Homo sapiens</i>	P11532.3	SwissProt	-
Eplin*	<i>Homo sapiens</i>	Q9UHB6.1	SwissProt	-
Formin*	<i>Homo sapiens</i>	Q68DA7.3	SwissProt	-
Nebulin*	<i>Homo sapiens</i>	P20929.4	SwissProt	-
Plectin*	<i>Homo sapiens</i>	Q15149.3	SwissProt	-
Ponticulin*	<i>Dictyostelium discoideum</i>	P54660.1	SwissProt	-
Troponin I*	<i>Homo sapiens</i>	P19429.3	SwissProt	-

Anhang

Villin*	<i>Homo sapiens</i>	P09327.4	SwissProt	-
Tubulin beta	<i>Homo sapiens</i>	Q9BVA1.1	SwissProt	TVAG_456920
Tubulin alpha	<i>Homo sapiens</i>	Q9BQE3.1	SwissProt	TVAG_467840
Dynein light	<i>Homo sapiens</i>	Q96FJ2.1	SwissProt	TVAG_134920
Tubulin gamma	<i>Homo sapiens</i>	P23258.2	SwissProt	TVAG_109820
MAP1	<i>Homo sapiens</i>	Q9BXW4.1	SwissProt	TVAG_486080
Dynein heavy	<i>Homo sapiens</i>	Q14204.5	SwissProt	TVAG_032910
PF16	<i>Homo sapiens</i>	O75602.1	SwissProt	TVAG_059360
EB-Family	<i>Homo sapiens</i>	Q9UPY8.1	SwissProt	TVAG_146390
Katanin p60	<i>Homo sapiens</i>	O75449.1	SwissProt	TVAG_498860
Tubulin epsilon	<i>Homo sapiens</i>	Q9UJT0.1	SwissProt	TVAG_065740
LF4	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AAO86688.1	GenBank	TVAG_057050
Trypanin	<i>Trypanosoma brucei</i>	O15697.1	SwissProt	TVAG_094850
PF20	<i>Homo sapiens</i>	Q8N0X2.2	SwissProt	TVAG_035910
IFT172	<i>Homo sapiens</i>	Q9UG01.2	SwissProt	TVAG_327960
RIB72	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AAM44303.1	GenBank	TVAG_159140
IFT52	<i>Homo sapiens</i>	Q9Y366.3	SwissProt	TVAG_340650
RSP3	<i>Homo sapiens</i>	Q86UC2.1	SwissProt	TVAG_358840
IFT88	<i>Homo sapiens</i>	Q13099.2	SwissProt	TVAG_324940
Outer dynein docking complex	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AAK72125.1	GenBank	TVAG_567400
IFT57	<i>Homo sapiens</i>	Q9NWB7.1	SwissProt	TVAG_381870
IFT20	<i>Homo sapiens</i>	Q8IY31.1	SwissProt	TVAG_233030
Tubulin delta	<i>Homo sapiens</i>	Q9UJT1.2	SwissProt	TVAG_207590
E-like/Catastrophin	<i>Homo sapiens</i>	Q5QJ74.2	SwissProt	TVAG_233090
IFT140	<i>Homo sapiens</i>	Q96RY7.1	SwissProt	TVAG_483890
Katanin p80	<i>Homo sapiens</i>	Q9BVA0.1	SwissProt	TVAG_230250
Kinesin light	<i>Homo sapiens</i>	Q9H0B6.1	SwissProt	-
CLASP/CLAP	<i>Homo sapiens</i>	Q7Z460.1	SwissProt	-
MAP65	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8LEG3.1	SwissProt	TVAG_171600
Dynactin	<i>Homo sapiens</i>	Q14203.3	SwissProt	-
Tektin	<i>Homo sapiens</i>	Q969V4.1	SwissProt	-
CLIP170	<i>Homo sapiens</i>	P30622.2	SwissProt	-
MAP2*	<i>Homo sapiens</i>	P11137.4	SwissProt	-
MAP4*	<i>Homo sapiens</i>	P27816.3	SwissProt	-
RIB43*	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	AAF34540.1	GenBank	-
Tau Protein*	<i>Homo sapiens</i>	P10636.5	SwissProt	-

Tabelle 7.2 Quellen der genutzten Datenbanken für die Suche nach Aktin- und Tubulin-assoziierten Genen.

Organismus	Quelle	Sequenztyp
<i>Alexandrium tamarense</i>	dbEST	EST
<i>Oxyrrhis marina</i>	dbEST	EST
<i>Perkinsus marinus</i>	RefSeq	Protein
<i>Plasmodium falciparum</i>	RefSeq	Protein
<i>Toxoplasma gondii</i>	RefSeq	Protein
<i>Paramecium tetraurelia</i>	RefSeq	Protein
<i>Tetrahymena thermophila</i>	RefSeq	Protein
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	RefSeq	Protein
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	RefSeq	Protein
<i>Bigelowiella natans</i>	(Curtis et al. 2012)	Protein
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RefSeq	Protein
<i>Physcomitrella patens</i>	RefSeq	Protein
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	RefSeq	Protein
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	(Matsuzaki et al. 2004)	Protein
<i>Porphyra yezoensis</i>	dbEST	EST
<i>Cyanophora paradoxa</i>	(Price et al. 2012)	Protein
<i>Reclinomonas americana</i>	dbEST	EST
<i>Naegleria gruberi</i>	RefSeq	Protein
<i>Leishmania major</i>	RefSeq	Protein
<i>Giardia lamblia</i>	RefSeq	Protein
<i>Trichomonas vaginalis</i>	RefSeq	Protein
<i>Dictyostelium discoideum</i>	RefSeq	Protein
<i>Physarum polycephalum</i>	dbEST	EST
<i>Entamoeba histolytica</i>	RefSeq	Protein
<i>Homo sapiens</i>	RefSeq	Protein
<i>Schistosoma mansoni</i>	RefSeq	Protein
<i>Nematostella vectensis</i>	RefSeq	Protein
<i>Monosiga brevicollis</i>	RefSeq	Protein
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RefSeq	Protein
<i>Ustilago maydis</i>	RefSeq	Protein

Anhang

Tabelle 7.3 Rohdaten der qRT-PCR Analyse von *TvFIM1* und 40S ribosomales Protein als Referenzgen im *T. vaginalis* T016 Wildtyp. Die Ct-Werte (*cycle threshold*: Punkt des exponentiellen Wachstums im PCR Ansatz) wurden für beide Gene auf frei-schwimmenden (F) und amöboiden (A) Zellen nach 5, 20 und 60 min in biologischen (Indikator 1) und technischen (Indikator 2) Triplikaten ermittelt. Auf Basis einer zuvor erstellten Eichgerade konnten mit der Anzahl der Transkripte und der Anzahl exprimierter Homologe der Gene die Gesamtanzahl errechnet werden. Schließlich erfolgte die Berechnung des Durchschnitts und der Standardabweichung.

Gen	Probe	Indikator 1	Indikator 2	Ct	Anzahl Transkript	Gesamtanzahl Transkripte	Durchschnitt	Standardabweichung
40S	F	Bio1	Tech1	14,57	159.502	797.511		
40S	F	Bio1	Tech2	14,99	117.830	589.151		
40S	F	Bio1	Tech3	14,71	144.188	720.941		
40S	F	Bio2	Tech1	14,29	195.182	975.909		
40S	F	Bio2	Tech2	14,5	167.759	838.793	748.500	131.266
40S	F	Bio2	Tech3	14,45	173.916	869.582		
40S	F	Bio3	Tech1	14,75	140.089	700.447		
40S	F	Bio3	Tech2	14,95	121.278	606.390		
40S	F	Bio3	Tech3	14,88	127.556	637.779		
40S	A5	Bio1	Tech1	14,41	179.005	895.025		
40S	A5	Bio1	Tech2	14,45	173.916	869.582		
40S	A5	Bio1	Tech3	14,62	153.855	769.273		
40S	A5	Bio2	Tech1	14,62	153.855	769.273		
40S	A5	Bio2	Tech2	14,72	143.152	715.762	801.495	94.491
40S	A5	Bio2	Tech3	14,57	159.502	797.511		
40S	A5	Bio3	Tech1	14,4	180.300	901.502		
40S	A5	Bio3	Tech2	14,92	123.930	619.648		
40S	A5	Bio3	Tech3	14,44	175.175	875.874		
40S	A20	Bio1	Tech1	14,23	203.811	1.019.053		
40S	A20	Bio1	Tech2	14,35	186.919	934.593		
40S	A20	Bio1	Tech3	14,27	198.017	990.084		
40S	A20	Bio2	Tech1	14,08	227.088	1.135.440		
40S	A20	Bio2	Tech2	14,16	214.361	1.071.803	1.050.724	80.668
40S	A20	Bio2	Tech3	14,17	212.821	1.064.103		
40S	A20	Bio3	Tech1	14	240.571	1.202.856		
40S	A20	Bio3	Tech2	14,2	208.267	1.041.334		
40S	A20	Bio3	Tech3	14,26	199.450	997.248		
40S	A60	Bio1	Tech1	13,97	245.831	1.229.157		
40S	A60	Bio1	Tech2	13,9	258.556	1.292.782		
40S	A60	Bio1	Tech3	13,88	262.312	1.311.559		
40S	A60	Bio2	Tech1	13,95	249.402	1.247.009	1.153.490	156.521
40S	A60	Bio2	Tech2	13,97	245.831	1.229.157		
40S	A60	Bio3	Tech1	14,39	181.605	908.025		
40S	A60	Bio3	Tech2	14,2	208.267	1.041.334		
40S	A60	Bio3	Tech3	14,3	193.780	968.899		
<i>TvFIM1</i>	T	Bio1	Tech1	17,41	70.474	70.474		
<i>TvFIM1</i>	T	Bio1	Tech2	17,33	74.460	74.460		
<i>TvFIM1</i>	T	Bio1	Tech3	17,37	72.440	72.440		
<i>TvFIM1</i>	T	Bio2	Tech1	17,24	79.215	79.215	66.804	9.703
<i>TvFIM1</i>	T	Bio2	Tech2	17,65	59.751	59.751		
<i>TvFIM1</i>	T	Bio2	Tech3	17,53	64.891	64.891		
<i>TvFIM1</i>	T	Bio3	Tech1	17,34	73.950	73.950		
<i>TvFIM1</i>	T	Bio3	Tech2	17,76	55.397	55.397		
<i>TvFIM1</i>	T	Bio3	Tech3	17,89	50.659	50.659		
<i>TvFIM1</i>	A5	Bio1	Tech1	17,47	67.625	67.625		

TvFIM1	A5	Bio1	Tech2	17,34	73.950	73.950		
TvFIM1	A5	Bio1	Tech3	17,48	67.162	67.162		
TvFIM1	A5	Bio2	Tech1	17,42	69.991	69.991		
TvFIM1	A5	Bio2	Tech2	17,38	71.943	71.943	72.989	6.106
TvFIM1	A5	Bio2	Tech3	17,43	69.511	69.511		
TvFIM1	A5	Bio3	Tech1	17,16	83.695	83.695		
TvFIM1	A5	Bio3	Tech2	17,18	82.552	82.552		
TvFIM1	A5	Bio3	Tech3	17,41	70.474	70.474		
TvFIM1	A20	Bio1	Tech1	17,55	64.005	64.005		
TvFIM1	A20	Bio1	Tech2	17,26	78.133	78.133		
TvFIM1	A20	Bio1	Tech3	17,27	77.597	77.597		
TvFIM1	A20	Bio2	Tech1	17,32	74.974	74.974		
TvFIM1	A20	Bio2	Tech2	17,09	87.823	87.823	78.139	7.932
TvFIM1	A20	Bio2	Tech3	17,05	90.273	90.273		
TvFIM1	A20	Bio3	Tech1	17,39	71.450	71.450		
TvFIM1	A20	Bio3	Tech2	17,26	78.133	78.133		
TvFIM1	A20	Bio3	Tech3	17,21	80.866	80.866		
TvFIM1	A60	Bio1	Tech1	17,12	86.030	86.030		
TvFIM1	A60	Bio1	Tech2	17,41	70.474	70.474		
TvFIM1	A60	Bio1	Tech3	17,15	84.273	84.273		
TvFIM1	A60	Bio2	Tech1	17,13	85.440	85.440		
TvFIM1	A60	Bio2	Tech2	17,28	77.065	77.065	81.641	5.197
TvFIM1	A60	Bio2	Tech3	17,12	86.030	86.030		
TvFIM1	A60	Bio3	Tech1	17,23	79.761	79.761		
TvFIM1	A60	Bio3	Tech2	17,15	84.273	84.273		
TvFIM1	A60	Bio3	Tech3	17,2	81.424	81.424		

Tabelle 7.4 Matrix der Aminosäuresequenz-Identität in Prozent für die acht Centrin Homologe in *Trichomonas vaginalis*. Werte wurden mit Clustal Omega ermittelt (Sievers et al. 2011).

	TvCEN6	TvCEN7	TvCEN8	TvCEN3	TvCEN1	TvCEN5	TvCEN2	TvCEN4
TvCEN6	100,00%	38,62%	24,83%	22,07%	22,76%	20,69%	20,83%	24,83%
TvCEN7	38,62%	100,00%	27,21%	19,73%	23,13%	17,69%	18,49%	21,09%
TvCEN8	24,83%	27,21%	100,00%	28,29%	28,95%	27,92%	30,07%	31,17%
TvCEN3	22,07%	19,73%	28,29%	100,00%	28,29%	35,00%	36,94%	37,18%
TvCEN1	22,76%	23,13%	28,95%	28,29%	100,00%	36,18%	35,76%	37,50%
TvCEN5	20,69%	17,69%	27,92%	35,00%	36,18%	100,00%	36,81%	37,97%
TvCEN2	20,83%	18,49%	30,07%	36,94%	35,76%	36,81%	100,00%	48,10%
TvCEN4	24,83%	21,09%	31,17%	37,18%	37,50%	37,97%	48,10%	100,00%

Tabelle 7.5 Identifizierte Proteine über sequenzierte Peptide der eluierten Proben der Affinitätschromatographie nach Nicht-Zytoskelett-Funktion gefiltert. Die Sequenzierung erfolgte über MALDI-TOF im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum. Dargestellt sind die TVAG-Nummern nach TrichDB, die Annotierung des Proteins bzw. die über BLAST gefundenen Homologien und die entsprechenden PSM-Werte (*peptide spectrum match*), welche die Abundanz der Proteine innerhalb der Proben repräsentieren. Die Sequenzierung wurde für die Proben TvAKT1::HA freischwimmend und amöboid, gefolgt von einer HA-Kontrolle (TVAG_562550::HA) durchgeführt. Schließlich ist das Molekulargewicht (MW) in kDa angezeigt.

TVAG-Nummer	Annotierung	#PSM frei-schwimmend	#PSM amöboid	#PSM HA-Kontrolle	MW [kDa]
TVAG_198110	PFOR	4	17	2	127,9
TVAG_340290	Malic enzyme		8		63,2
TVAG_276410	Transcriptional factor		7		93,3
TVAG_412220	Malic enzyme		7		62,9
TVAG_264700	Ubiquitin		6		26
TVAG_054830	phosphoglucomutase		4		65,8
TVAG_071700	50S ribosomal protein		4		46,8
TVAG_013320	Translational factor		3		27,9
TVAG_128790	60S ribosomal protein		3		40,2
	NADH-ubiquinone				
TVAG_037570	oxidoreductase		2		65
TVAG_049830	disulfide oxidoreductase		2		94,9
	glucose-6-phosphate				
TVAG_061930	isomerase		2		61,1
TVAG_142060	40S ribosomal protein		2		28,1
TVAG_144730	succinate thiokinase		2		43,8
TVAG_153560	heat shock protein		2		83,6
TVAG_185160	60S ribosomal protein		2		21
TVAG_267950	lysyl-tRNA synthetase		2		60,9
TVAG_324980	ATP synthase		2		55,6
TVAG_364620	PFK		2		46,6
TVAG_395550	Acetyl-CoA hydrolase		2		57,2
TVAG_420260	ATP synthase		2		67,9

8 Literaturverzeichnis

- Addis MF, Rappelli P, Delogu G, Carta F, Cappuccinelli P, Fiori PL. 1998. Cloning and molecular characterization of a cDNA clone coding for *Trichomonas vaginalis* alpha-Actinin and intracellular localization of the protein. *Infect Immun* **66**(10):4924-31.
- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S und andere. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**(5):399-451.
- Alderete JF, Demes P, Gombosova A, Valent M, Yanoska A, Fabusova H, Kasmala L, Garza GE, Metcalfe EC. 1987. Phenotypes and protein-epitope phenotypic variation among fresh isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* **55**(5):1037-41.
- Alsmark C, Foster PG, Sicheritz-Ponten T, Nakjang S, Embley TM, Hirt RP. 2013. Patterns of prokaryotic lateral gene transfers affecting parasitic microbial eukaryotes. *Genome Biol* **14**(2):R19.
- Alsmark UC, Sicheritz-Ponten T, Foster PG, Hirt RP, Embley TM. 2009. Horizontal gene transfer in eukaryotic parasites: a case study of *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Methods Mol Biol* **532**:489-500.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3):403-10.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**(17):3389-402.
- Arroyo R, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo A, Alderete JF. 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol* **7**(2):299-309.
- Aschenbroich J. 2012. Expression und Untersuchung fluoreszierender Markerproteine in *Trichomonas vaginalis*. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Aurrecochea C, Brestelli J, Brunk BP, Carlton JM, Dommer J, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gingle A, Grant G und andere. 2009. GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue):D526-30.

- Axelrod D, Thompson NL, Burghardt TP.** 1983. Total internal inflection fluorescent microscopy. *J Microsc* **129**(Pt 1):19-28.
- Baron AT, Errabolu R, Dinusson J, Salisbury JL.** 1995. Centrin-based contractile fibers: chromatographic purification of centrin. *Methods Cell Biol* **47**:341-51.
- Basu R, Chang F.** 2007. Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips. *Curr Opin Cell Biol* **19**(1):88-94.
- Baum J, Tonkin CJ, Paul AS, Rug M, Smith BJ, Gould SB, Richard D, Pollard TD, Cowman AF.** 2008. A malaria parasite formin regulates actin polymerization and localizes to the parasite-erythrocyte moving junction during invasion. *Cell Host Microbe* **3**(3):188-98.
- Baum P, Furlong C, Byers B.** 1986. Yeast gene required for spindle pole body duplication: homology of its product with Ca²⁺-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(15):5512-6.
- Beck JR, Rodriguez-Fernandez IA, de Leon JC, Huynh MH, Carruthers VB, Morrisette NS, Bradley PJ.** 2010. A novel family of *Toxoplasma* IMC proteins displays a hierarchical organization and functions in coordinating parasite division. *PLoS Pathog* **6**(9):e1001094.
- Beisson J, Wright M.** 2003. Basal body/centriole assembly and continuity. *Curr Opin Cell Biol* **15**(1):96-104.
- Belpaire IM, Bindels F, Corvini P, Gerin PA.** 2005. Method for monitoring the fate of green fluorescent protein added to aerobic and anaerobic wastewater sludge. *Water Res* **39**(20):4933-40.
- Benchimol M.** 2004. Trichomonads under microscopy. *Microsc Microanal* **10**(5):528-50.
- Benchimol M.** 2010. The mastigont system in trichomonads. In: de Souza W, editor. *Structures and organelles in pathogenic protists*. Springer:1-26.
- Benchimol M, de Andrade Rosa I, da Silva Fontes R, Burla Dias AJ.** 2008. *Trichomonas* adhere and phagocytose sperm cells: adhesion seems to be a prominent stage during interaction. *Parasitol Res* **102**(4):597-604.
- Benchimol M, de Souza W.** 1995. Carbohydrate involvement in the association of a prokaryotic cell with *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res* **81**(6):459-64.
- Berepiki A, Lichius A, Read ND.** 2011. Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat Rev Microbiol* **9**(12):876-87.

-
- Bidmon B, Endemann M, Muller T, Arbeiter K, Herkner K, Aufricht C.** 2002. HSP-25 and HSP-90 stabilize Na,K-ATPase in cytoskeletal fractions of ischemic rat renal cortex. *Kidney Int* **62**(5):1620-7.
- Bogdan S, Schultz J, Grosshans J.** 2013. Formin' cellular structures: physiological roles of Diaphanous (Dia) in actin dynamics. *Commun Integr Biol* **6**(6):e27634.
- Boguski MS, Lowe TM, Tolstoshev CM.** 1993. dbEST–database for "expressed sequence tags". *Nat Genet* **4**(4):332-3.
- Bosanquet DC, Ye L, Harding KG, Jiang WG.** 2014. FERM family proteins and their importance in cellular movements and wound healing (review). *Int J Mol Med* **34**(1):3-12.
- Boyle JP, Wu XJ, Shoemaker CB, Yoshino TP.** 2003. Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol Biochem Parasitol* **128**(2):205-15.
- Brás XP, Zimorski V, Bolte K, Maier UG, Martin WF, Gould SB.** 2013. Knockout of the abundant *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal membrane protein TvHMP23 increases hydrogenosome size but induces no compensatory up-regulation of paralogous copies. *FEBS Lett* **587**(9):1333-9.
- Bricheux G, Brugerolle G.** 1997. Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. *FEMS Microbiol Lett* **153**(1):205-13.
- Bricheux G, Coffe G, Bayle D, Brugerolle G.** 2000. Characterization, cloning and immunolocalization of a coronin homologue in *Trichomonas vaginalis*. *Eur J Cell Biol* **79**(6):413-22.
- Bricheux G, Coffe G, Brugerolle G.** 2007. Identification of a new protein in the centrosome-like "atractophore" of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* **153**(2):133-40.
- Bricheux G, Coffe G, Pradel N, Brugerolle G.** 1998. Evidence for an uncommon alpha-actinin protein in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* **95**(2):241-9.
- Brown NH.** 2008. Spectraplakins: the cytoskeleton's Swiss army knife. *Cell* **135**(1):16-8.
- Brugerolle G.** 1991. Flagellar and cytoskeletal systems in amitochondrial flagellates: Archamoeba, Metamonada and Parabasala. *Protoplasma* **164**(1-3):70-90.
- Brugerolle G.** 2005. Amoeboid stage of *Gigantomonas herculea* (Parabasalia) attached to the hindgut of the termite host *Hodotermes mossambicus*. *Acta Protozoologica* **44**:285-288.

- Brugerolle G, Bricheux G, Coffe G.** 1996. Actin cytoskeleton demonstration in *Trichomonas vaginalis* and in other trichomonads. *Biol Cell* **88**(1-2):29-36.
- Brugerolle G, Bricheux G, Coffe G.** 2000. Centrin protein and genes in *Trichomonas vaginalis* and close relatives. *J Eukaryot Microbiol* **47**(2):129-38.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL und andere.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**(4):611-22.
- Butler B, Cooper JA.** 2009. Distinct roles for the actin nucleators Arp2/3 and hDia1 during NK-mediated cytotoxicity. *Curr Biol* **19**(22):1886-96.
- Cabantous S, Waldo GS.** 2006. In vivo and in vitro protein solubility assays using split GFP. *Nat Methods* **3**(10):845-54.
- Calla-Choque JS, Figueroa-Angulo EE, Avila-Gonzalez L, Arroyo R.** 2014. alpha-Actinin TvACTN3 of *Trichomonas vaginalis* is an RNA-binding protein that could participate in its posttranscriptional iron regulatory mechanism. *Biomed Res Int* **2014**:424767.
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UC, Besteiro S und andere.** 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* **315**(5809):207-12.
- Casta e Silva Filho F, de Souza W, Lopes JD.** 1988. Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21):8042-6.
- Castanon MJ, Walko G, Winter L, Wiche G.** 2013. Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve. *Histochem Cell Biol* **140**(1):33-53.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC.** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**(5148):802-5.
- Chazin WJ.** 2011. Relating form and function of EF-hand calcium binding proteins. *Acc Chem Res* **44**(3):171-9.
- Chen WL, Chen JF, Zhong XR, Liang P, Lin W.** 2004. Ultrastructural and immunohistochemical studies on *Trichomonas vaginalis* adhering to and phagocytizing genitourinary epithelial cells. *Chin Med J (Engl)* **117**(3):376-81.

- Cheng D, Marner J, Rubenstein PA.** 1999. Interaction in vivo and in vitro between the yeast fimbrin, SAC6P, and a polymerization-defective yeast actin (V266G and L267G). *J Biol Chem* **274**(50):35873-80.
- Clark CG, Diamond LS.** 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* **15**(3):329-41.
- Cleveland DW.** 1982. Treadmilling of tubulin and actin. *Cell* **28**(4):689-91.
- Collins TJ.** 2007. ImageJ for microscopy. *Biotechniques* **43**(1 Suppl):25-30.
- Conrad MD, Bradic M, Warring SD, Gorman AW, Carlton JM.** 2013. Getting trichy: tools and approaches to interrogating *Trichomonas vaginalis* in a post-genome world. *Trends Parasitol* **29**(1):17-25.
- Coralli C, Cemazar M, Kanthou C, Tozer GM, Dachs GU.** 2001. Limitations of the reporter green fluorescent protein under simulated tumor conditions. *Cancer Res* **61**(12):4784-90.
- Correa G, Morgado-Diaz JA, Benchimol M.** 2004. Centrin in *Giardia lamblia* - ultrastructural localization. *FEMS Microbiol Lett* **233**(1):91-6.
- Courtemanche N, Lee JY, Pollard TD, Greene EC.** 2013. Tension modulates actin filament polymerization mediated by formin and profilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(24):9752-7.
- Crick FH.** 1953. The packing of alpha-helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **6**:689-697.
- Crouch ML, Alderete JF.** 1999. *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. *Microbiology* **145** (Pt 10):2835-43.
- Crucitti T, Abdellati S, Van Dyck E, Buve A.** 2008. Molecular typing of the actin gene of *Trichomonas vaginalis* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Clin Microbiol Infect* **14**(9):844-52.
- Cui J, Smith TF, Samuelson J.** 2007. Gene expansion in *Trichomonas vaginalis*: a case study on transmembrane cyclases. *Genome Inform* **18**:35-43.
- Curtis BA, Tanifuji G, Burki F, Gruber A, Irimia M, Maruyama S, Arias MC, Ball SG, Gile GH, Hirakawa Y und andere.** 2012. Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* **492**(7427):59-65.
- Dancker P, Low I, Hasselbach W, Wieland T.** 1975. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim Biophys Acta* **400**(2):407-14.

- Dawson SC, Paredez AR.** 2013. Alternative cytoskeletal landscapes: cytoskeletal novelty and evolution in basal excavate protists. *Curr Opin Cell Biol* **25**(1):134-41.
- de Andrade Rosa I, de Souza W, Benchimol M.** 2013. High-resolution scanning electron microscopy of the cytoskeleton of *Tritrichomonas foetus*. *J Struct Biol* **183**(3):412-8.
- de Hostos EL, Bradtke B, Lottspeich F, Guggenheim R, Gerisch G.** 1991. Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *EMBO J* **10**(13):4097-104.
- de Hostos EL, Rehfuess C, Bradtke B, Waddell DR, Albrecht R, Murphy J, Gerisch G.** 1993. *Dictyostelium* mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility. *J Cell Biol* **120**(1):163-73.
- de Miguel N, Riestra A, Johnson PJ.** 2012. Reversible association of tetraspanin with *Trichomonas vaginalis* flagella upon adherence to host cells. *Cell Microbiol* **14**(12):1797-807.
- Deady LE, Todd EM, Davis CG, Zhou JY, Topcagic N, Edelson BT, Ferkol TW, Cooper MA, Muenzer JT, Morley SC.** 2014. L-plastin is essential for alveolar macrophage production and control of pulmonary pneumococcal infection. *Infect Immun* **82**(5):1982-93.
- Delgadillo MG, Liston DR, Niazi K, Johnson PJ.** 1997. Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9):4716-20.
- Demirezen S, Safi Z, Beksac S.** 2000. The interaction of *Trichomonas vaginalis* with epithelial cells, polymorphonuclear leucocytes and erythrocytes on vaginal smears: light microscopic observation. *Cytopathology* **11**(5):326-32.
- Diamond LS.** 1957. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* **43**(4):488-90.
- Didry D, Carlier MF, Pantaloni D.** 1998. Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J Biol Chem* **273**(40):25602-11.
- Dimasuay KG, Lavilla OJ, Rivera WL.** 2013. New hosts of *Simplicimonas similis* and *Trichomitus batrachorum* identified by 18S ribosomal RNA gene sequences. *J Parasitol Res* **2013**:831947.
- Dimasuay KG, Rivera WL.** 2013. Molecular characterization of trichomonads isolated from animal hosts in the Philippines. *Vet Parasitol* **196**(3-4):289-95.

-
- dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* **83**(2):433-73.
- Downing KH, Nogales E. 1998a. New insights into microtubule structure and function from the atomic model of tubulin. *Eur Biophys J* **27**(5):431-6.
- Downing KH, Nogales E. 1998b. Tubulin and microtubule structure. *Curr Opin Cell Biol* **10**(1):16-22.
- Downing KH, Nogales E. 1998c. Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. *Curr Opin Struct Biol* **8**(6):785-91.
- Egarter S, Andenmatten N, Jackson AJ, Whitelaw JA, Pall G, Black JA, Ferguson DJ, Tardieux I, Mogilner A, Meissner M. 2014. The toxoplasma Acto-MyoA motor complex is important but not essential for gliding motility and host cell invasion. *PLoS One* **9**(3):e91819.
- Eichinger L, Lee SS, Schleicher M. 1999. *Dictyostelium* as model system for studies of the actin cytoskeleton by molecular genetics. *Microsc Res Tech* **47**(2):124-34.
- El-Haddad H, Przyborski JM, Kraft LG, McFadden GI, Waller RF, Gould SB. 2013. Characterization of *TtALV2*, an essential charged repeat motif protein of the *Tetrahymena thermophila* membrane skeleton. *Eukaryot Cell* **12**(6):932-40.
- Elmendorf HG, Hayes RD, Srivastava S, Johnson PJ. 2010. New insights into the composition and function of the cytoskeleton in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. In: Graham C, editor. *Anaerobic Parasitic Protozoa, Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press:119-56.
- Elslinger MA, Wachter RM, Hanson GT, Kallio K, Remington SJ. 1999. Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry* **38**(17):5296-301.
- Enright AJ, Van Dongen S, Ouzounis CA. 2002. An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Res* **30**(7):1575-84.
- Fleury-Aubusson A. 2003. "Novel cytoskeletal proteins in protists": introductory remarks. *J Eukaryot Microbiol* **50**(1):3-8.
- Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. 2006. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10):3681-6.
- Frank AM. 2009. A ranking-based scoring function for peptide-spectrum matches. *J Proteome Res* **8**(5):2241-52.

- Fritz-Laylin LK, Assaf ZJ, Chen S, Cande WZ. 2010a. *Naegleria gruberi* de novo basal body assembly occurs via stepwise incorporation of conserved proteins. *Eukaryot Cell* **9**(6):860-5.
- Fritz-Laylin LK, Cande WZ. 2010. Ancestral centriole and flagella proteins identified by analysis of *Naegleria* differentiation. *J Cell Sci* **123**(Pt 23):4024-31.
- Fritz-Laylin LK, Ginger ML, Walsh C, Dawson SC, Fulton C. 2011. The *Naegleria* genome: a free-living microbial eukaryote lends unique insights into core eukaryotic cell biology. *Res Microbiol* **162**(6):607-18.
- Fritz-Laylin LK, Prochnik SE, Ginger ML, Dacks JB, Carpenter ML, Field MC, Kuo A, Paredez A, Chapman J, Pham J und andere. 2010b. The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* **140**(5):631-42.
- Fukui Y. 2002. Mechanistics of amoeboid locomotion: signal to forces. *Cell Biol Int* **26**(11):933-44.
- Galletta BJ, Cooper JA. 2009. Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. *Curr Opin Cell Biol* **21**(1):20-7.
- Garcia AF, Alderete J. 2007. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *BMC Microbiol* **7**:116.
- Gardner MK, Zanic M, Howard J. 2013. Microtubule catastrophe and rescue. *Curr Opin Cell Biol* **25**(1):14-22.
- Gerke V, Weber K. 1983. Isolation and characterization of mammalian villin and fimbrin, the two bundling proteins of the intestinal microvilli. *Eur J Cell Biol* **31**(2):249-55.
- Gershoni JM, Palade GE. 1983. Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* **131**(1):1-15.
- Gold D. 1993. *Trichomonas vaginalis*: strain differences in adhesion to plastic and virulence in vitro and in vivo. *Parasitol Res* **79**(4):309-15.
- Gold D, Ofek I. 1992. Adhesion of *Trichomonas vaginalis* to plastic surfaces: requirement for energy and serum constituents. *Parasitology* **105**(Pt 1):55-62.
- Golsteyn RM, Louvard D, Friederich E. 1997. The role of actin binding proteins in epithelial morphogenesis: models based upon *Listeria* movement. *Biophys Chem* **68**(1-3):73-82.
- Goodenough UW. 1992. Green yeast. *Cell* **70**(4):533-8.

- Gould CJ, Chesarone-Cataldo M, Alioto SL, Salin B, Sagot I, Goode BL.** 2014. *S. cerevisiae* Kelch proteins and Bud14 form a stable 520 kDa Formin-regulatory complex that controls actin cable assembly and cell morphogenesis. *J Biol Chem* **289**(26):18290-301.
- Gould SB, Wöhle C, Kusdian G, Landan G, Tachezy J, Zimorski V, Martin WF.** 2013. Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int J Parasitol* **43**(9):707-19.
- Grassart A, Cheng AT, Hong SH, Zhang F, Zenzer N, Feng Y, Briner DM, Davis GD, Malkov D, Drubin DG.** 2014. Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **205**(5):721-35.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O.** 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**(3):307-21.
- Guschina IA, Harris KM, Maskrey B, Goldberg B, Lloyd D, Harwood JL.** 2009. The microaerophilic flagellate, *Trichomonas vaginalis*, contains unusual acyl lipids but no detectable cardiolipin. *J Eukaryot Microbiol* **56**(1):52-7.
- Hagiwara M, Shinomiya H, Kashihara M, Kobayashi K, Tadokoro T, Yamamoto Y.** 2011. Interaction of activated Rab5 with actin-bundling proteins, L- and T-plastin and its relevance to endocytic functions in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **407**(3):615-9.
- Hanein D, Volkmann N, Goldsmith S, Michon AM, Lehman W, Craig R, DeRosier D, Almo S, Matsudaira P.** 1998. An atomic model of fimbrin binding to F-actin and its implications for filament crosslinking and regulation. *Nat Struct Biol* **5**(9):787-92.
- Hansen MC, Palmer RJ, Jr., Udsen C, White DC, Molin S.** 2001. Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration. *Microbiology* **147**(Pt 5):1383-91.
- Hariadi RF, Cale M, Sivaramakrishnan S.** 2014. Myosin lever arm directs collective motion on cellular actin network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(11):4091-6.
- Heacock CS, Sutherland RM.** 1986. Induction characteristics of oxygen regulated proteins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **12**(8):1287-90.
- Heide K.** 1967. [The chemistry of antibodies]. *Bibl Haematol* **27**:15-33.
- Heim R, Cubitt AB, Tsien RY.** 1995. Improved green fluorescence. *Nature* **373**(6516):663-4.

- Heim R, Prasher DC, Tsien RY.** 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26):12501-4.
- Heukeshoven J, Dernick R.** 1988. Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis* **9**(1):60-1.
- Hirata E, Park D, Sahai E.** 2014. Retrograde flow of cadherins in collective cell migration. *Nat Cell Biol* **16**(7):621-3.
- Hirt RP.** 2013. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sex Transm Infect* **89**(6):439-43.
- Horvathova L, Safarikova L, Basler M, Hrdy I, Campo NB, Shin JW, Huang KY, Huang PJ, Lin R, Tang P und andere.** 2012. Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. *Genome Biol Evol* **4**(10):1017-29.
- Horwitz SB, Shen HJ, He L, Dittmar P, Neef R, Chen J, Schubart UK.** 1997. The microtubule-destabilizing activity of metablastin (p19) is controlled by phosphorylation. *J Biol Chem* **272**(13):8129-32.
- Hrdy I, Hirt RP, Dolezal P, Bardonova L, Foster PG, Tachezy J, Embley TM.** 2004. *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* **432**(7017):618-22.
- Hu K, Johnson J, Florens L, Fraunholz M, Suravajjala S, DiLullo C, Yates J, Roos DS, Murray JM.** 2006. Cytoskeletal components of an invasion machine—the apical complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* **2**(2):e13.
- Huber F, Schnauß J, Rönicke S, Rauch P, Müller K, Fütterer C, Käs J.** 2013. Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue. *Advances in Physics* **62**(1):1-112.
- Ikeda KN, de Graffenried CL.** 2012. Polo-like kinase is necessary for flagellum inheritance in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **125**(Pt 13):3173-84.
- Ishida K, Sekizuka T, Hayashida K, Matsuo J, Takeuchi F, Kuroda M, Nakamura S, Yamazaki T, Yoshida M, Takahashi K und andere.** 2014. Amoebal endosymbiont *Neochlamydia* genome sequence illuminates the bacterial role in the defense of the host amoebae against *Legionella pneumophila*. *PLoS One* **9**(4):e95166.
- Jansen S, Collins A, Yang C, Rebowski G, Svitkina T, Dominguez R.** 2011. Mechanism of actin filament bundling by fascin. *J Biol Chem* **286**(34):30087-96.

-
- Jemilohun PF.** 1998. Isolation and characterization of flagella from *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* **84**(10):800-5.
- Jerka-Dziadosz M, Koll F, Wloga D, Gogendeau D, Garreau de Loubresse N, Ruiz F, Fabczak S, Beisson J.** 2013. A Centrin3-dependent, transient, appendage of the mother basal body guides the positioning of the daughter basal body in *Paramecium*. *Protist* **164**(3):352-68.
- Jesus JB, Vannier-Santos MA, Britto C, Godefroy P, Silva-Filho FC, Pinheiro AA, Rocha-Azevedo B, Lopes AH, Meyer-Fernandes JR.** 2004. *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate. *Parasitol Res* **93**(5):369-77.
- Jones JC, Goldman AE, Yang HY, Goldman RD.** 1985. The organizational fate of intermediate filament networks in two epithelial cell types during mitosis. *J Cell Biol* **100**(1):93-102.
- Katiyar SK, Edlind TD.** 1994. Beta-tubulin genes of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* **64**(1):33-42.
- Kilmartin JV.** 2003. Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J Cell Biol* **162**(7):1211-21.
- Klein MG, Shi W, Ramagopal U, Tseng Y, Wirtz D, Kovar DR, Staiger CJ, Almo SC.** 2004. Structure of the actin crosslinking core of fimbrin. *Structure* **12**(6):999-1013.
- Klumpp DJ, Forrestal SG, Karr JE, Mudge CS, Anderson BE, Schaeffer AJ.** 2002. Epithelial differentiation promotes the adherence of type 1-piliated *Escherichia coli* to human vaginal cells. *J Infect Dis* **186**(11):1631-8.
- Koblenz B, Schoppmeier J, Grunow A, Lechtreck KF.** 2003. Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J Cell Sci* **116**(Pt 13):2635-46.
- Konior K, McCutcheon SM, Buhse HE.** 2009. Subcellular centrin localization within distinct compartments of *Vorticella convallaria*. *Transactions of the Illinois State Academy of Science* **102**:161-174.
- Korenbaum E, Rivero F.** 2002. Calponin homology domains at a glance. *J Cell Sci* **115**(Pt 18):3543-5.
- Kovar DR, Staiger CJ, Weaver EA, McCurdy DW.** 2000. AtFim1 is an actin filament crosslinking protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **24**(5):625-36.
- Kretsinger RH.** 1976. Calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem* **45**:239-66.

- Kumar J, Yu H, Sheetz MP.** 1995. Kinectin, an essential anchor for kinesin-driven vesicle motility. *Science* **267**(5205):1834-7.
- Kusdian G.** 2011. Charakterisierung des putativen Zytoskelettproteins Plastin und Analyse von expressed sequence tags ohne offenem Leserahmen aus *Trichomonas vaginalis*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Kusdian G, Wöhle C, Martin WF, Gould SB.** 2013. The actin-based machinery of *Trichomonas vaginalis* mediates flagellate-amoeboid transition and migration across host tissue. *Cell Microbiol* **15**(10):1707-21.
- Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G.** 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* **47**(1):69-85.
- Lal K, Field MC, Carlton JM, Warwicker J, Hirt RP.** 2005. Identification of a very large Rab GTPase family in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* **143**(2):226-35.
- Lal K, Noël CJ, Field MC, Goulding D, Hirt RP.** 2006. Dramatic reorganisation of *Trichomonas* endomembranes during amoebal transformation: a possible role for G-proteins. *Mol Biochem Parasitol* **148**(1):99-102.
- Lammermann T, Sixt M.** 2009. Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **21**(5):636-44.
- Land KM, Delgadillo-Correa MG, Tachezy J, Vanacova S, Hsieh CL, Sutak R, Johnson PJ.** 2004. Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Mol Microbiol* **51**(1):115-22.
- Laporte D, Ojkic N, Vavylonis D, Wu JQ.** 2012. alpha-Actinin and fimbrin cooperate with myosin II to organize actomyosin bundles during contractile-ring assembly. *Mol Biol Cell* **23**(16):3094-110.
- Lauwaet T, Smith AJ, Reiner DS, Romijn EP, Wong CC, Davids BJ, Shah SA, Yates JR, 3rd, Gillin FD.** 2011. Mining the *Giardia* genome and proteome for conserved and unique basal body proteins. *Int J Parasitol* **41**(10):1079-92.
- Lehtreck KF, Grunow A.** 1999. Evidence for a direct role of nascent basal bodies during spindle pole initiation in the green alga *Spermatozopsis similis*. *Protist* **150**(2):163-81.
- Lemullois M, Fryd-Versavel G, Fleury-Aubusson A.** 2004. Localization of centrins in the hypotrich ciliate *Paraurostyla weissei*. *Protist* **155**(3):331-46.

-
- Li W, Ding H, Zhang X, Cao L, Li J, Gong P, Li H, Zhang G, Li S, Zhang X. 2012. The viral RNA-based transfection of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* **110**(3):1305-10.
- Lim FY, Koon YL, Chiam KH. 2013. A computational model of amoeboid cell migration. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* **16**(10):1085-95.
- Lingle WL, Salisbury JL. 1997. Centrin and the cytoskeleton of the protist *Holomastigotoides*. *Cell Motil Cytoskeleton* **36**(4):377-90.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method. *Methods* **25**(4):402-8.
- Lowe J, Amos LA. 2009. Evolution of cytomotive filaments: the cytoskeleton from prokaryotes to eukaryotes. *Int J Biochem Cell Biol* **41**(2):323-9.
- Lu Y, Xie L, Chen J. 2012. A novel procedure for absolute real-time quantification of gene expression patterns. *Plant Methods* **8**:9.
- Lustig G, Ryan CM, Secor WE, Johnson PJ. 2013. *Trichomonas vaginalis* contact-dependent cytolysis of epithelial cells. *Infect Immun* **81**(5):1411-9.
- Lynn DH, Small EB. 1981. Protist kinetids: structural conservatism, kinetid structure, and ancestral states. *Biosystems* **14**(3-4):377-85.
- Maniak M, Rauchenberger R, Albrecht R, Murphy J, Gerisch G. 1995. Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* **83**(6):915-24.
- Mar J, Walsh CJ. 2008. Temperature-shock induction of multiple flagella induces additional synthesis of flagellum specific mRNAs and tubulin. *Exp Cell Res* **314**(4):896-902.
- Marino N, Marshall JC, Collins JW, Zhou M, Qian Y, Veenstra T, Steeg PS. 2013. Nm23-h1 binds to gelsolin and inactivates its actin-severing capacity to promote tumor cell motility and metastasis. *Cancer Res* **73**(19):5949-62.
- Maritz J, Land KM, Carlton JM, Hirt RP. 2014. What is the importance of zoonotic trichomonads for human health? *Trends Parasitol* **30**(7):333-341.
- Martin W, Müller M. 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**(6671):37-41.

- Martincova E, Voleman L, Najdrova V, De Napoli M, Eshar S, Gualdron M, Hopp CS, Sanin DE, Tembo DL, Van Tyne D und andere. 2012. Live imaging of mitosomes and hydrogenosomes by HaloTag technology. *PLoS One* 7(4):e36314.
- Matouskova J, Janda M, Fiser R, Sasek V, Kocourkova D, Burketova L, Duskova J, Martinec J, Valentova O. 2014. Changes in actin dynamics are involved in salicylic acid signaling pathway. *Plant Sci* 223:36-44.
- Matsuzaki M, Misumi O, Shin IT, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Nishida K und andere. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428(6983):653-7.
- Mazumdar M, Mikami A, Gee MA, Vallee RB. 1996. In vitro motility from recombinant dynein heavy chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13):6552-6.
- Meade JC, Shah PH, Lushbaugh WB. 1997. *Trichomonas vaginalis*: analysis of codon usage. *Exp Parasitol* 87(1):73-4.
- Meissner M, Schluter D, Soldati D. 2002. Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science* 298(5594):837-40.
- Melkonian M, Beech PL, Katsaros C, Schulze D. 1992. Centrin-mediated cell motility in algae. *Algal Cell Motility Current Phycology*:179-221.
- Mesa CP, Stabler RM, Berthrong M. 1961. Histopathological changes in the domestic pigeon infected with *Trichomonas gallinae* (Jones' Barn Strain). *Avian Diseases*: 5(1):48-60.
- Meza I, Talamas-Rohana P, Vargas MA. 2006. The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. *Arch Med Res* 37(2):234-43.
- Meza-Cervantez P, Gonzalez-Robles A, Cardenas-Guerra RE, Ortega-Lopez J, Saavedra E, Pineda E, Arroyo R. 2011. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology* 157(Pt 12):3469-82.
- Miroux B, Walker JE. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260(3):289-98.
- Mohri H, Inaba K, Ishijima S, Baba SA. 2012. Tubulin-dynein system in flagellar and ciliary movement. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 88(8):397-415.

- Monahan L, Harry E. 2009. The bacterial cytoskeleton. *Australian Biochemist* **40**(2):4-8.
- Morley SC. 2013. The actin-bundling protein L-plastin supports T-cell motility and activation. *Immunol Rev* **256**(1):48-62.
- Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ und andere. 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* **317**(5846):1921-6.
- Müller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, Yu RY, van der Giezen M, Tielens AG, Martin WF. 2012. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**(2):444-95.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* **24**:17-27.
- Namba Y, Ito M, Zu Y, Shigesada K, Maruyama K. 1992. Human T cell L-plastin bundles actin filaments in a calcium-dependent manner. *J Biochem* **112**(4):503-7.
- Naydenov NG, Ivanov AI. 2011. Spectrin-adducin membrane skeleton: A missing link between epithelial junctions and the actin cytoskeleton? *Bioarchitecture* **1**(4):186-191.
- Ni X, Li X, Tao S, Xu M, Ma H, Wang X. 2013. Blockade of ankyrin repeat-rich membrane spanning protein modulates extracellular signal-regulated kinase expression and inhibits allergic inflammation in ovalbumin-sensitized mice. *Biomed Rep* **1**(4):674-678.
- Nicklas RB, Koch CA. 1969. Chromosome micromanipulation. 3. Spindle fiber tension and the reorientation of mal-oriented chromosomes. *J Cell Biol* **43**(1):40-50.
- Nishiuchi Y, Inui T, Nishio H, Bodi J, Kimura T, Tsuji FI, Sakakibara S. 1998. Chemical synthesis of the precursor molecule of the *Aequorea* green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23):13549-54.
- Nobes CD, Hall A. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**(1):53-62.
- Noël CJ, Gerbod D, Delgado-Viscogliosi P, Fast NM, Younes AB, Chose O, Roseto A, Capron M, Viscogliosi E. 2003. Morphogenesis during division and griseofulvin-induced changes of the microtubular cytoskeleton in the parasitic protist, *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* **89**(6):487-94.

- Noël CJ, Diaz N, Sicheritz-Ponten T, Safarikova L, Tachezy J, Tang P, Fiori PL, Hirt RP. 2010. *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics* **11**:99.
- Oakley BR, Oakley CE, Yoon Y, Jung MK. 1990. Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **61**(7):1289-301.
- Okumura CY, Baum LG, Johnson PJ. 2008. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol* **10**(10):2078-90.
- Omary MB, Coulombe PA, McLean WH. 2004. Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* **351**(20):2087-100.
- Ong SJ, Hsu HM, Liu HW, Chu CH, Tai JH. 2007. Activation of multifarious transcription of an adhesion protein ap65-1 gene by a novel Myb2 protein in the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem* **282**(9):6716-25.
- Oshima RG. 2007. Intermediate filaments: a historical perspective. *Exp Cell Res* **313**(10):1981-94.
- Palm D, Weiland M, McArthur AG, Winiecka-Krusnell J, Cipriano MJ, Birkeland SR, Pacocha SE, Davids B, Gillin F, Linder E und andere. 2005. Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol Biochem Parasitol* **141**(2):199-207.
- Paoletti A, Moudjou M, Paintrand M, Salisbury JL, Bornens M. 1996. Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J Cell Sci* **109**(Pt 13):3089-102.
- Paredez AR, Assaf ZJ, Sept D, Timofejeva L, Dawson SC, Wang CJ, Cande WZ. 2011. An actin cytoskeleton with evolutionarily conserved functions in the absence of canonical actin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(15):6151-6.
- Paredez AR, Nayeri A, Xu JW, Krtkova J, Cande WZ. 2014. Identification of obscure yet conserved actin-associated proteins in *Giardia lamblia*. *Eukaryot Cell* **13**(6):776-84.
- Parrish RG, Mommaerts WF. 1954. Studies on myosin. II. Some molecular-kinetic data. *J Biol Chem* **209**(2):901-13.
- Pereira-Neves A, Benchimol M. 2007. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell* **99**(2):87-101.

-
- Pereira-Neves A, Benchimol M.** 2009. *Trichomonas foetus*: budding from multinucleated pseudocysts. *Protist* **160**(4):536-51.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L.** 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**(9):e36.
- Phizicky EM, Fields S.** 1995. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* **59**(1):94-123.
- Piña-Vázquez C, Reyes-Lopez M, Ortiz-Estrada G, de la Garza M, Serrano-Luna J.** 2012. Host-parasite interaction: parasite-derived and -induced proteases that degrade human extracellular matrix. *J Parasitol Res* **2012**:748206.
- Pochon-Masson J.** 1967. [Structure and function of cellular intrastuctures called microtubules]. *Annee Biol* **6**(7):361-90.
- Pollard TD.** 2010. A guide to simple and informative binding assays. *Mol Biol Cell* **21**(23):4061-7.
- Pollard TD, Cooper JA.** 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem* **55**:987-1035.
- Prassler J, Stocker S, Marriott G, Heidecker M, Kellermann J, Gerisch G.** 1997. Interaction of a *Dictyostelium* member of the plastin/fimbrin family with actin filaments and actin-myosin complexes. *Mol Biol Cell* **8**(1):83-95.
- Price DC, Chan CX, Yoon HS, Yang EC, Qiu H, Weber AP, Schwacke R, Gross J, Blouin NA, Lane C und andere.** 2012. *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science* **335**(6070):843-7.
- Pringle JR, Adams AEM, Drubin DG, Haarer BK.** 1991. Immunofluorescence methods for yeast. In: Guthrie C, editor. *Guide to yeast genetics and molecular biology*. Elsevier Academic Press:565-602.
- Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR.** 2007. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* **35**(Database issue):D61-5.
- Putz S, Gelius-Dietrich G, Piotrowski M, Henze K.** 2005. Rubrerythrin and peroxiredoxin: two novel putative peroxidases in the hydrogenosomes of the microaerophilic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* **142**(2):212-23.

- Ralston KS, Lerner AG, Diener DR, Hill KL. 2006. Flagellar motility contributes to cytokinesis in *Trypanosoma brucei* and is modulated by an evolutionarily conserved dynein regulatory system. *Eukaryot Cell* 5(4):696-711.
- Rao TC, Passmore DR, Peleman AR, Das M, Chapman ER, Anantharam A. 2014. Isoform-specific roles of synaptotagmins in dense core granule exocytosis. *Mol Biol Cell* 2014:E14-02-0702.
- Rendon-Maldonado JG, Espinosa-Cantellano M, Gonzalez-Robles A, Martinez-Palomo A. 1998. *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp Parasitol* 89(2):241-50.
- Reymann AC, Boujemaa-Paterski R, Martiel JL, Guerin C, Cao W, Chin HF, De La Cruz EM, Theyry M, Blanchoin L. 2012. Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science* 336(6086):1310-4.
- Ribeiro KC, Arnholdt AC, Benchimol M. 2002a. *Tritrichomonas foetus*: induced division synchrony by hydroxyurea. *Parasitol Res* 88(7):627-31.
- Ribeiro KC, Monteiro-Leal LH, Benchimol M. 2000. Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol* 47(5):481-92.
- Ribeiro KC, Pereira-Neves A, Benchimol M. 2002b. The mitotic spindle and associated membranes in the closed mitosis of trichomonads. *Biol Cell* 94(3):157-72.
- Rice P, Longden I, Bleasby A. 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16(6):276-7.
- Richards TA, Cavalier-Smith T. 2005. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 436(7054):1113-8.
- Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z und andere. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5(7):605-7.
- Rogers SL, Gelfand VI. 1998. Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Curr Biol* 8(3):161-4.
- Runde K. 2013. Charakterisierung von Profilin in *Trichomonas vaginalis*. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität.
- Ryan CM, de Miguel N, Johnson PJ. 2011. *Trichomonas vaginalis*: current understanding of host-parasite interactions. *Essays Biochem* 51:161-75.

-
- Salisbury JL.** 1995. Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr Opin Cell Biol* 7(1):39-45.
- Salisbury JL.** 2004. Centrosomes: Sfi1p and centrin unravel a structural riddle. *Curr Biol* 14(1):R27-9.
- Salisbury JL, Baron A, Surek B, Melkonian M.** 1984. Striated flagellar roots: isolation and partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle. *J Cell Biol* 99(3):962-70.
- Salisbury JL, Baron AT, Sanders MA.** 1988. The centrin-based cytoskeleton of *Chlamydomonas reinhardtii*: distribution in interphase and mitotic cells. *J Cell Biol* 107(2):635-41.
- Sambrook T, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. A laboratory manual. In: Green MR, editor. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Sanders MA, Salisbury JL.** 1994. Centrin plays an essential role in microtubule severing during flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 124(5):795-805.
- Santos JM, Lebrun M, Daher W, Soldati D, Dubremetz JF.** 2009. Apicomplexan cytoskeleton and motors: key regulators in morphogenesis, cell division, transport and motility. *Int J Parasitol* 39(2):153-62.
- Schroeder TE.** 1973. Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(6):1688-92.
- Schwebke JR, Barrientes FJ.** 2006. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 50(12):4209-10.
- Serrano-Pertierra E, Cernuda-Morollon E, Brdicka T, Hooeysi V, Lopez-Larrea C.** 2014. L-plastin is involved in NKG2D recruitment into lipid rafts and NKG2D-mediated NK cell migration. *J Leukoc Biol* 2014: ahead of print.
- Sharp DJ, Ross JL.** 2012. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *J Cell Sci* 125(Pt 11):2561-9.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y.** 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59:223-39.
- Shinomiya H.** 2012. Plastin family of actin-bundling proteins: its functions in leukocytes, neurons, intestines, and cancer. *Int J Cell Biol* 2012:213492.

- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J und andere.** 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539.
- Silver P.** 2009. Indirect immunofluorescence labeling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Protoc* 2009(11):pdb prot5317.
- Singh P, Rathinasamy K, Mohan R, Panda D.** 2008. Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs. *IUBMB Life* 60(6):368-75.
- Sjoblom B, Salmazo A, Djinovic-Carugo K.** 2008. Alpha-Actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65(17):2688-701.
- Skau CT, Courson DS, Bestul AJ, Winkelman JD, Rock RS, Sirotkin V, Kovar DR.** 2011. Actin filament bundling by fimbrin is important for endocytosis, cytokinesis, and polarization in fission yeast. *J Biol Chem* 286(30):26964-77.
- Skillman KM, Diraviyam K, Khan A, Tang K, Sept D, Sibley LD.** 2011. Evolutionarily divergent, unstable filamentous actin is essential for gliding motility in apicomplexan parasites. *PLoS Pathog* 7(10):e1002280.
- Smith A, Johnson P.** 2011. Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Res Microbiol* 162(6):646-54.
- Smith AJ, Chudnovsky L, Simoes-Barbosa A, Delgadillo-Correa MG, Jonsson ZO, Wohlschlegel JA, Johnson PJ.** 2011. Novel core promoter elements and a cognate transcription factor in the divergent unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Mol Cell Biol* 31(7):1444-58.
- Smith KS, Tabrizi SN, Fethers KA, Knox JB, Pearce C, Garland SM.** 2005. Comparison of conventional testing to polymerase chain reaction in detection of *Trichomonas vaginalis* in indigenous women living in remote areas. *Int J STD AIDS* 16(12):811-5.
- Spang A, Courtney I, Fackler U, Matzner M, Schiebel E.** 1993. The calcium-binding protein cell division cycle 31 of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the half bridge of the spindle pole body. *J Cell Biol* 123(2):405-16.
- Spector I, Shochet NR, Blasberger D, Kashman Y.** 1989. Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 13(3):127-44.
- Sprague GF, Jr., Winans SC.** 2006. Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes Dev* 20(9):1045-9.

-
- Steinert PM, Cantieri JS, Teller DC, Lonsdale-Eccles JD, Dale BA.** 1981. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(7):4097-101.
- Stockdale HD.** 2008. Biological characterization of *Tritrichomonas foetus* of bovine and feline origin. Dissertation, Auburn University.
- Street DA, Wells C, Taylor-Robinson D, Ackers JP.** 1984. Interaction between *Trichomonas vaginalis* and other pathogenic micro-organisms of the human genital tract. *Br J Vener Dis* **60**(1):31-8.
- Suoizzi KC, Wu X, Fuchs E.** 2012. Spectraplakins: master orchestrators of cytoskeletal dynamics. *J Cell Biol* **197**(4):465-75.
- Sweeney HL, Houdusse A.** 2010a. Myosin VI rewrites the rules for myosin motors. *Cell* **141**(4):573-82.
- Sweeney HL, Houdusse A.** 2010b. Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annu Rev Biophys* **39**:539-57.
- Tai JH, Su HM, Tsai J, Shiao MF, Wang CC.** 1993. The divergence of *Trichomonas vaginalis* virus RNAs among various isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Exp Parasitol* **76**(3):278-86.
- Taillon BE, Adler SA, Suhan JP, Jarvik JW.** 1992. Mutational analysis of centrin: an EF-hand protein associated with three distinct contractile fibers in the basal body apparatus of *Chlamydomonas*. *J Cell Biol* **119**(6):1613-24.
- Takahashi K, Shingyoji C, Kamimura S.** 1982. Microtubule sliding in reactivated flagella. *Symp Soc Exp Biol* **35**:159-77.
- Thews O, Vaupel P.** 1996. Relevant parameters for describing the oxygenation status of solid tumors. *Strahlenther Onkol* **172**(5):239-43.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9):4350-4.
- Tsien RY.** 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**:509-44.
- Twu O, de Miguel N, Lustig G, Stevens GC, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Johnson PJ.** 2013. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate hostratioparasite interactions. *PLoS Pathog* **9**(7):e1003482.

- Vale RD, Reese TS, Sheetz MP. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**(1):39-50.
- Vallee RB, Shpetner HS. 1990. Motor proteins of cytoplasmic microtubules. *Annu Rev Biochem* **59**:909-32.
- 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**(1):23-5.
- Vinson VK, De La Cruz EM, Higgs HN, Pollard TD. 1998. Interactions of *Acanthamoeba* profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry* **37**(31):10871-80.
- Vonderfecht T, Cookson MW, Giddings TH, Jr., Clarissa C, Winey M. 2012. The two human centrin homologues have similar but distinct functions at *Tetrahymena* basal bodies. *Mol Biol Cell* **23**(24):4766-77.
- Walsh CJ. 2007. The role of actin, actomyosin and microtubules in defining cell shape during the differentiation of *Naegleria* amebae into flagellates. *Eur J Cell Biol* **86**(2):85-98.
- Wang K, Singer SJ. 1977. Interaction of filamin with f-actin in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(5):2021-5.
- Watanabe H, Washioka H, Tonosaki A. 1988. Gap junction and its cytoskeletal undercoats as involved in invagination-endocytosis. *Tohoku J Exp Med* **156**(2):175-90.
- Watanabe Y, Hayashi M, Yagi T, Kamiya R. 2004. Turnover of actin in *Chlamydomonas* flagella detected by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Cell Struct Funct* **29**(3):67-72.
- Weerakoon N, Harper JD, Simpson AG, Patterson DJ. 1999. Centrin in the groove: immunolocalisation of centrin and microtubules in the putatively primitive protist *Chilomastix cuspidata* (Retortamonadida). *Protoplasma* **210**:75-84.
- Welch MD, Mullins RD. 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**:247-88.
- Wickstead B, Gull K. 2011. The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol* **194**(4):513-25.
- Windsor JJ, Johnson EH. 1999. *Dientamoeba fragilis*: the unflagellated human flagellate. *Br J Biomed Sci* **56**(4):293-306.

-
- Witke W.** 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol* **14**(8):461-9.
- Xue F, Janzen DM, Knecht DA.** 2010. Contribution of filopodia to cell migration: a mechanical link between protrusion and contraction. *Int J Cell Biol* **2010**:507821.
- Yanagisawa HA, Kamiya R.** 2001. Association between actin and light chains in *Chlamydomonas* flagellar inner-arm dyneins. *Biochem Biophys Res Commun* **288**(2):443-7.
- Yip TT, Hutchens TW.** 1992. Mapping and sequence-specific identification of phosphopeptides in unfractionated protein digest mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *FEBS Lett* **308**(2):149-53.
- Yubuki N, Leander BS.** 2013. Evolution of microtubule organizing centers across the tree of eukaryotes. *Plant J* **75**(2):230-44.
- Zan J, Heindl JE, Liu Y, Fuqua C, Hill RT.** 2013. The CckA-ChpT-CtrA phosphorelay system is regulated by quorum sensing and controls flagellar motility in the marine sponge symbiont *Ruegeria sp.* KLH11. *PLoS One* **8**(6):e66346.
- Zheng Z, Gao T, Zhang Y, Hou Y, Wang J, Zhou M.** 2014. *FgFim*, a key protein regulating resistance to the fungicide JS399-19, asexual and sexual development, stress responses and virulence in *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Pathol* **15**(5):488-99.
- Zhou Y, Frey TK, Yang JJ.** 2009. Viral calciomics: interplays between Ca²⁺ and virus. *Cell Calcium* **46**(1):1-17.
- Zuo Y, Riley DE, Krieger JN.** 1999. Flagellar duplication and migration during the *Trichomonas vaginalis* cell cycle. *J Parasitol* **85**(2):203-7.



Danksagung

Mein erster Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. William Martin für die Möglichkeit der Promotion und für sein bekundetes Interesse an meinen Projekten. Nicht weniger besonders bedanke ich mich bei Dr. Sven Gould für die herausfordernde Themenstellung und die erstklassige Betreuung meiner Arbeit. Seine Motivation, Erfahrung und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen haben meine Arbeit stets begleitet und dadurch bereichert. Beiden danke ich für die Möglichkeit der Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen, die mir sehr viel Freude bereitet haben. Vor allem bedanke ich mich für die exzellenten Arbeitsbedingungen.

Prof. Dr. Peter Jahns danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und die Durchsicht meiner Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Evolution möchte ich für eine lockere, angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Ihre hilfreiche Unterstützung sowohl im Labor als auch in der Bioinformatik waren von großem Wert. Ich hatte mit meinen Kollegen im Laboralltag, bei Konferenzen, Betriebsausflügen und Feiern sehr viel Freude.

Schließlich gilt mein letzter Dank meinen Freunden, meiner Familie und meinem Freund Markus Mays, die mich stets motiviert und begleitet haben.



Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Meine Dissertation wurde weder in der vorliegenden Form noch in ähnlicher Form bei anderen Instituten eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 14.07.2014

Gary Kusdian