

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master's Thesis

陰道滴蟲 ARF 蛋白調控 PIP<sub>2</sub> 訊息之功能探討

The functional study of the ARF protein in regulating

PIP<sub>2</sub> signaling of *Trichomonas vaginalis*

廖偉捷

Wei-Chieh Liao

指導教授：許弘明 博士

Advisor: Hong-Ming Hsu, Ph.D.

中華民國 114 年 11 月

November, 2025

# 誌謝



首先，衷心感謝我的指導教授許弘明老師。在本研究的構思、實驗設計與論文撰寫過程中，老師始終以高度的耐心與嚴謹的學術態度，指引我面對研究中的每一個挑戰。當我在研究過程中陷入瓶頸、遲遲無法前進時，老師總能適時地給予方向，使我得以重新整理思路並穩健地往前邁進。若沒有老師的不吝指教與持續支持，我無法順利完成本篇論文。同時，也感謝我的口試委員孫錦虹老師與許書豪老師。兩位老師在口試與論文審閱過程中提出了許多精準且深具啟發性的建議，使我得以看見自己研究中尚未完善之處，並藉由修正讓論文內容更加扎實與完整。特別感謝吳冠毅學長與譚彥汝學姐。感謝你們手把手教導我各項實驗技術，亦願意分享自己累積的寶貴經驗。無論是技術細節、實驗邏輯，甚至心態調整，你們的協助對我而言都是無可替代的支持。也感謝一路陪伴我修課的同學與好友們，吳祐佳同學、黃健庭同學、潘昱云同學，以及李宥霖學弟。因為彼此互相關照、共同面對困難，我才能順利完成研究所的學習旅程。同時，也感謝藍弘旭助教在課堂上的協助與鼓勵，親切且充滿熱忱的態度感染了我、寄生蟲學實驗課一向是我最期待的時光。最後，感謝父母一路以來給予我無條件的支持、理解與鼓勵，父母的體諒與信任，是我完成碩士學位最堅實的後盾。謹以此文，感謝所有在這段旅程中陪伴、指導與支持我的人。

# 中文摘要



高等真核細胞 ADP ribosylation factor (ARF) 結合三磷酸鳥苷 (Guanosine triphosphate) 成為活化態，是真核細胞中細胞膜運輸與細胞骨架之關鍵調節因子，其功能之一可活化磷脂醯肌醇-4-磷酸 5-激酶 (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, PI4P5K) 並與 PI4P5K 形成複合體共同移動至細胞膜以產生 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)。在陰道滴蟲細胞內，前人發現鐵離子刺激後能活化 ARF6 同源蛋白(*TvARF220*)，與 *TvPI4P5K* 形成複合體促進 PIP<sub>2</sub> 產生，並調控下游鈣離子訊號。本研究目標在探討鐵如何在陰道滴蟲透過活化 *TvARF220* 來調控 PIP<sub>2</sub> 訊息傳導及其下游細胞功能。利用免疫螢光分析發現，*TvPI4P5K* 與 PIP<sub>2</sub> 在陰道滴蟲細胞中共同定位在細胞膜上，並與 *TvARF220* 細胞內分布成正相關。同時，鐵刺激會增加 *TvPI4P5K* 與 *TvARF220* 共同轉移到細胞膜上，趨勢與鐵刺激後細胞膜上 PIP<sub>2</sub> 含量增加一致。相反地，當利用布雷非德菌素 A (brefeldin A, BFA) 抑制陰道滴蟲 *TvARF220* 活化，*TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 共同轉移至細胞膜周邊的趨勢則下降，同時造成細胞膜上 PIP<sub>2</sub> 訊號降低。這些發現表明 *TvARF220* 功能可促進 *TvPI4P5K* 轉移到細胞膜上並增加 PIP<sub>2</sub> 產生。值得注意的是，鈣離子螢光指示劑顯示 BFA 處理造成陰道滴蟲內鈣訊號量降低的同時，也減緩肌動蛋白細胞骨架重組幅度，並造成細胞骨架主導之阿米巴型態遷移能力下降，從而確認 *TvARF220* 可作為 PIP<sub>2</sub> 與鈣離子等訊號的上游因子，最終調控肌動蛋白相關作用。本研究確認 *TvARF220* 作為引導特定蛋白細胞膜定位的關鍵功能，為陰道滴蟲寄生與宿主交互作用時的分子機制提供新見解。

關鍵字：陰道滴蟲；磷脂醯肌醇4,5-雙磷酸；磷脂醯肌醇-4-磷酸5-激酶；ADP核糖基化因子；鐵離子；鈣離子；肌動蛋白

# 英文摘要



Small GTPases of the ADP-ribosylation factor (ARF) family are key regulators of membrane trafficking and cytoskeletal dynamics in eukaryotic cells. In the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*, iron was previously found to activate an ARF6 homolog (*TvARF220*) and trigger its complex formation with *TvPI4P5K*, regulating downstream calcium signaling. This study aims to investigate the mechanism of how iron induces  $PIP_2$  signaling and its downstream cellular functions through *TvARF220* activation in this parasite. Immunofluorescence analysis revealed that the plasma membrane colocalization of *TvPI4P5K* and its lipid product  $PIP_2$  strongly correlated with *TvARF220* cellular distribution. Iron challenge enhanced *TvPI4P5K* and *TvARF220* enrichment at the plasma membrane, coinciding with increased  $PIP_2$  levels. In contrast, ARF inhibitor brefeldin A (BFA) diminished the plasma membrane localization of *TvPI4P5K* and *TvARF220*, resulting in reduced  $PIP_2$  production. These findings suggest that *TvARF220* facilitates *TvPI4P5K* trafficking to the plasma membrane, thereby promoting localized  $PIP_2$  synthesis. Notably, BFA treatment also led to decreased intracellular calcium levels, impaired actin dynamics, and slowed down actin cytoskeleton-dependent amoeboid motility, supporting that *TvARF220* acts upstream of a  $PIP_2$ -calcium axis critical for actin-dependent processes. Together, this study highlights *TvARF220* as a key regulator of membrane-localization signaling, offering new insights into the molecular basis of parasite colonization and host interaction.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, ADP-ribosylation factor, Iron, Calcium, Actin

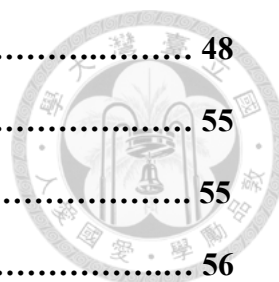
# 目次



口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	iv
第一章、前言.....	1
第一節、陰道滴蟲簡介.....	1
第二節、陰道滴蟲致病機轉.....	2
第三節、陰道滴蟲型態.....	2
第四節、磷脂酰肌醇 4,5-雙磷酸 ( Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP <sub>2</sub> ).....	3
第五節、ADP-ribosylation factor ( ARF, ADP 核糖基化因子 ).....	4
第六節、陰道滴蟲與鐵離子.....	5
第七節、TvARF220 與 BFA.....	5
第八節、實驗目的.....	6
第二章、材料與方法.....	7
第一節、陰道滴蟲蟲株.....	7
1.1 陰道滴蟲種類.....	7
1.2 陰道滴蟲培養.....	7
1.3 備用蟲株存儲與再活化.....	7
1.4 台盼藍生存率測試.....	7
1.5 BFA 處理條件.....	8
第二節、免疫螢光染色 ( Immunofluorescence assay , IFA ).....	8
2.1 活細胞自然貼附.....	8

2.2	PIP <sub>2</sub> 染色前處理.....	8
2.3	抗體作用與封片.....	9
第三節	Calcium green 螢光染色.....	9
第四節	蛋白質聚丙烯醯胺凝膠電泳 (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	10
第五節	西方墨點法 (Western blot assay).....	10
第六節	G-Actin/F-actin In Vivo Assay, 肌動蛋白沉降分萃.....	10
第七節	細胞遷移癒合試驗 (Wound-healing cell migration assay).....	11
第三章	結果.....	12
第一節	人類 ARF6 與陰道滴蟲 ARF220 序列相似度.....	12
第二節	TvARF220, TvPI4P5K 與 PIP <sub>2</sub> 於陰道滴蟲的分布情形.....	12
第三節	BFA 處理之陰道滴蟲生存率比較.....	12
第四節	BFA 對 TvARF220, TvPI4P5K 與 PIP <sub>2</sub> 在陰道滴蟲的細胞膜分布.....	13
第五節	BFA 影響鐵調控 TvPI4P5K 在陰道滴蟲的表現與細胞膜分布.....	13
第六節	BFA 影響陰道滴蟲 PIP <sub>2</sub> 生成量.....	14
第七節	BFA 處理對陰道滴蟲鈣離子的影響.....	14
第八節	BFA 處理對陰道滴蟲 actin 組裝的影響.....	14
第九節	BFA 處理對陰道滴蟲遷移能力的影響.....	15
總結	.....	15
第四章	討論.....	16
第一節	人類 ARF6 與 TvARF220 序列相似.....	16
第二節	PIP <sub>2</sub> 訊號傳遞因子間的關聯性.....	16
第三節	鐵離子的刺激對 PIP <sub>2</sub> 訊息傳遞之影響.....	17
第四節	TvARF220 在 PIP <sub>2</sub> 訊號傳遞中扮演的角色.....	17
第五節	TvARF220 在 PIP <sub>2</sub> 訊號傳遞中對下游鈣離子之影響.....	18
第六節	BFA 對陰道滴蟲細胞爬行能力與 actin 組裝的影響.....	18

參考文獻.....	48
附錄.....	55
附錄一、TYI-S33 培養液.....	55
附錄二、綜合抑制劑與必要成分.....	56
附錄三、抗體.....	57
附錄四、西方墨點法使用溶液.....	58



# 圖次



圖一、 陰道滴蟲 <i>TvARF220</i> 調控 $PIP_2$ 訊息傳導.....	20
圖二、 人類 <i>ARF6</i> 與陰道滴蟲 <i>ARF220</i> 序列相似度之分析.....	21
圖三、 <i>TvARF220</i> , <i>TvPI4P5K</i> 與 $PIP_2$ 於陰道滴蟲分布情形.....	23
圖四、 BFA 作用對於陰道滴蟲細胞之生存率分析.....	25
圖五、 BFA 影響 <i>TvARF220</i> , <i>TvPI4P5K</i> 與 $PIP_2$ 於陰道滴蟲分布情形.....	29
圖六、 BFA 影響 <i>TvARF220</i> 與 <i>TvPI4P5K</i> 在鐵刺激下於陰道滴蟲分布差異...	31
圖七、 BFA 對 <i>TvARF220</i> 與 <i>TvPI4P5K</i> 在鐵刺激下於陰道滴蟲的表現差異..	35
圖八、 BFA 影響 <i>TvPI4P5K</i> 與 $PIP_2$ 在鐵刺激下於陰道滴蟲分布差異.....	37
圖九、 鈣離子在 BFA 處理後於陰道滴蟲分布情形與表現量分析.....	39
圖十、 肌動蛋白沉降分萃.....	42
圖十一、 細胞遷移癒合試驗.....	44
圖十二、 推測機制模型.....	47

# 第一章、前言




## 第一節、陰道滴蟲簡介

陰道滴蟲 (*Trichomonas vaginalis*) 是厭氧性致病原蟲，寄生於人體的生殖泌尿道裡，目前已知人類是唯一宿主，感染造成陰道滴蟲症，為普遍的非病毒性傳染疾病之一 (non-viral sexually transmitted disease, STD)，每年造成全球至少兩億七千六百萬人感染[1]。該疾病以性行為與接觸傳染，通常無症狀，在女性出現症狀的比例比較高，病徵包含子宮頸跟陰道內的草莓狀紅斑，少數病例會造成患者感染部位發炎或搔癢，嚴重時可造成孕婦早產或流產[2,3]。陰道滴蟲感染引起發炎反應提高人類乳突病毒 (Human Papillomavirus, HPV) 或人類免疫缺乏病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 傳播機率[4]，增加子宮頸癌與攝護腺癌的罹患率[5,6]。據統計台灣地區因為陰道周邊相關症狀求診的病患約有~3%患者分離出陰道滴蟲[7]。臨床上使用 Metronidazole 治療陰道滴蟲感染，但由於發現具有抗藥性菌株[8]，須留意對公共衛生的衝擊。

## 第二節、陰道滴蟲型態

陰道滴蟲滋養體 (trophozoites) 在液體內泳動時呈水滴形並帶有四根前鞭毛 (anterior flagella)、一根反轉鞭毛 (recurrent flagellum)，反轉鞭毛上帶有波動膜[9]。一旦碰觸到表面型態會由水滴狀轉變為扁平的阿米巴型態 (amoeboid form) 進而黏附於固體表面[10]。當生存環境不良或營養缺乏時，陰道滴蟲細胞可能形成球狀假性囊體 (pseudocyst)[11]。陰道滴蟲藉由轉換不同型態以因應宿主體內環境變動，與定殖能力息息相關。

### 第三節、陰道滴蟲致病機轉



陰道滴蟲進入宿主泌尿生殖道後，可能藉由細胞表面因子，包含黏附蛋白 (adhesin proteins: AP23, AP33, AP51, AP65, and AP120) [12]、BspA、以及各式醣蛋白 (lipophosphoglycan, LP、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TvGAPDH)，與宿主上皮細胞細胞外間質 (extracellular matrix, ECM) 層黏蛋白 (laminin)、纖維蛋白 (fibronectin)、膠原蛋白 (collagen) 與半乳糖凝集素 (galectin) [13, 14] 接觸後引起免疫反應。相對陰道滴蟲會釋放半胱氨酸蛋白酶 (cysteine proteases) 誘導宿主細胞粒腺體中 caspase-3、caspase-9 與 cytochrome-c，並提升陰道滴蟲之金屬蛋白酶 (metalloprotease) 活性降解細胞凋亡抑制蛋白 (MCL-1 與 BCL-xL)，導致宿主細胞凋亡 [15-17]；半胱氨酸蛋白酶也能降解宿主補體的 C3 蛋白 [18] 與多種免疫球蛋白 (immunoglobulin) [19]，藉此躲避並抵抗宿主免疫系統。一旦宿主上皮細胞死亡後，collagen IV 與 fibronectin 降解將促使滴蟲穿越黏膜層 [20]。同時，阿米巴型態的陰道滴蟲具有吞噬細胞碎片能力造成吞噬性細胞毒性 [21]。

### 第四節、磷脂酰肌醇 4,5-雙磷酸 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP<sub>2</sub>)

磷脂酰肌醇 4,5-雙磷酸 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP<sub>2</sub>) 是細胞膜中雙層磷脂質的成分之一 [22]，多由磷脂酰肌醇-4-磷酸 5-激酶 (Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, PI4P5K) 磷酸化 Phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) 的 D-5 碳而成。做為第二信使 (second messenger) 掌管許多訊息傳導路徑，包含胞內運輸、細胞骨架的組裝 [23]。在乳腺癌細胞中，細胞膜上 PIP<sub>2</sub> 與 cofilin 結合後會抑制 cofilin，導致肌動蛋白 (F-actin) 無法解開聚合 (depolymerization) [24]。在高等真核細胞中，鈣離子可作為催化劑促使細胞膜上 PIP<sub>2</sub> 聚集提高與其他分子反應機會 [25]。已知哺乳類動物細胞中 PIP<sub>2</sub> 被

phospholipase C ( PLC ) 水解形成 diacylglycerol ( DAG ) [26, 27] 與 Inositol triphosphate ( IP<sub>3</sub> ) [28] , IP<sub>3</sub> 打開內質網上鈣離子通道蛋白 ( IP<sub>3</sub>-gated Ca<sup>2+</sup> transport channel ) , 導致內質網儲鈣流至細胞質 , 可進一步促使細胞外鈣流入 , 以維持細胞內鈣離子的恆定 [29] 。在哺乳類動物細胞中 PIP<sub>2</sub> 也參與胞吞作用 ( endocytosis ) 跟胞吐作用 ( exocytosis ) [30] 。其他哺乳類動物細胞研究中也提到 PI4P5K 除了合成 PIP<sub>2</sub> 以外有可能成為支架蛋白質 ( Scaffold protein ) [31] , 或調控膜蛋白複合體 [32] , 或參與細胞核內的訊號與轉錄調控 [33] 。

在前人的陰道滴蟲研究中 , TvPI4P5K 將 PI4P 磷酸化為 PIP<sub>2</sub> , 被 PLC 水解以提升細胞內鈣離子濃度 , 進而調節肌動蛋白的組裝 , 可影響陰道滴蟲細胞的變形與貼附能力 [34] 。當阻斷細胞內 TvPI4P5K 活性降低 PIP<sub>2</sub> 產量 , 亦或抑制細胞內鈣離子濃度 , 又或干擾整體肌動蛋白細胞骨架活性 , 都大幅降低陰道滴蟲的細胞溶噬能力 [35] , 證實 PIP<sub>2</sub> 、細胞骨架與鈣離子都影響陰道滴蟲致病力。當前人發現陰道滴蟲貼附能力也與 TvPI4P5K 表現量高度相關 , 進一步利用免疫共沉澱發現 TvPI4P5K 會與 heat shock protein70 ( HSP70 , TVAGG3\_0300820 ) , protein kinase A catalytic subunit ( TvPKAc , TVAGG3\_1058180 ) 以及 TvARF220 ( TVAGG3\_0070080 ) 等蛋白形成複合體 [34, 36, 37] , 其生物學意義有待未來釐清。

## 第五節、ADP-ribosylation factor ( ARF, ADP 核糖基化因子 )

ARF 作為高等真核生物細胞膜上的 GTPase , 調控細胞膜的侵入性 ( invasion ) 、滲透性 ( cell permeability ) 、皺褶性 ( membrane ruffling ) 、遷移性 ( migration ) 、胞吞作用 ( phagocytosis ) [38-44] 。已知 ARF 與鳥苷-5'-三磷酸 ( Guanosine triphosphate, GTP ) 結合成為活化態 , 當 ARF 將 GTP 水解轉化成鳥苷-5'-二磷酸 ( Guanosine diphosphate, GDP ) 時形成非活化態 [45] 。高等真核生物之 ARF 家族蛋白含 ARF1~ARF6 , 唯有 ARF6 蛋白活躍於細胞膜 , 與細胞骨架重

塑、PIP<sub>2</sub> 訊號放大、細胞附著與運動密切相關[46-48]。在 HeLa 細胞中，ARF6 調控偽足的形成[49]，影響細胞移動與附著[39]，並輔助膜蛋白形成的囊泡進行內吞作用[45]。哺乳類動物細胞之 PIP<sub>2</sub> 訊號傳遞中 ARF 可與磷脂酰肌醇-4-磷酸 5-激酶 (PI4P5K) 形成複合體後，共同移動至細胞膜以將 PI4P 轉為 PIP<sub>2</sub>[50]。

前人比較老鼠之 ARF6 與陰道滴蟲之 ARF，對比序列在 Switch 和 P-loop 結構域內達到 70%以上的相似度。Switch 結構域根據 GDP 與 GTP 結合狀態改變構型，能影響其他蛋白與 ARF 結合；P-loop 保守序列，可與 GTP/GDP 分子中的磷酸基團交互作用，穩定 ARF 執行 GTPase 活性時結構[35]。此篇研究目的即在確認陰道滴蟲 TvARF220 是否跟老鼠 ARF6 有類似功能。

## 第六節、陰道滴蟲與鐵離子

鐵離子是細胞中重要的輔因子 (cofactor)，三價鐵不容易被生物體直接利用，二價鐵作為血基質 (heme) 的材料，成為血紅素 (hemoglobin) 的一部分，但若直接攝入會形成活性氧化物 (superoxide)，進而對細胞造成氧化壓力[51]。人體中的鐵蛋白除了血紅素以外，二價鐵離子在腸道內被轉為三價鐵離子後也會由儲鐵蛋白 (ferritin) 與運鐵蛋白 (transferrin) 運送儲存，泵鐵蛋白 (ferroportin) 則是控制鐵從細胞膜內往外運送的通道。鐵離子也可與硫離子組成鐵硫簇用於電子傳遞[52]，做為核酸代謝酵素的輔因子調控 DNA 合成[53]。由於鐵具有多功能性，含鐵量多寡也對生物產生生理影響[54]。

在女性月經週期中，鐵離子濃度不斷改變[55, 56]，為因應這樣的環境陰道滴蟲演化出多樣化致病調控機制，影響其貼附、生長、溶血等能力[57]。在高鐵環境中，陰道滴蟲之黏附蛋白 (AP33, AP51, AP65) 會被正向調控增加合成量，令更多蟲體貼附於陰道上皮細胞[58]。半胱氨酸蛋白酶 (Legumain-like cysteine proteinase, TvLEGU-1) 與甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TvGAPDH) 活性會影響到對宿主的貼附性[14, 59]。半胱氨酸蛋

白酶 (cysteine proteinase-4, TvCP4) 在高鐵環境藉由 IRE/IRP (iron responsive element/ iron responsive protein) 表現系統增加滴蟲的溶血效率[60]。此外，半胱氨酸蛋白酶 TvCP39, TvCP65 則會在低鐵環境抑制蛋白質水解並降低陰道滴蟲毒殺上皮細胞能力[61, 62]。

前人也發現當以鐵離子刺激陰道滴蟲後，G 蛋白質的 G $\alpha$  單元會促進腺苷酸環化酶催化環腺苷酸的生成並活化 protein kinase A (PKA)。PKA 會磷酸化 (phosphorylation) 與泛素化 (ubiquitination) TvMyb3 轉錄因子使其湧入細胞核，調控黏著蛋白 *ap65-1* 基因轉錄[63]，可能與陰道滴蟲細胞貼附力有關。

有研究指出缺鐵環境下，陰道滴蟲轉變為假性囊體 (pseudocyst) 形態，顯示鐵是維持陰道滴蟲形態中的關鍵角色[64]。實驗室前人探討了鐵刺激後 PIP<sub>2</sub> 扮演的角色，發現鐵離子會透過調控 TvPI4P5K 表現量影響到 PIP<sub>2</sub> 的生成表現量，進一步改變陰道滴蟲的型態以及運動方式[34, 37, 64]。同時發現鐵能作為啟動因子活化 TvARF220 並與 TvPI4P5K 形成複合體[35]。

## 第七節、TvARF220 與 BFA

Brefeldin A (BFA) 是 ARF 活化的非競爭型抑制劑，對解析高基氏體 (Golgi) 膜運輸的分子機制發揮了關鍵作用[65]。在已知研究中，ARF 的活化需要 GEF 協助，BFA 會穩定結合在 ARF-GDP 與 GEF Sec7 結構域所形成的過渡複合體之間，(GEF - BFA - ARF - GDP)，阻止 GDP 的釋放[66-69]。藉此影響 ARF 再次結合 GTP，以達到抑制 ARF 功能，如 PIP<sub>2</sub> 生成與下游鈣離子訊息傳導路徑[70, 71]。

## 第八節、實驗目的

實驗室前人發現 *Tv*PI4P5K 跟 PIP<sub>2</sub> 在陰道滴蟲細胞內的表現量與環境中鐵離子濃度高度相關，同時鐵能活化 *Tv*ARF220-GTP 型態，此型態與 *Tv*PI4P5K 形成複合體[35]。由於高等真核 ARF 功能可能與蛋白質胞內運輸有關，我們試圖以 *Tv*ARF220 為模型，並以 BFA 抑制 *Tv*ARF220，探討其功能是否參與 *Tv*PI4P5K 細胞膜運輸而影響 PIP<sub>2</sub> 生合成與下游鈣離子訊息傳導。進而調控肌動蛋白動力學，並驅動各式細胞骨架活性。(圖一)

## 第二章、材料與方法



### 第一節、陰道滴蟲蟲株

#### 1.1 蟲株種類

本研究使用高貼附性的 TH-17 本土臨床分離蟲株。

#### 1.2 蟲株培養

蟲株平時以 TYI 培養液 (附錄一) 於 37°C 環境培養；去鐵實驗組額外加入最終濃度 50  $\mu\text{M}$  2,2'-dipyridyl (Sigma-Aldrich)；加鐵實驗組則額外加入最終濃度 250  $\mu\text{M}$  ferrous sulfate (Sigma-Aldrich)[72]。

#### 1.3 備用蟲株存儲與再活化

培養 50 ml (  $1.5\sim 2 \times 10^6$  cells/ml ) 陰道滴蟲細胞，加入體積 15 ml 之 0.5% trypsin- 0.2% EDTA -1X PBS 溶液於 37°C 反應 15 分鐘使細胞脫離管壁。懸浮液以 1500x g 離心 10 min 後去除上清液，加入 5 ml 含最終濃度 7% DMSO 的 TYI 培養液懸浮細胞。每 1 ml 分裝至冷凍小管後放入漸凍盒，置於 -80°C 冰箱三天以上。重新活化時將冷凍小管放置 37°C 水浴 1 分鐘，待其完全融化立即種入 37°C 的 6 ml TYI 培養液中[36]。

#### 1.4 台盼藍生存率測試

取 5  $\mu\text{l}$  細胞液與 5  $\mu\text{l}$  0.4% 台盼藍 (Gibco™) 混合並迅速加入血液計數片，

使用 Olympus CKX31 顯微鏡以  $10 \times 10$  放大倍率觀察，取顯微鏡視野中的五個獨立範圍各兩百個總細胞數，並且根據細胞內透明或藍色分別計數。

計算方式： $(\text{總細胞數} - \text{藍細胞數}) / \text{總細胞數} \times 100\%$



## 1.5 BFA 處理條件

細胞培養液中加入最終濃度  $5 \mu\text{g/mL}$  BFA (TargetMol)，於  $37^\circ\text{C}$  反應四小時。

## 第二節、免疫螢光染色 (Immunofluorescence assay, IFA)

### 2.1 活細胞自然貼附

將適量陰道滴蟲細胞以  $3000 \times g$  離心 1 分鐘濃縮，以  $20 \mu\text{l}$  為單位加上玻片的疏水圈內，置於真空盒中抽真空後放入  $37^\circ\text{C}$  環境自然貼附 1 小時。以 1X TBS 輕潤洗未貼附細胞後，加入  $40 \mu\text{l}$  4% paraformaldehyde 以固定細胞，於室溫靜置 20 分鐘後，以 1X TBS 沖洗[37]。

### 2.2 PIP<sub>2</sub> 染色前處理

在一級抗體反應前，先以  $20 \mu\text{l}$  的 0.5% saponin (稀釋在 TBS) 填滿疏水圈以通透化陰道滴蟲細胞。室溫靜置 15 分鐘後，以 1X TBS 潤洗 5 分鐘兩次，接著以  $20 \mu\text{l}$  的 10% 羊血清 (goat serum 稀釋在 TBS) 填滿疏水圈，在  $37^\circ\text{C}$  反應 30 分鐘[37]。

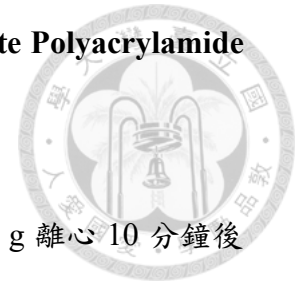
### 2.3 抗體作用與封片

使用 0.2% Triton X-100 (稀釋在 1.2X TBS) 填滿疏水圈以通透化陰道滴蟲細胞，室溫靜置 15 分鐘。以 1X TBS 潤洗兩次各 5 分鐘，將一級抗體稀釋於 TBS (含 1% BSA) (附錄三)，滴上載玻片在 37°C 反應 1 小時。以 1X TBS 潤洗兩次各 5 分鐘，用 TBS (含 1% BSA) 稀釋二級抗體 (附錄三)，滴上載玻片在 37°C 反應 1 小時。以 1X TBS 潤洗兩次各 5 分鐘後以二次水潤洗。待玻片於 37°C 風乾後，每個疏水圈滴入 3  $\mu$ l 螢光封片膠 (含 DAPI)，蓋上蓋玻片後以透明指甲油密封 [36]。以 Zeiss LSM780 共軛焦顯微鏡觀察並以 Zen blue 軟體擷取含 Differential Interference Contrast (DIC) 立體圖層之螢光圖片，接著使用 ImageJ (National Institutes of Health, NIH) 擷取訊號並以 Excel 製作訊號趨勢圖 [73]，採用 Pearson correlation coefficient measurement (PCC) 相關係數分析共定位趨勢。

### 第三節、Calcium green 螢光染色

加入 20  $\mu$ l 的 Poly-D-lysine (20  $\mu$ g/ $\mu$ l) 於玻片疏水圈內，置於 37°C 環境 1 小時固定塗層。將適量陰道滴蟲細胞以 3000 $\times$  g 離心 1 分鐘後去上清液，以 400  $\mu$ l 1% BSA (稀釋在 1.2X PBS) 回溶。加入 5  $\mu$ M Calcium Green<sup>TM</sup>-1 (Invitrogen) 鈣離子螢光指示劑，以鋁箔包裹離心管避光反應，於 37°C 反應 45 分鐘。以 3000  $\times$  g 離心 1 分鐘後去上清液，以 1X PBS 沖洗。加入 200  $\mu$ l 4% paraformaldehyde 以固定細胞，於室溫靜置 20 分鐘。以 1X PBS 沖洗，以 600 $\times$  g 離心 10 分鐘後再懸浮，將細胞液加入 Poly-D-lysine 塗層玻片並以鋁箔包覆玻片，在 37°C 沉降 1 小時。以 1X PBS 潤洗兩次各 5 分鐘後以二次水潤洗。待玻片於室溫風乾後，每個疏水圈滴入 3  $\mu$ l 螢光封片膠 (含 DAPI)，蓋上蓋玻片後以透明指甲油密封 [36]。以 Zeiss LSM780 共軛焦顯微鏡觀察並以 Zen blue 軟體擷取含 Differential Interference Contrast (DIC) 立體圖層之螢光圖片 [73]。

#### 第四節、蛋白質聚丙烯醯胺凝膠電泳 (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)



將 15 ml 陰道滴蟲細胞 ( $1.5 \sim 2 \times 10^6$  cells/ml) 以  $1500\times$  g 離心 10 分鐘後去上清液。先以 PBS/TBS 含 EDTA, TLCK, protease inhibitor (附錄二) 沖洗細胞後，加入 200  $\mu$ l 上述沖洗溶液另含 1% Triton X-100 作為細胞裂解液，反應十分鐘後以 Bradford 試劑定量。將其中 150  $\mu$ l 與最終濃度 1X SDS sample buffer 混合，於  $100^\circ\text{C}$  加熱 7 分鐘。變性樣本在 12% 聚丙烯醯胺凝膠電泳槽經 stacking gel (10 mA) / separating gel (20 mA) 進行電泳。

#### 第五節、西方墨點法 (Western blot assay)

膠體以全濕式膠體轉漬器轉漬至 Polyvinylidene difluoride (PVDF, 0.45  $\mu$ m hole, Immobilon®-P, Millipore) 膜，待膜乾燥後浸入 Blocking solution (附錄四) 於  $37^\circ\text{C}$  震盪反應 1 小時。以沖洗液 (附錄四) 潤洗 5 分鐘兩次，浸入稀釋 1 級抗體 (附錄三、四) 於  $4^\circ\text{C}$  反應隔夜。隔日以沖洗液潤洗 5 分鐘三次，隨後改浸入稀釋二級抗體 (附錄三、四) 於  $37^\circ\text{C}$  震盪反應 1 小時。以沖洗液潤洗 5 分鐘三次，膜以 ECL 試劑 (VISUAL PROTEIN) 反應 1 分鐘後使用冷光影像分析系統 (ChemiDoc-It® 510, UVP) 偵測膜上的蛋白訊號[36]。

#### 第六節、G-Actin/F-actin In Vivo Assay, 肌動蛋白沉降分萃

將 15 ml 陰道滴蟲細胞 ( $1.5 \sim 2 \times 10^6$  cells/ml) 以  $1500\times$  g 離心 10 分鐘後去上清液。使用 G-Actin/F-actin In Vivo Assay Biochem kit (Cytoskeleton Inc.) 中的 Lysis & F-actin Stabilization Buffer (含有 ATP、Protease inhibitor、TLCK、EDTA) 回溶細胞，每兩分鐘以針筒 (6 ml, 23 G, Terumo) 沖散樣品、共計五次。 $600\times$  g

離心 5 分鐘移除未打破細胞後，上清液以 23,444x g 離心 40 分鐘。取上清液為 G-actin 樣本，接著使用前述 kit 中之 F-actin Depolymerization Buffer (含有 EDTA、TLCK、Cocktail protease inhibitor) ，將沉澱部分回溶成為 F-actin 樣本[35]。

### 第七節、細胞遷移癒合試驗 (Wound-healing cell migration assay)

使用吸管尖直線刮除細胞培養瓶平面上的細胞，產生一固定寬度縫隙，每隔 1 小時使用 Olympus CKX31 顯微鏡 (20x) 以 CCD 相機 (6300AC, Leadview) 拍攝。將縫隙癒合面積以影像軟體 (ImageJ) 分析，後以 excel 計算細胞遷移比例製作折線圖。

# 第三章、結果



前人發現陰道滴蟲 *TvPI4P5K* 和 *TvARF220* 形成複合體，同時鐵可以提高 *TvPI4P5K* 表現以產生  $PIP_2$  並活化下游鈣離子訊號，為陰道滴蟲調控細胞骨架活動關鍵路徑[36]。

## 第一節、人類 ARF6 與陰道滴蟲 ARF220 序列相似度

經 CLUSTAL 2.1 多序列分析，人類 ARF6 與 *TvARF220* 序列相似度達到 62% (圖二)。Switch 和 P-loop 結構域內達到 70% 以上的相似度，Switch 會根據 GDP 與 GTP 結合狀態而改變構型；P-loop 做為保守序列，可以結合 GTP/GDP 分子中的磷酸基團。由於序列結構的高度相似性，因此推測 *TvARF220* 與高等真核 ARF 蛋白質可能有類似的功能與調控。

## 第二節、*TvARF220*, *TvPI4P5K* 與 $PIP_2$ 於陰道滴蟲分布情形

透過活細胞免疫螢光染色發現，*TvPI4P5K* 與  $PIP_2$  共同分布於細胞膜周邊，其 PCC 統計值達  $0.77 \pm 0.12$  (圖三、A)，與實驗室先前結果類似[34]。而 *TvARF220* 除了位於細胞質中，同時在細胞膜周邊也偵測到較高訊號量 (圖三、B)，其分布並與 *TvPI4P5K* 部分重疊，共定位 PCC 值達  $0.64 \pm 0.16$ 。結果推測 *TvARF220*、*TvPI4P5K* 與  $PIP_2$  共同存在於在細胞膜，三者分布呈正相關。

## 第三節、BFA 處理之陰道滴蟲生存率比較

使用台盼藍來測試陰道滴蟲處理 BFA 後生存率，當以 ddH<sub>2</sub>O 作為控制組，

結果發現未處理 BFA 的陰道滴蟲細胞生存率接近 100%；即使處理 BFA 四小時之後，其生存率仍然有 99.77%，顯示四小時的 BFA 處理對於陰道滴蟲生存率並無影響 (圖四)。



#### 第四節、BFA 對 *TvARF220*, *TvPI4P5K* 與 *PIP<sub>2</sub>* 在陰道滴蟲的細胞膜分布

為了得知 *TvARF220* 在 *PIP<sub>2</sub>* 訊號傳遞中扮演的角色，利用 BFA 干擾 *TvARF220* 活性，並使用免疫螢光染色觀察 *TvARF220*, *TvPI4P5K* 與 *PIP<sub>2</sub>* 在細胞中分布。ddH<sub>2</sub>O 控制組之 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 分布於細胞膜附近，PCC 統計值達到  $0.82 \pm 0.08$ ；而 BFA 實驗組細胞膜上 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 訊號減低且 PCC 統計值降低至  $0.08 \pm 0.09$  (圖五 A)。另一方面，ddH<sub>2</sub>O 控制組之 *TvPI4P5K* 與 *PIP<sub>2</sub>* 同樣分布於細胞膜附近，此時 PCC 統計值達到  $0.76 \pm 0.14$ ；而 BFA 實驗組中細胞膜上 *TvPI4P5K* 與 *PIP<sub>2</sub>* 皆降低並且 PCC 統計值降低至  $-0.11 \pm 0.06$  (圖五 B)。同時，西方墨點分析顯示，BFA 不影響 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 之細胞內總表現量 (圖五 C、D)。此結果推測，*TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 共同轉移至細胞膜附近的現象，能被 BFA 所抑制，並且降低細胞膜上 *PIP<sub>2</sub>* 產量。

#### 第五節、BFA 影響鐵調控 *TvPI4P5K* 在陰道滴蟲的表現與細胞膜分布

先前已經知道鐵能刺激 *TvPI4P5K* 轉移至細胞膜周邊以產生 *PIP<sub>2</sub>*[35]。為了得知 *TvARF220* 在鐵誘導 *PIP<sub>2</sub>* 訊號傳遞中扮演的角色，使用免疫螢光染色同時添加 BFA 觀察是否影響鐵刺激下 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 的分布。ddH<sub>2</sub>O 處理控制組中鐵刺激 30 分鐘後，造成 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 同時移動至細胞膜附近 (圖六 A a、b)，其細胞膜周邊訊號分布呈正相關，此時 PCC 統計值達到  $0.76 \pm 0.11$  (圖六 B a、b)。與控制組相比，BFA 預處理實驗組中，鐵刺激 30 分鐘後 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 共同移動到細胞膜附近的趨勢較不明顯 (圖六 A c、

d.)，其鐵刺激後細胞膜周邊訊號分布 PCC 值亦降至 $-0.05\pm 0.31$  (圖六 B c.、d.)。此結果推測，鐵刺激後 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 共同轉移至細胞膜附近的現象，能被 BFA 所抑制。

同時，為了確認 BFA 是否影響鐵刺激下 *TvARF220* 跟 *TvPI4P5K* 的表現量，西方墨點法顯示，鐵刺激 *TvPI4P5K* 表現量增加至約 1.4 倍；但在 BFA 處理之組別，鐵不會進一步增加 *TvPI4P5K* 表現量，推測陰道滴蟲 *TvPI4P5K* 整體表現量受鐵調控，而 *TvARF220* 在其中的功能待進一步釐清。BFA 與鐵離子皆未影響到 *TvARF220* 的總量 (圖七)，結果顯示 BFA 僅部分影響 *TvPI4P5K* 在鐵刺激下的表現。

#### 第六節、BFA 影響陰道滴蟲 $PIP_2$ 生成量

相較 ddH<sub>2</sub>O 控制組，鐵刺激 30 分鐘後 *TvPI4P5K* 訊號集中至細胞膜附近，同時細胞膜部分區域上出現明顯  $PIP_2$  訊號 (圖八、A)，*TvPI4P5K* 與  $PIP_2$  細胞膜周邊訊號分布呈正相關，PCC 統計值達到  $0.79\pm 0.07$  (圖八 B a.、b.)；然而在 BFA 處理的組別中，受鐵刺激後 *TvPI4P5K* 集中於細胞膜周邊與細胞膜上  $PIP_2$  訊號強度均降低 (圖八 A c.、d.)，兩者細胞膜周邊共定位 PCC 亦下降至  $0.15\pm 0.2$  (圖八 B c.、d.)。顯示 BFA 抑制陰道滴蟲鐵刺激後 *TvPI4P5K* 細胞膜上含量，後續並降低細胞膜上  $PIP_2$  生成量。

#### 第七節、BFA 處理對陰道滴蟲鈣離子的影響

前人發現陰道滴蟲  $PIP_2$  調控下游鈣離子訊號[34]。為了測試 BFA 是否影響陰道滴蟲  $PIP_2$  下游之鈣離子訊號，將陰道滴蟲以 BFA 處理四小時，接著進行 Calcium Green 之螢光染色[34]。與 ddH<sub>2</sub>O 控制組相比，實驗組的 Calcium green 螢光訊號強度在 BFA 處理後降低約 30% (圖九)。證實 BFA 能降低陰道滴蟲細

胞中鈣離子含量。



## 第八節、BFA 處理對陰道滴蟲 actin 組裝的影響

前人已證實陰道滴蟲肌動蛋白骨架重組受細胞膜上  $PIP_2$  與細胞內鈣離子濃度調控[34]。為了測試 F-actin 的組裝是否同樣受到 BFA 影響，萃取細胞中 G-actin 跟 F-actin 以西方墨點分析。 $\alpha$ -Tubulin 與 TvCyP1 分別作為上清液 (G-actin) 與沉澱部分 (F-actin) 純度標記蛋白。相較於 ddH<sub>2</sub>O 控制組，BFA 實驗組中 F-actin 訊號的比例較低 (圖十)，顯示 BFA 處理可降低陰道滴蟲 F-actin 組裝能力。

## 第九節、BFA 處理對陰道滴蟲遷移能力的影響

為了測試了 BFA 處理後是否可使陰道滴蟲阿米巴型態時的移動性變差，利用傷口癒合實驗測試陰道滴蟲阿米巴遷移能力[74]。經統計 BFA 處理組別之陰道滴蟲，3 小時內其傷口填補速度減緩約 50%，顯示其阿米巴爬行遷移能力明顯降低 (圖十一)。

## 總結

本實驗透過免疫螢光染色、西方墨點法、肌動蛋白沉降分萃、細胞遷移癒合試驗進行研究。鐵能活化 TvARF220-GTP 型態與 TvPI4P5K 形成複合體，並調控下游  $PIP_2$ -Calcium 訊息傳導。當 TvARF220 功能受 BFA 抑制，將阻斷 TvPI4P5K 細胞膜定位能力，進一步影響  $PIP_2$  生合成與下游鈣離子訊息傳導路徑，因此減緩肌動蛋白細胞骨架重組，最終導致細胞骨架主導之阿米巴遷移能力下降 (圖十二)。

## 第四章、討論



統計發現女性月經週期期間陰道滴蟲感染徵狀較嚴重，其中鐵離子是導致陰道滴蟲致病力上升的重要環境因子[64]，陰道滴蟲為了生存必須面對宿主体內的环境變化，本研究目標在探討 *TvARF220* 如何於受鐵活化後與 *TvPI4P5K* 一同主導  $PIP_2$  訊息傳導，進一步影響陰道滴蟲的生理表徵或致病能力。

### 第一節、人類 ARF6 與 *TvARF220* 序列相似

在哺乳動物細胞中，ARF6 被觀察到活化  $PI4P5K$  增加  $PIP_2$  表現量與改變  $PIP_2$  分布，促進細胞膜皺褶形成[42, 48]。經由 CLUSTAL 2.1 多序列分析，*TvARF220* 高相似度的結果顯示 BFA 可能透過其結合非活化態 ARF 的機制影響 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 的結合 (圖二)。Switch 可能會影響到其他蛋白跟 ARF 的結合；P-loop 則提供結構支撐，可能影響 ARF 執行 GTPase 活性[75, 76]。BFA 的實際結合狀況尚待測試，且序列的差異可用於找出變異的調控位點進一步研究。

### 第二節、 $PIP_2$ 訊號傳遞因子間的關聯性

已知 *TvPI4P5K* 會與 *TvARF220* 形成複合體，且 *TvPI4P5K* 於細胞膜生成  $PIP_2$ [35]。前人利用超高速梯度離心發現 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 都位於細胞膜分層中[35]。本研究透過免疫螢光染色定位目標，*TvPI4P5K* 與 *TvARF220* 雖然主要分布在細胞質，但二者部分與  $PIP_2$  有共分布在細胞膜的現象 (圖三)。這代表活化態的 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 可能在細胞質結合後共同轉移至細胞膜，使 *TvPI4P5K* 得以將細胞膜上  $PI_4P$  轉化為  $PIP_2$ 。此推測與前人的細胞膜分析結果相符合，而  $PI_4P$  的轉化過程仍待進一步研究。

### 第三節、鐵離子的刺激對 PIP<sub>2</sub> 訊息傳遞之影響

前人發現鐵離子是維持 *Tv*PI4P5K 正常表現與細胞膜定位的關鍵因子[34]，且前人透過 GST-pull down assay 發現經過鐵刺激三十分鐘時 *Tv*ARF220-GTP 活化程度達到最高[35]；同時免疫沉澱測試證實 *Tv*PI4P5K 與 *Tv*ARF220 形成複合體於鐵刺激三十分鐘時達到最大結合量，這也顯示出鐵刺激 *Tv*ARF220 與 *Tv*PI4P5K 之間作用[35]。對於同樣會和 *Tv*PI4P5K 結合的 HSP70 與 PKA，有研究顯示人類細胞之 PI4P 受抑制劑減少時，HSP70 同源蛋白位於細胞膜的分布顯著減少[77]；PKA 則於磷酸化 PI4P5K 的特定位點後，可抑制其活性並減少 PIP<sub>2</sub> 合成[78]。在酵母菌的研究中，Puf 蛋白在促進鐵吸收的同時[79]被發現可能結合 PI4P5K 的 mRNA 以增加其轉譯後蛋白表現量[80]。這指向高等真核細胞中，鐵離子代謝與 PIP<sub>2</sub> 訊息傳遞之間存在調控關係，而鐵離子與 *Tv*ARF220 是否有其他交互作用待未來探討。

### 第四節、*Tv*ARF220 在 PIP<sub>2</sub> 訊號傳遞中扮演的角色

透過鐵作為刺激因子，並且使用 BFA 抑制 *Tv*ARF220，觀察到聚集在細胞膜周邊的 *Tv*ARF220 免疫螢光訊號下降。推測 BFA 可能使 *Tv*ARF220 留在非活化態，導致 *Tv*ARF220 與 *Tv*PI4P5K 無法形成複合體，因此無法移動到細胞膜之現象。BFA 在其他研究中也已被證實抑制 GEF 與 ARF 的結合後[67]，將破壞秀丽隱桿線蟲的高基氏體結構[81]；或使大鼠肝細胞之高基氏體膜蛋白 (beta-COP) 解離無法形成囊泡[65]；並且可抑制內質網與高基氏體間的運輸，以增加巴氏桿菌毒素對哺乳類動物細胞的毒性[70]，皆顯示 ARF 蛋白在細胞內膜運輸的重要性，突顯 *Tv*ARF220 若無法與 *Tv*PI4P5K 形成複合體將無法共同運輸至細胞膜的可能性。陰道滴蟲經鐵離子刺激後 *Tv*PI4P5K 量略增而 *Tv*ARF220 的量不因鐵刺激而有所變化，推測鐵離子可能影響 *Tv*PI4P5K 的表現，雖然 BFA 處理提高了



*TvPI4P5K* 的表現量但對 *TvARF220* 的表現量無影響 (圖七)。由於前人的 dot plot assay 測得陰道滴蟲  $PIP_2$  產量會受到 BFA 抑制[35]，且透過免疫螢光染色可觀察到細胞膜  $PIP_2$  的螢光亮度減少，因此 BFA 可能透過抑制 *TvARF220* 活化與 *TvPI4P5K* 結合，導致  $PIP_2$  產量下降。然而，*TvARF220* 受抑制如何影響到陰道滴蟲 *TvPI4P5K* 蛋白質表現以及是否造成其他生理變化，待進一步驗證。

### 第五節、*TvARF220* 在 $PIP_2$ 訊號傳遞中對下游鈣離子之影響

在已知的  $PIP_2$  訊息傳導系統中，*PI4P5K* 產生  $PIP_2$ 、被 PLC 水解產生 DAG[26, 27]跟  $IP_3$ [28]， $IP_3$  打開內質網上鈣離子通道蛋白 ( $IP_3$ -gated  $Ca^{2+}$  transport channel)，導致內質網儲鈣流至細胞質，可進一步促使細胞外鈣流入，以維持細胞內鈣離子的恆定[29, 82]。大鼠血管平滑肌細胞受 BFA 抑制蛋白質運送後，內質網內膜鈣離子通道受損而引起內質網中的鈣離子濃度急遽下降[83]。大鼠 PC12 細胞中 ARF6 的 T27N 變異導致  $Ca^{2+}$  誘導之分泌性胞吐顯著減少[84]。前人實驗中證實 *TvPI4P5K-PIP\_2* 訊息傳導調控鈣離子流入陰道滴蟲細胞[34]；而本文提及 *TvARF220* 可與 *TvPI4P5K* 結合調控  $PIP_2$  訊號傳遞。因此當 BFA 阻斷上游 *TvARF220* 功能，同時抑制  $PIP_2$  產生與細胞內鈣離子濃度，凸顯 *TvARF220* 在 *TvPI4P5K-PIP\_2-Calcium* 路徑中的上游角色。 $PIP_2$  水解與鈣離子濃度的其他生理功能待進一步驗證。

### 第六節、BFA 對陰道滴蟲細胞爬行能力與 actin 組裝的影響

在人類神經元系統中，ARF6 透過調控 Rac1 於神經元的生長錐促進突觸發生，影響其中 actin 重組的黏附與運動[85]，陰道滴蟲可能具有類似機制。細胞裡的肌動蛋白聚合也許會影響到陰道滴蟲的變形機制跟阿米巴遷移能力[74, 86]。前人透過使用 *TvPI4P5K* 變異細胞株發現陰道滴蟲  $PIP_2$  量與 F-actin 組裝呈現正

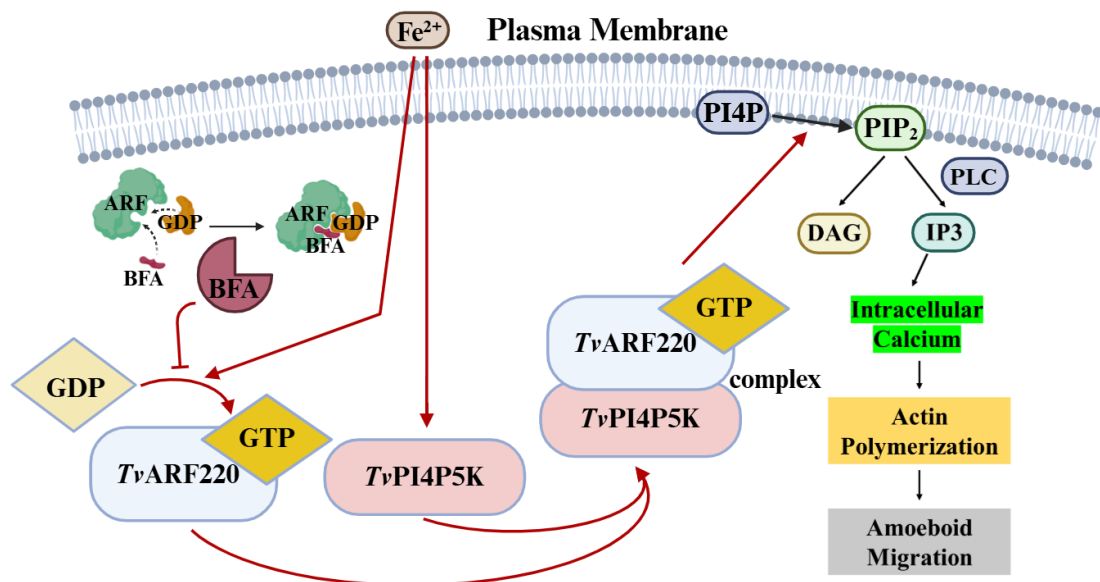
相關[34]；前人透過 Edelfosine 與 BAPTA-AM 等抑制劑降低鈣離子濃度時 actin 組裝也受到影響[34]，本研究中 BFA 同時降低細胞內鈣離子濃度以及 F-actin 比例，顯示 BFA 抑制肌動蛋白組裝 (圖十)，證實 *TvARF220* 透過調控  $PIP_2$ -鈣離子訊號影響 actin 的組裝功能。

阿米巴型態的爬行能力對陰道滴蟲來說相當重要，先前實驗室透過 LatB 處理證明了當陰道滴蟲的 F-actin 無法組裝時其型態轉換與細胞的遷移的能力也都會受到影響[74]。細胞遷移實驗證實了 BFA 會顯著削弱陰道滴蟲阿米巴型態的爬行能力 (圖十一)。除了爬行能力以外，前人證實細胞的型態轉換與貼附性也在 *TvPI4P5K* 之 K136A 失能突變株中或被 Edelfosine, BAPTA-AM 鈣離子抑制劑等影響[34]，皆突顯  $PIP_2$  路徑在細胞骨架活性的重要性。因此猜測 *TvARF220* 可透過  $PIP_2$  訊號調控肌動蛋白改變其變形與細胞附著能力，乃至影響到陰道滴蟲活動力。

本研究推測鐵透過活化 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 形成複合體，促進其運送到細胞膜，複合體可以調控該寄生蟲細胞膜上的  $PIP_2$  表現。 $PIP_2$  之後透過 PLC 水解，引發細胞內鈣離子濃度提升，本研究為 *TvARF220* 於  $PIP_2$  訊號傳遞中的功能，以及陰道滴蟲如何與宿主環境因子交互作用提供新的見解。(圖十二)

圖一、陰道滴蟲 *Tv*ARF220 調控 PIP<sub>2</sub> 訊息傳導

已知鐵能活化 *Tv*ARF220-GTP 型態，此型態會與 *Tv*PI4P5K 形成複合體。當以陰道滴蟲 *Tv*ARF220 為模型，並使用 BFA 抑制 *Tv*ARF220 的 GDP/GTP 活化態轉換，便可就其分布觀察 *Tv*ARF220 是否與 *Tv*PI4P5K 共同移動至陰道滴蟲細胞膜，同時觀察功能上是否影響 PIP<sub>2</sub> 的生合成與其下游效應。



## 圖二、人類 ARF6 與陰道滴蟲 ARF220 序列相似度之分析



以 CLUSTAL 2.1 多序列分析進行人類 ARF6 (NP\_001654.1 ADP-ribosylation factor 6 [Homo sapiens]) 與陰道滴蟲 ARF220 (XP\_001324328.1 GTP binding [Trichomonas vaginalis G3]) 之胺基酸序列比對，相似度達 62%。藍色框線代表 P-loop 結構域；紅色框線代表 Switch I 結構域；橘色框線代表 Inter-switch 結構域；綠色框線代表 Switch II 結構域，序列下方標示代表 identical(\*), conserved(:), semi-conserved(.)。



NP\_001654.1: ADP-ribosylation factor 6 [Homo sapiens]

XP\_001324328.1: *Tv*ARF220

```

NP_001654.1      ---MGKVLISKIFGNKEMRILMLGLDAAGKTTILYKLLKLGQSVTTIPTVGFNVE TVTYKN
XP_001324328.1  MGLLFSETFKKWFGNRETRVLMGLDAAGKTTVLYKLLKLGHEVTTIPTIGFNVE TIEYKG
                  :.:.:.* **:* *:*:*****:*****: *****:*****: **.
  
```

P-loop

switch I

```

NP_001654.1      VKFNVWDVGGQDKIRPLWRHYTGTQGLIFVVDCAADRDRIDEARQELHRIINDREMRDAI
XP_001324328.1  FNMNVWDVGGQDRIRALWRHYFHNTQGLIFVVDSDNDVGRIDEARDELHKLLEEDEL RDSI
                  .:.*:*****:*.**.*:*****. * .*****:***:..: *:**
  
```

Inter-switch

switch II

```

NP_001654.1      VKFNVWDVGGQDKIRPLWRHYTGTQGLIFVVDCAADRDRIDEARQELHRIINDREMRDAI
XP_001324328.1  FNMNVWDVGGQDRIRALWRHYFHNTQGLIFVVDSDNDVGRIDEARDELHKLLEEDEL RDSI
                  .:.*:*****:*.**.*:*****. * .*****:***:..: *:**
  
```

```

NP_001654.1      ILIFANKQDLPDAMKPHEIQEKLGLTRIRDRNWYVQPSCATSGDGLYGLTWLTSNYKS-
XP_001324328.1  LLVYANKQDLPNAVKPQELGNRLRLNTITNRPWVQGCCATTGDGLYGLDWLGDQINQH
                  *:.*:*****:*.**.*: : * * * * * .***:***** ** ..: .
  
```

```

NP_001654.1      -
XP_001324328.1  F
  
```

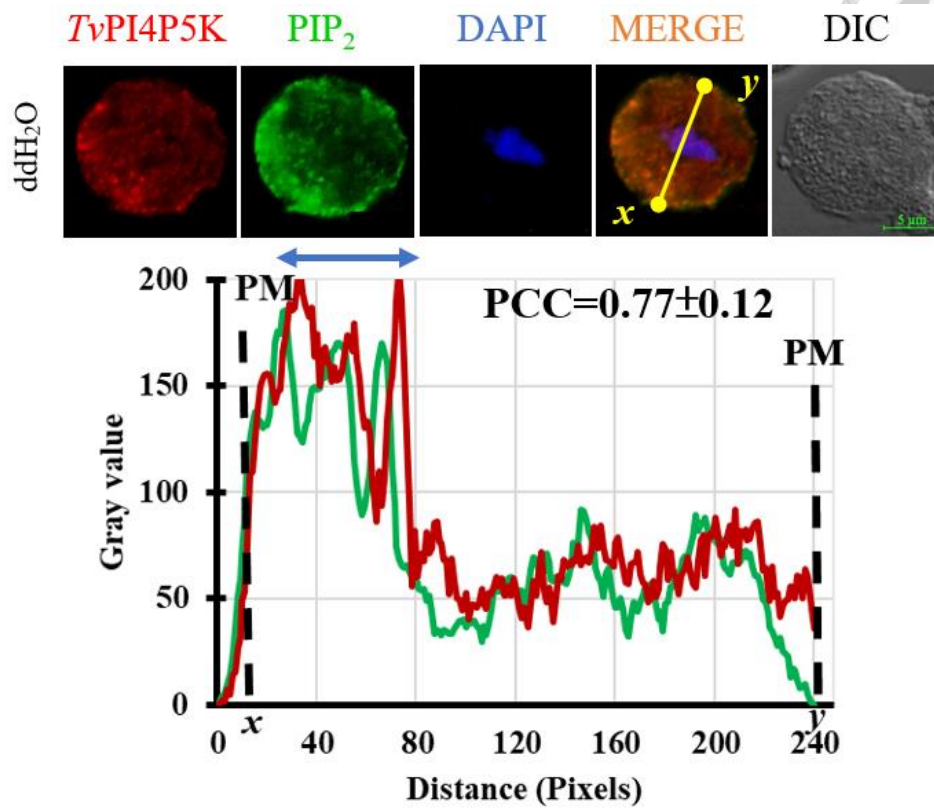
### 圖三、 *Tv*ARF220, *Tv*PI4P5K 與 PIP<sub>2</sub> 於陰道滴蟲分布情形



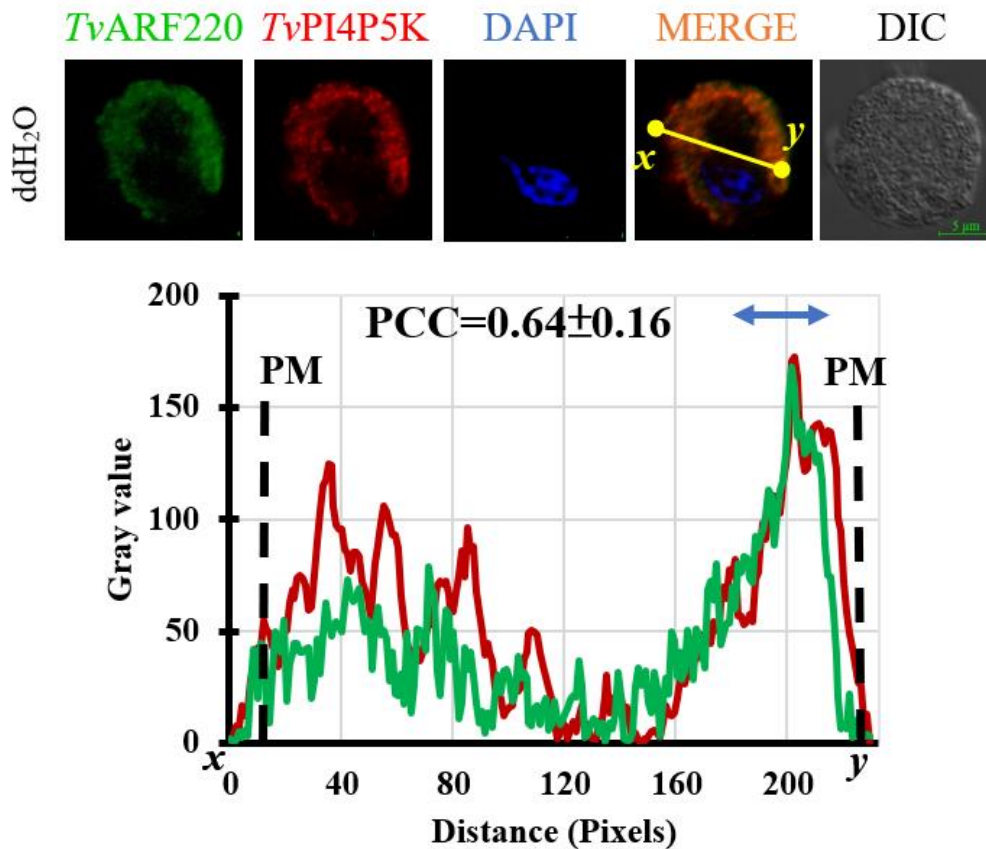
將 TH-17 陰道滴蟲培養在培養液，讓活細胞貼附於載玻片上後固定，以共軛焦顯微鏡觀察螢光訊號，細胞外觀以 DIC 模式顯示，比例尺代表 5  $\mu\text{m}$ ；透過影像軟體 (ImageJ) 分析了沿著黃色線標記的 X 和 Y 之間的位置的螢光訊號強度，結果顯示於對應的折線圖中。雙向箭頭藍線標示用以計算 PCC 區域，PCC 值由顯微視野中的三個代表性滋養體中測得。PM 代表細胞膜邊界。

- (A) 以 anti-*Tv*PI4P5K、anti-PIP<sub>2</sub> 進行雙重免疫螢光染色。DAPI 標記細胞核；Cy3 標記 *Tv*PI4P5K；FITC 標記 PIP<sub>2</sub>；MERGE 為 DAPI、*Tv*PI4P5K 與 PIP<sub>2</sub> 訊號重疊結果。
- (B) 以 anti-*Tv*PI4P5K、anti-*Tv*ARF220 進行雙重免疫螢光染色。DAPI 標記細胞核；Cy3 標記 *Tv*PI4P5K；FITC 標記 *Tv*ARF220；MERGE 為 DAPI、*Tv*PI4P5K 與 *Tv*ARF220 訊號重疊結果。

(A)



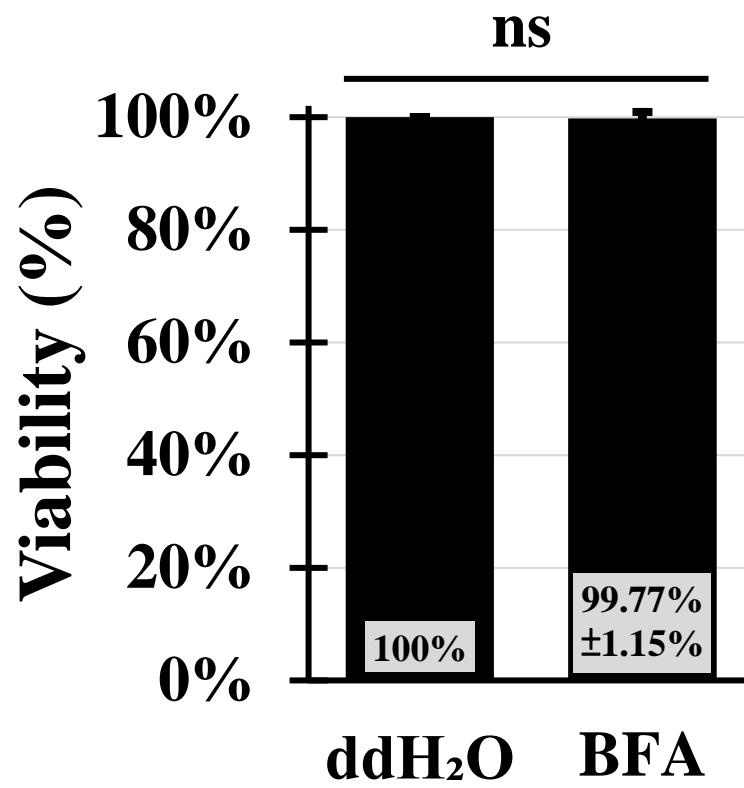
(B)



#### 圖四、 BFA 作用對於陰道滴蟲細胞之生存率分析

TH-17 陰道滴蟲培養液中加入 ddH<sub>2</sub>O 或 BFA，培養 4 小時。取少量細胞進行台盼藍染色，平均細胞存活率取自三次生物重複實驗，如長條圖所示 (n=3，平均值 ± 標準差)。統計分析使用學生 t 檢定(Student's t-test)，顯著性標準為 p<0.05 (\*) 和 p<0.01 (\*\*)，ns 表示無顯著差異。



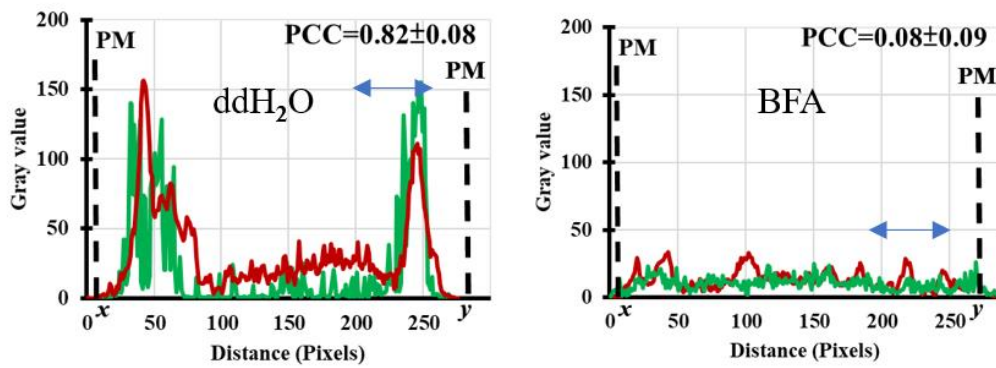
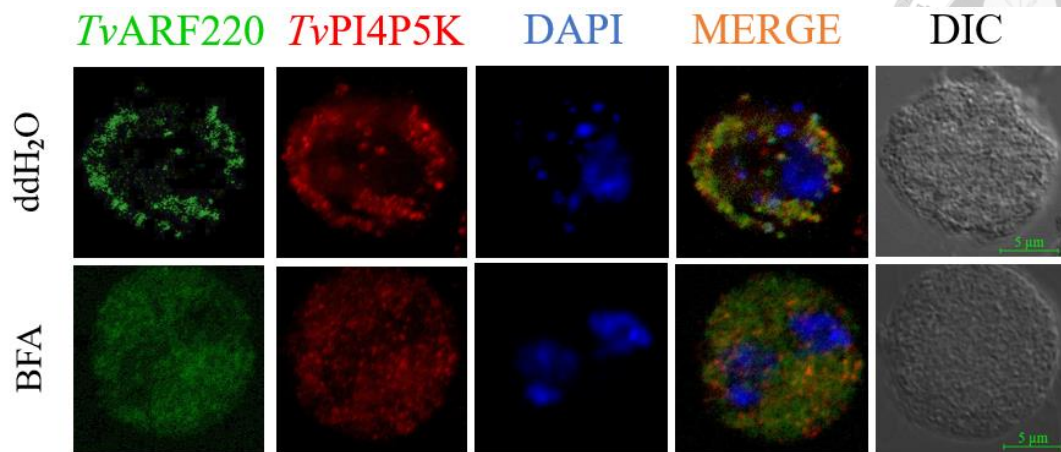


## 圖五、 BFA 影響 *Tv*ARF220, *Tv*PI4P5K 與 PIP<sub>2</sub> 於陰道滴蟲分布情形

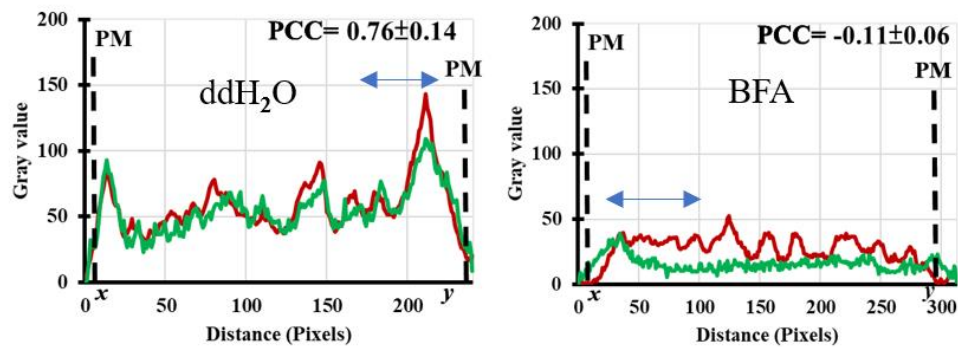
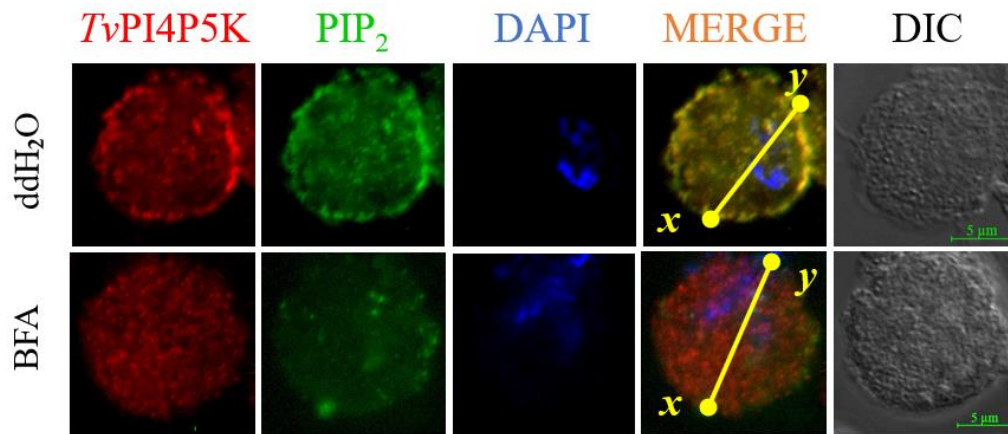
將 TH-17 陰道滴蟲分別加入 ddH<sub>2</sub>O 或 BFA 培養 4 小時，讓活細胞貼附於載玻片並固定，以共軛焦顯微鏡觀察螢光訊號，細胞外觀以 DIC 模式顯示，比例尺代表 5 μm；透過影像軟體 (ImageJ) 分析沿著黃色線標記的 X 和 Y 之間的位置的螢光訊號強度。雙向箭頭藍線標示用以計算 PCC 區域，PCC 值由顯微視野中的三個代表性滋養體中測得。PM 代表細胞膜邊界。

- (A) 以 anti-*Tv*PI4P5K、anti-*Tv*ARF220 進行雙重免疫螢光染色。DAPI 標記細胞核；Cy3 標記 *Tv*PI4P5K；FITC 標記 *Tv*ARF220；MERGE 為 DAPI、*Tv*PI4P5K 與 *Tv*ARF220 訊號重疊結果。
- (B) 以 anti-*Tv*PI4P5K、anti-PIP<sub>2</sub> 進行雙重免疫螢光染色。DAPI 標記細胞核；Cy3 標記 *Tv*PI4P5K；FITC 標記 PIP<sub>2</sub>；MERGE 為 DAPI、*Tv*PI4P5K 與 PIP<sub>2</sub> 訊號重疊結果。
- (C) TH-17 陰道滴蟲分別加入 ddH<sub>2</sub>O 或 BFA 培養四小時。收集全細胞裂解液後，將 40 μg 蛋白質樣本以 12% SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳分離後染色(下圖)；或轉漬於 PVDF 濾膜上，以 anti-*Tv*ARF220、anti-*Tv*PI4P5K、anti-α-Tubulin 進行西方墨點法分析(上圖)。
- (D) 透過影像軟體 (ImageJ)，分析圖(C)西方墨點法之訊號強度，其平均相對值如長條圖所示。

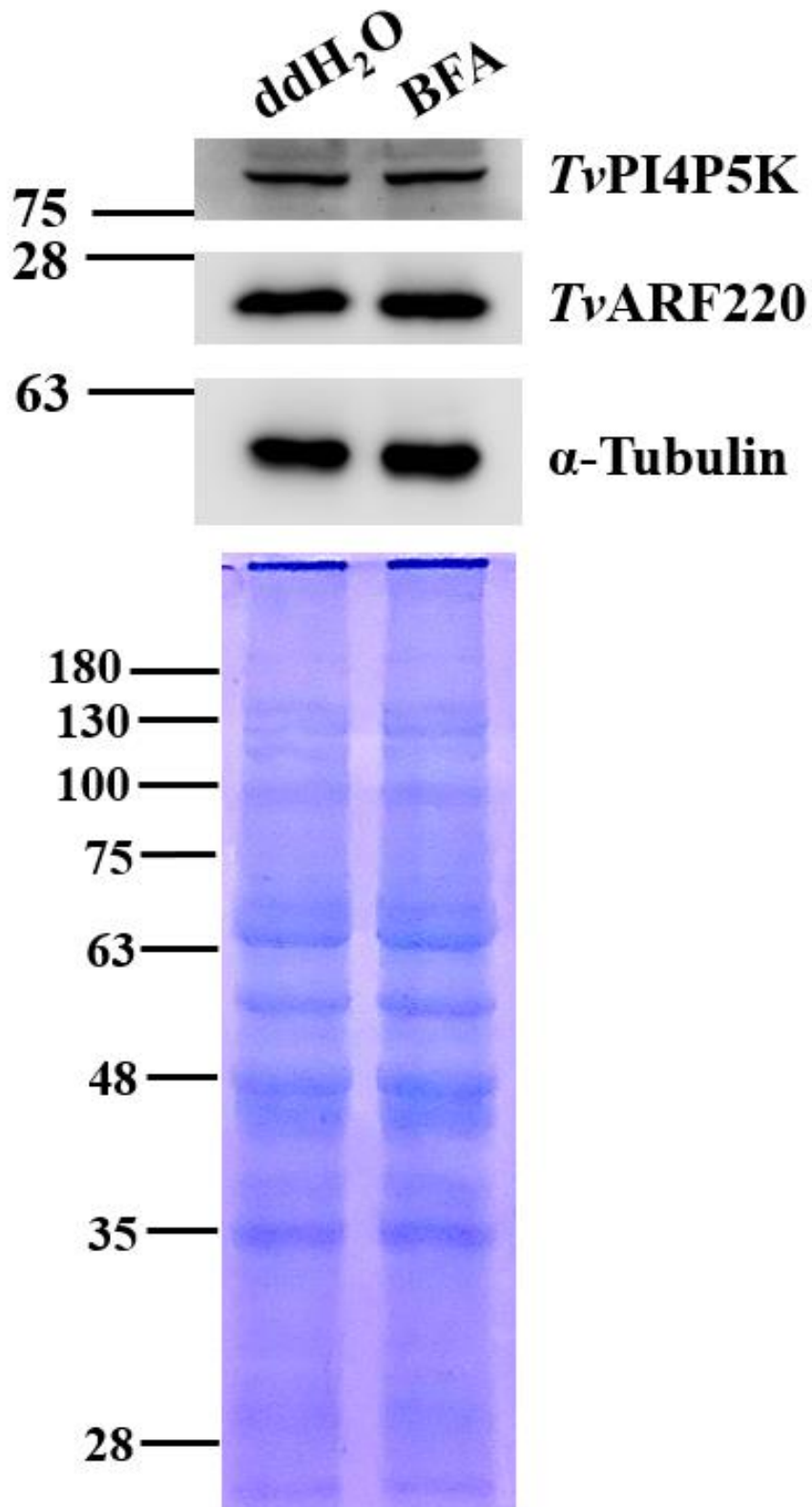
(A)



(B)

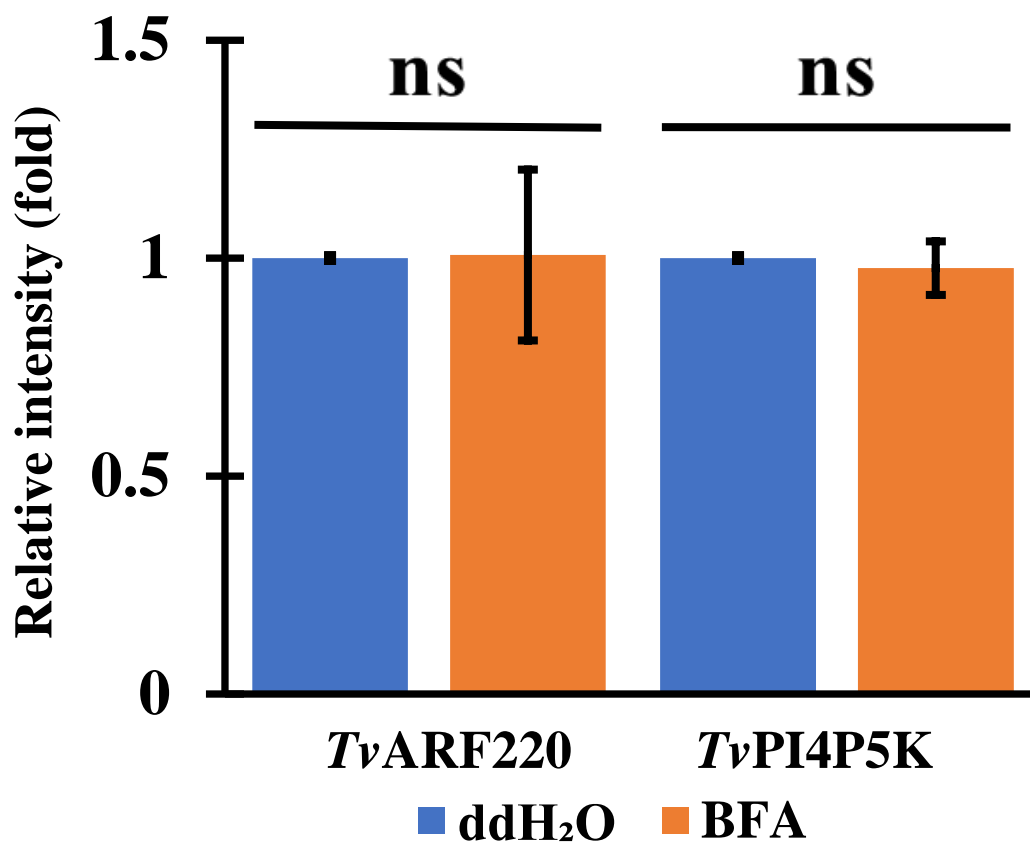


(C)



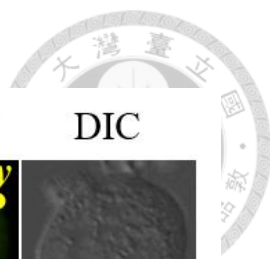


(D)

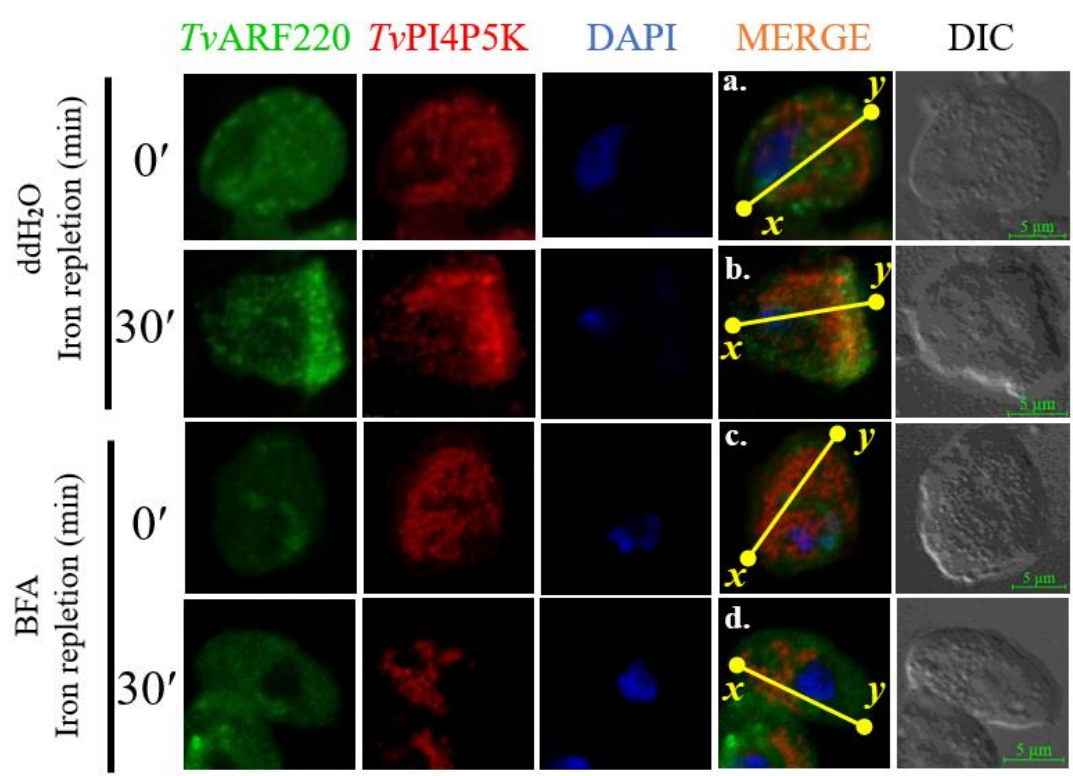


圖六、 BFA 影響 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 在鐵刺激下於陰道滴蟲分布差異

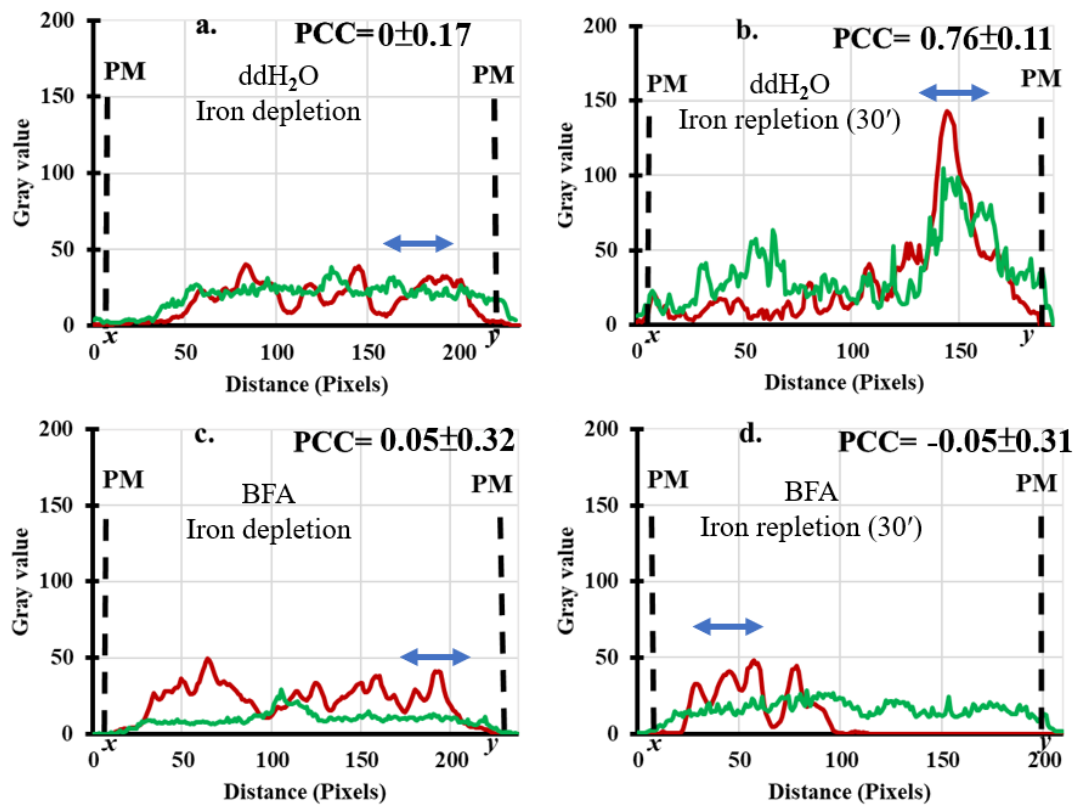
- (A) 將隔夜去鐵培養的 TH-17 陰道滴蟲預處理 ddH<sub>2</sub>O 或 BFA 四小時後加入鐵刺激 30 分鐘，讓活細胞貼附於載玻片並固定。以 anti-*TvPI4P5K*、anti-*TvARF220* 進行雙重免疫螢光染色，以共軛焦顯微鏡觀察螢光訊號。DAPI 標記細胞核，Cy3 標記 *TvPI4P5K*；FITC 標記 *TvARF220*；MERGE 為 DAPI；*TvPI4P5K* 與 *TvARF220* 訊號重疊結果 (a., b., c., d.)，細胞外觀以 DIC 模式顯示，比例尺代表 5  $\mu\text{m}$ 。
- (B) 透過影像軟體 (ImageJ) 分析沿著黃色線標記的 X 和 Y 之間的位置的螢光訊號強度，結果顯示於對應的折線圖中(a., b., c., d)。雙向箭頭藍線標示用以計算 PCC 區域，PCC 值由顯微視野中的三個代表性滋養體中測得。PM 代表細胞膜邊界。



(A)



(B)



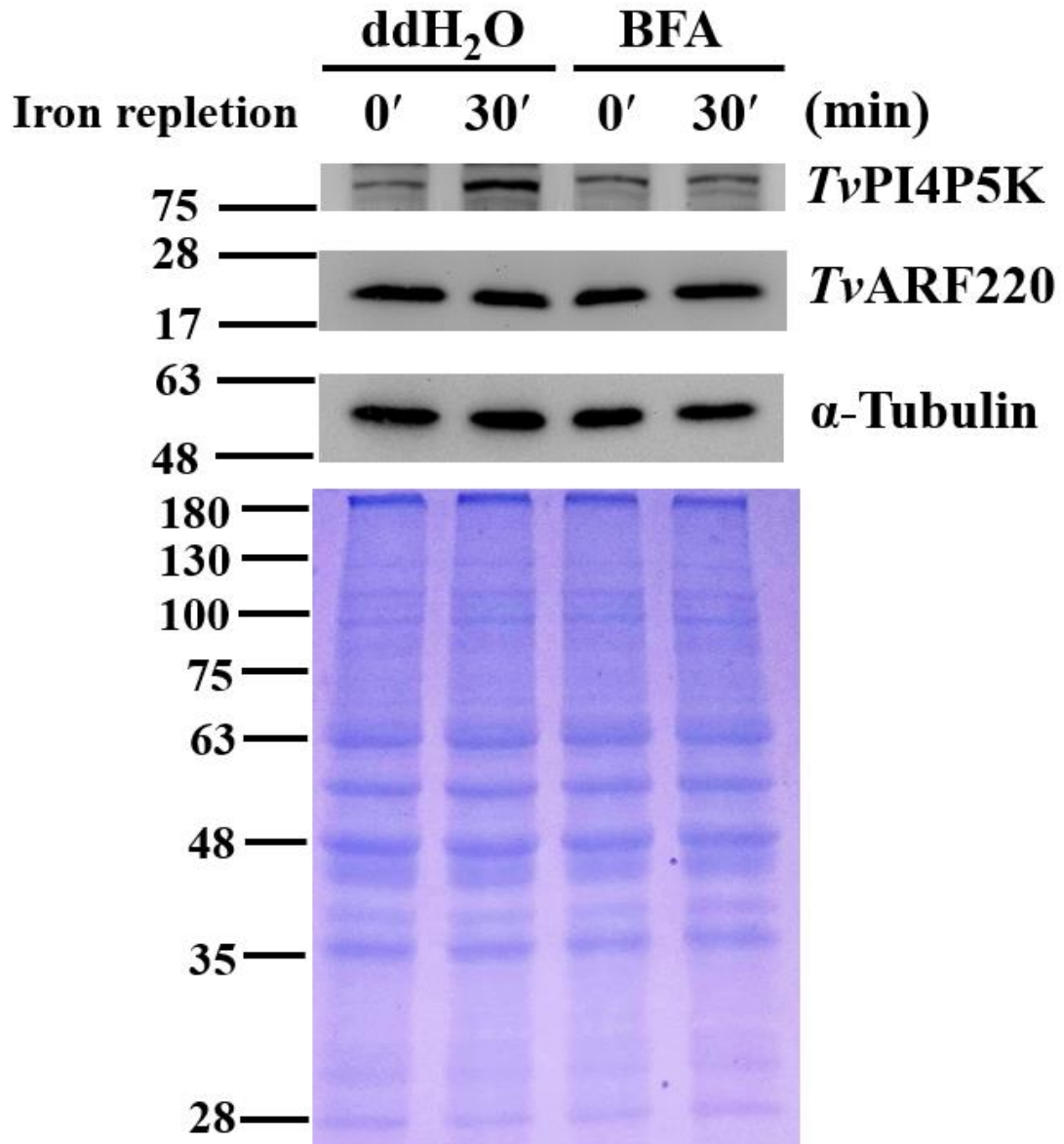
圖七、 BFA 對 *TvARF220* 與 *TvPI4P5K* 在鐵刺激下於陰道滴蟲的表現差異

(A) 隔夜去鐵培養 TH-17 陰道滴蟲分別預處理 ddH<sub>2</sub>O 或 BFA 四小時；加入鐵刺激 30 分鐘。收集全細胞裂解液後，取 40 μg 的蛋白質樣本以 12% SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳分離後染色(下圖)，或轉漬於 PVDF 濾膜上，以 anti-*TvARF220*、anti-*TvPI4P5K*、anti- $\alpha$ -Tubulin 進行西方墨點法分析(上圖)。

(B)與(C) 透過影像軟體 (ImageJ)，分析西方墨點法(A)中，*TvPI4P5K* (B) *TvARF220* (C)訊號強度，取自三次生物重複實驗，其平均相對值如長條圖所示 (n=3，平均值  $\pm$  標準差)。統計分析使用學生 t 檢定 (Student's t-test)，顯著性標示為 p<0.05 (\*) 和 p<0.01 (\*\*)，ns 表示無顯著差異。

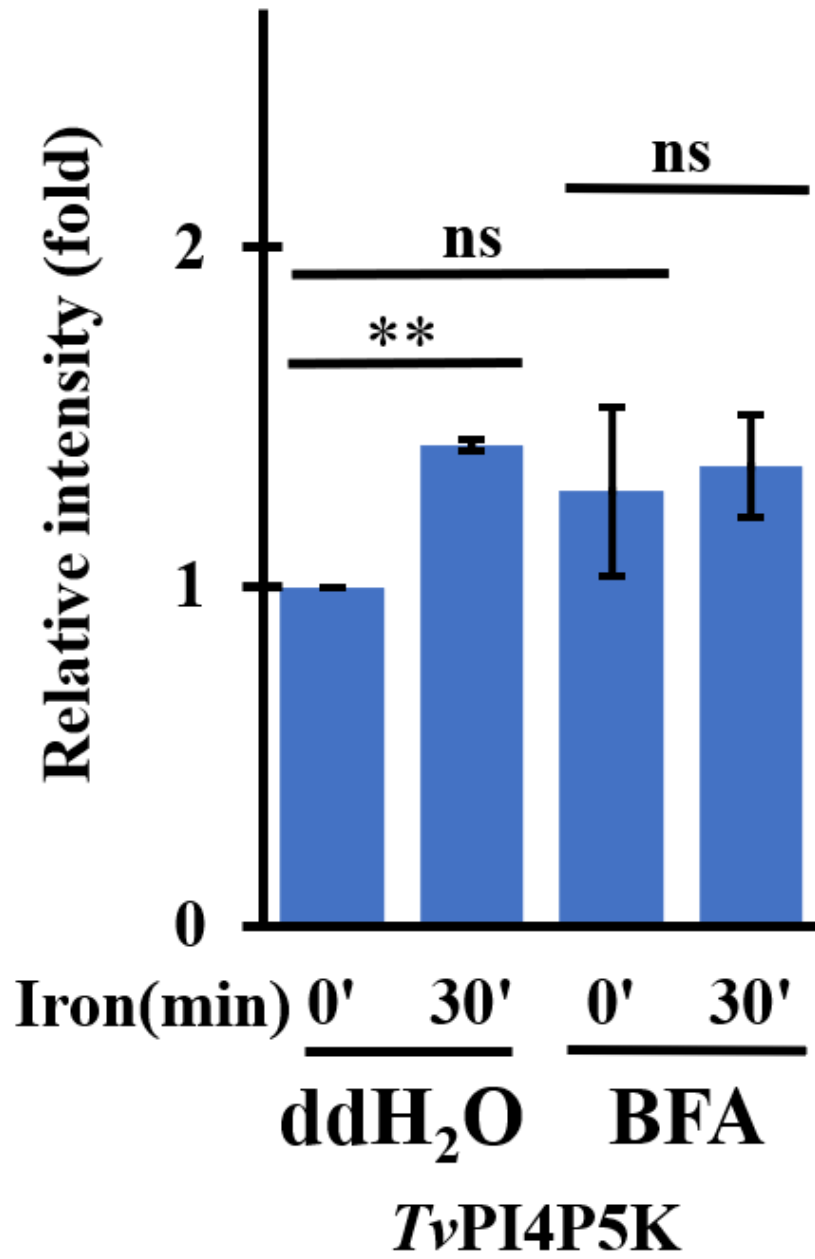


(A)



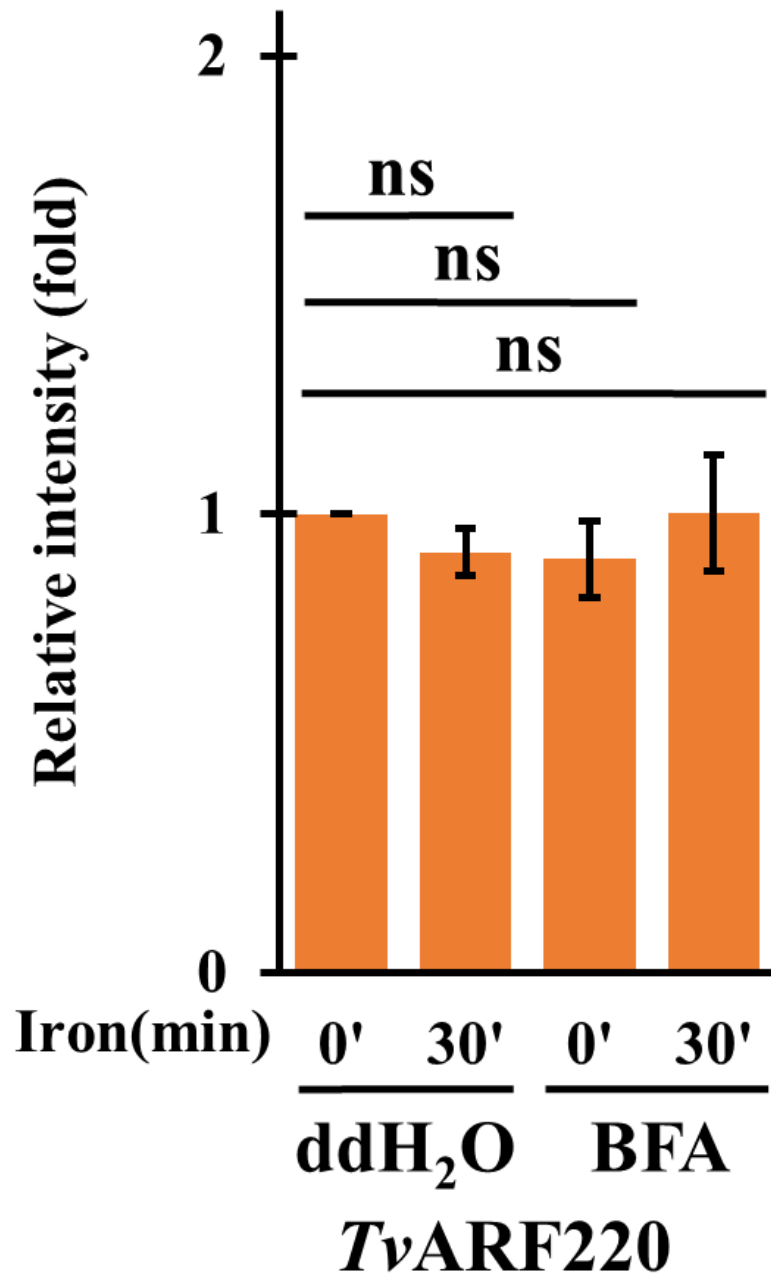


(B)





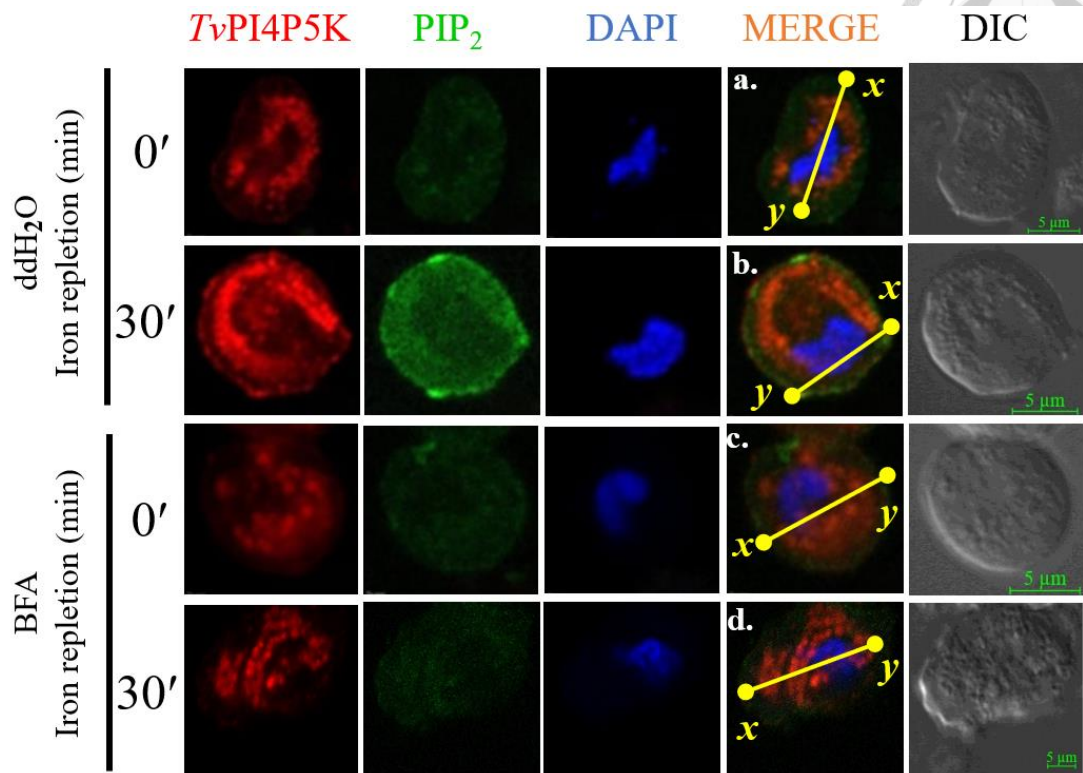
(C)



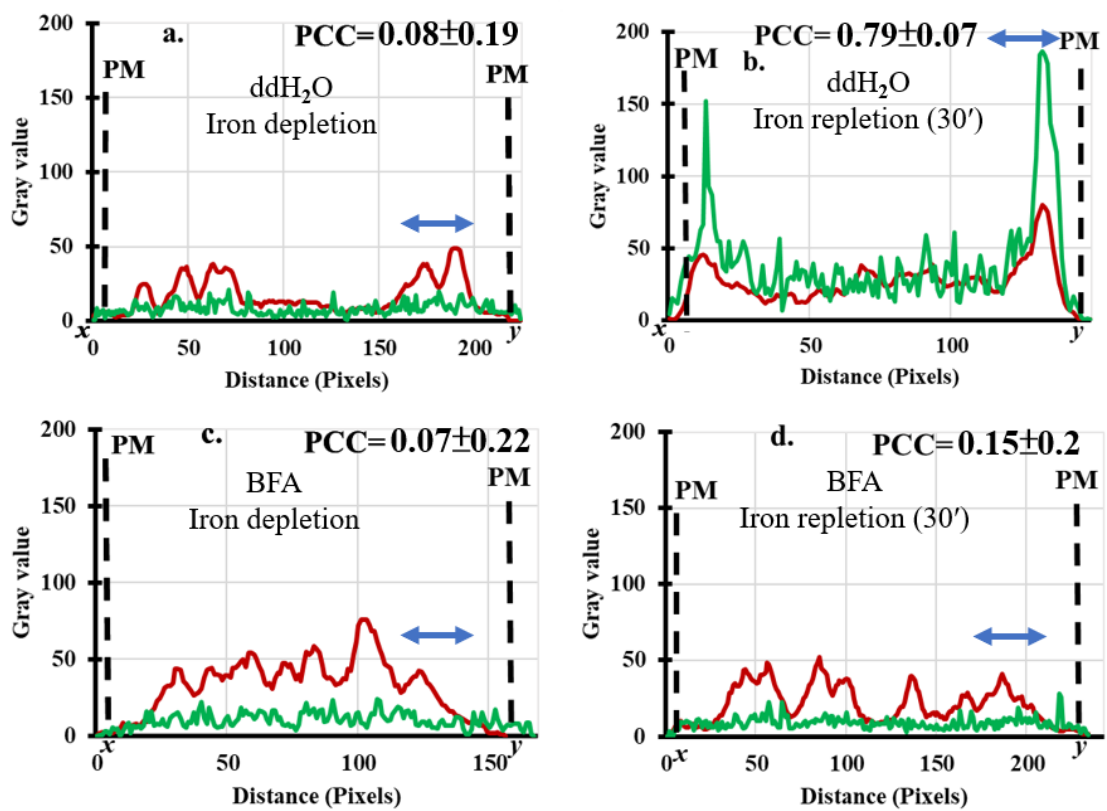
圖八、 BFA 影響 *TvPI4P5K* 與  $PIP_2$  在鐵刺激下於陰道滴蟲分布差異

- (A) 隔夜去鐵培養 TH-17 陰道滴蟲預處理 BFA 四小時後，加入鐵刺激 30 分鐘，讓活細胞貼附於載玻片上並固定。以 anti-*TvPI4P5K*、anti- $PIP_2$  進行雙重免疫螢光染色，以共軛焦顯微鏡觀察螢光訊號。DAPI 標記細胞核；Cy3 標記 *TvPI4P5K*；FITC 標記  $PIP_2$ ；MERGE 為 DAPI、*TvPI4P5K* 與  $PIP_2$  訊號重疊結果 (a., b., c., d.)，細胞外觀以 DIC 模式顯示，比例尺代表  $5\ \mu\text{m}$ 。
- (B) 透過影像軟體 (ImageJ) 分析沿著黃色線標記的 X 和 Y 之間的位置的螢光訊號強度，結果顯示於對應的折線圖中 (a., b., c., d.)。雙向箭頭藍線標示用以計算 PCC 區域，PCC 值由顯微視野中的代表性滋養體中測得。PM 代表細胞膜邊界。


(A)



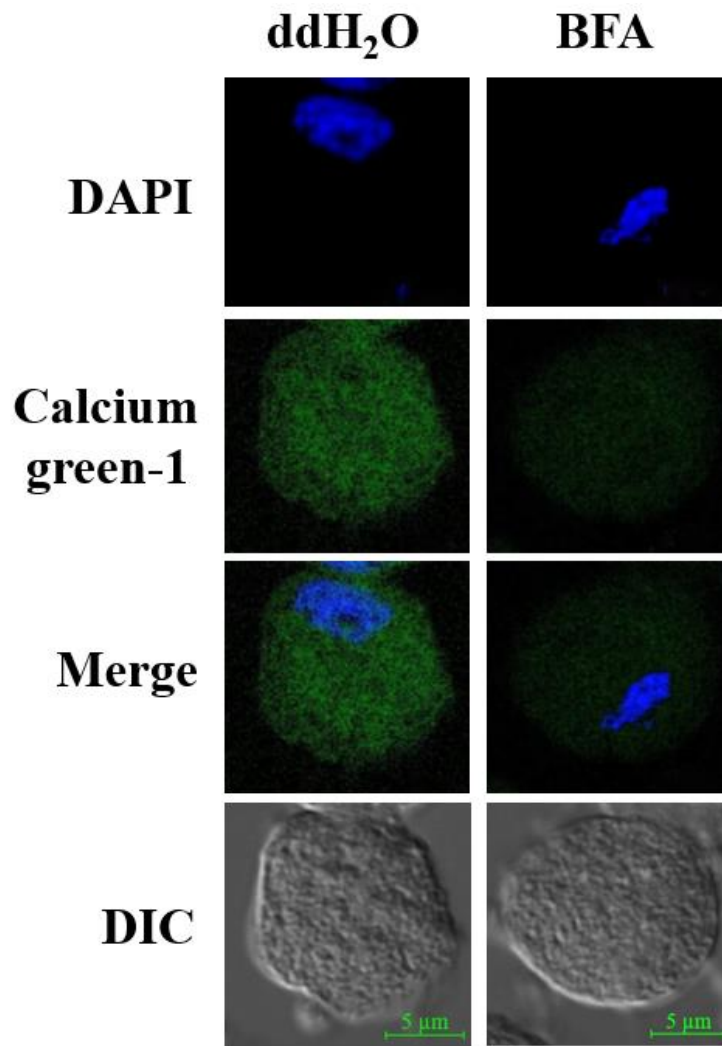
(B)



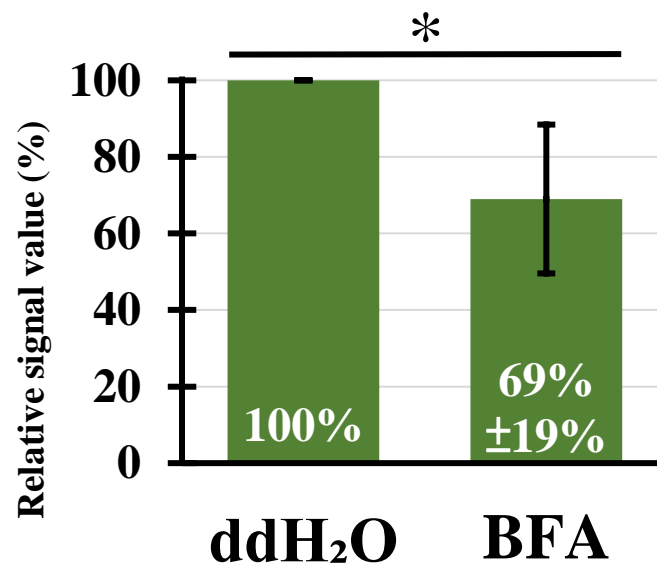
圖九、鈣離子在 BFA 處理後於陰道滴蟲分布情形與表現量分析

- 
- (A) 將 TH-17 陰道滴蟲分別加入 ddH<sub>2</sub>O 或 BFA 處理 4 小時，收集細胞。以 5 $\mu$ M Calcium green-1 進行螢光染色，固定後以 poly-D-lysine 貼附於載玻片之上。DAPI 標記細胞核；MERGE 為 DAPI 與 Calcium green 訊號重疊結果，細胞外觀以 DIC 模式顯示，比例尺代表 5  $\mu$ m；以共軛焦顯微鏡觀察螢光訊號。
- (B) 透過影像軟體 (ImageJ) 將相對鈣離子訊號強度取三次生物重複的平均值，如長條圖所示(n=3, 平均值  $\pm$  標準差)。統計分析使用學生 t 檢定(Student's t-test)，顯著性標示為 p<0.05 (\*) 和 p<0.01 (\*\*)，ns 表示無顯著差異。

(A)



(B)



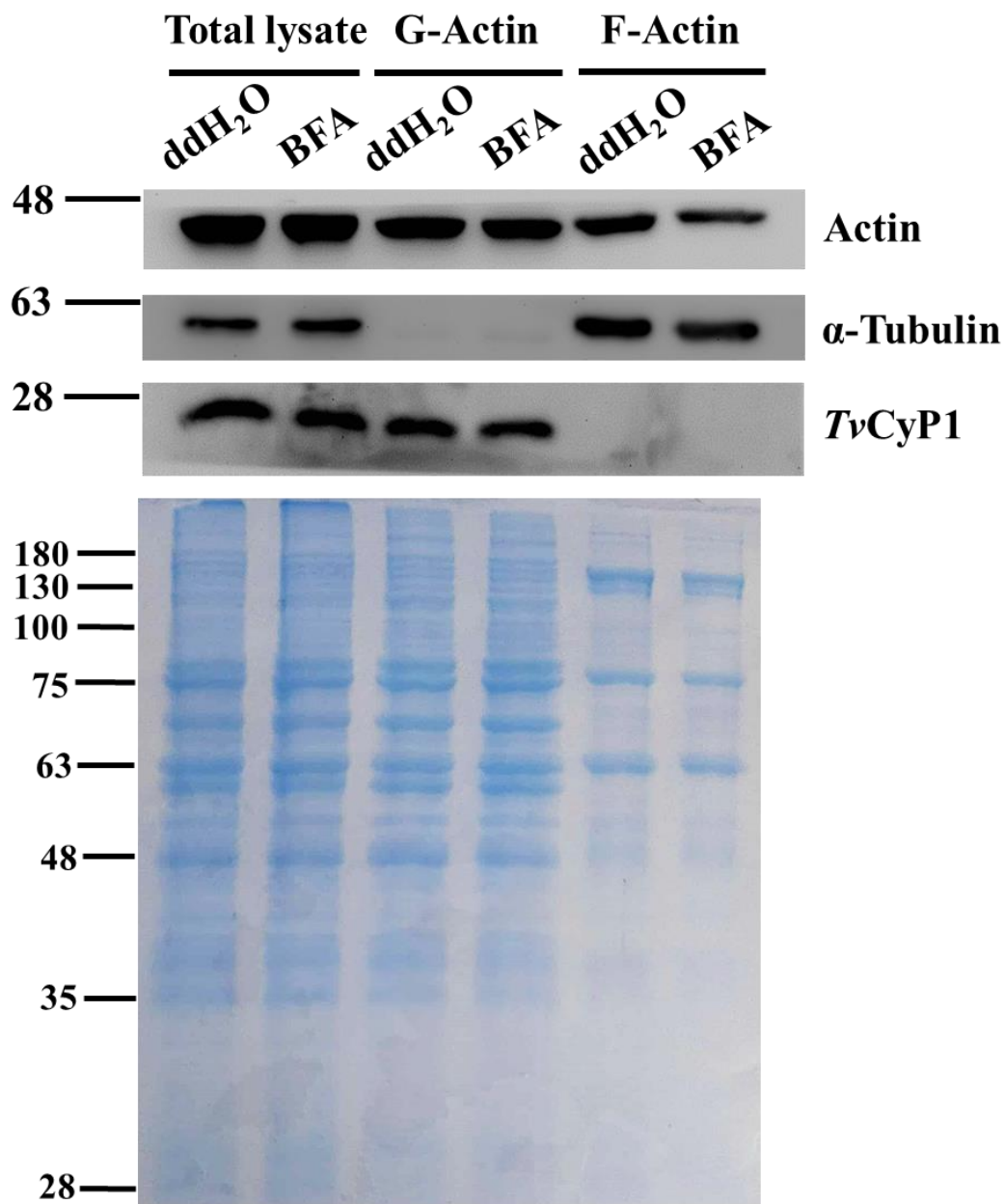
## 圖十、肌動蛋白沉降分萃



- (A) 將 TH-17 陰道滴蟲分別加入 ddH<sub>2</sub>O 或 BFA 處理 4 小時。以 G-actin/F-actin in vivo assay kit 分離並收集 G-actin、F-actin 萃取蛋白與全細胞裂解液後，以 40 μg 的蛋白質樣本在 12 % SDS 聚丙烯醯胺凝膠電泳分離後染色，或轉漬於 PVDF 膜上。以 anti- $\alpha$ -Tubulin、anti-actin、anti-TvCyP1 進行西方墨點法分析， $\alpha$ -Tubulin 與 TvCyP1 分別作為上清液 (G-actin) 與沉澱部分 (F-actin) 純度標記蛋白。
- (B) F-actin 與 G-actin 訊號強度分別以  $\alpha$ -Tubulin 與 TvCyP1 訊號強度標準化後，統計 G-actin/F-actin 百分比訊號，透過影像軟體 (ImageJ) 平均自三次生物重複西方墨點法之相對訊號強度，如長條圖所示 (n=3, 平均值  $\pm$  標準差)。統計分析使用學生 t 檢定 (Student's t-test)，顯著性標示為 p<0.05 (\*) 和 p<0.01 (\*\*), ns 表示無顯著差異。

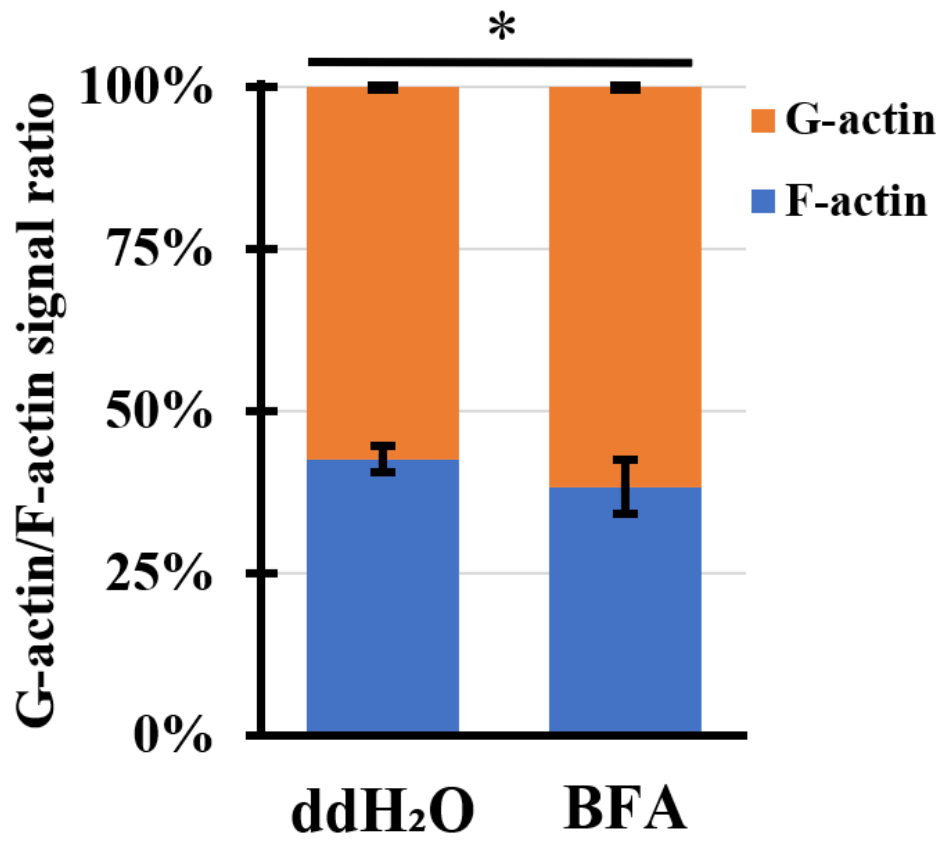


(A)





(B)



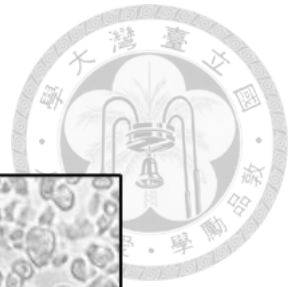
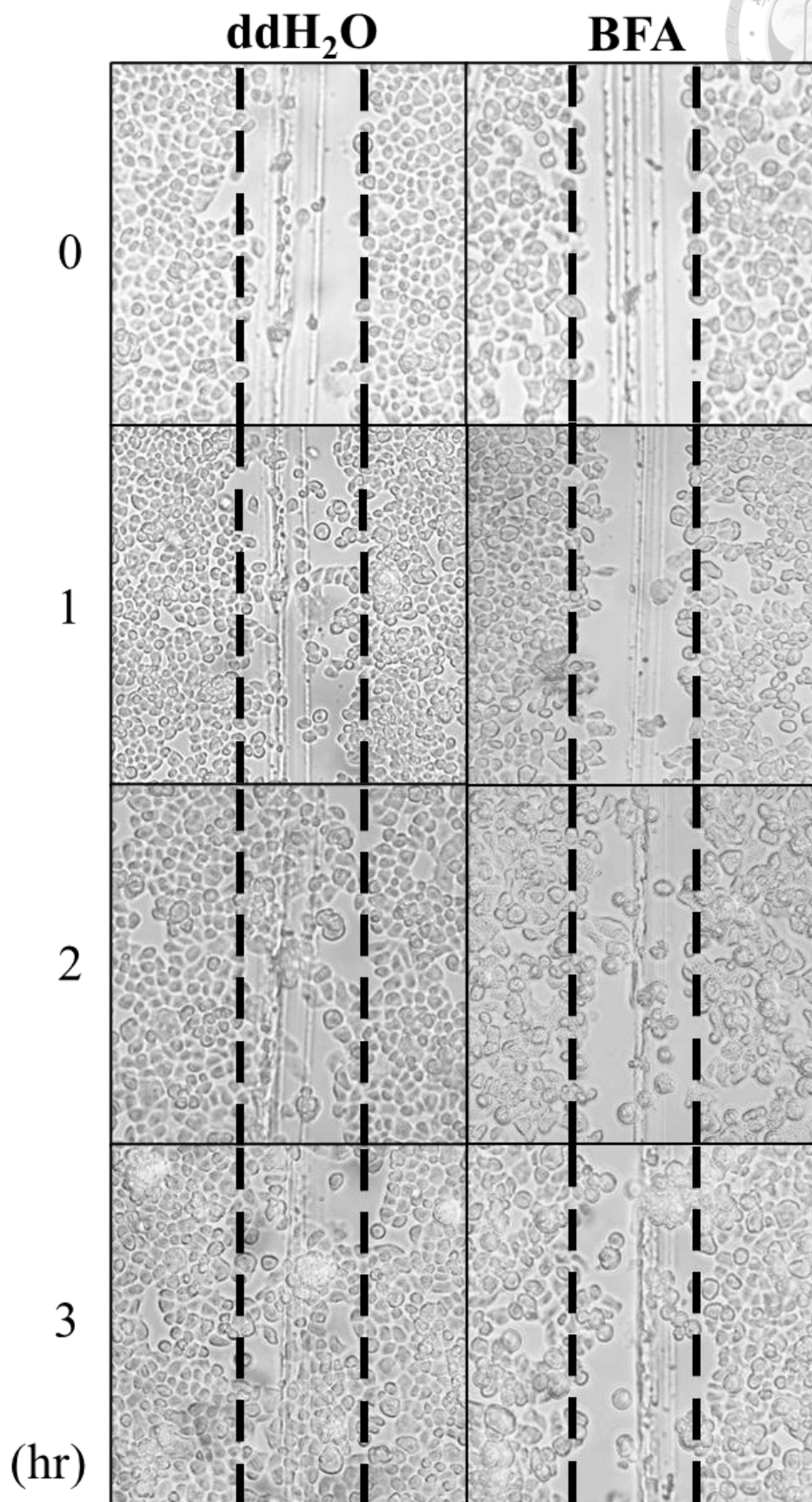
## 圖十一、細胞遷移癒合試驗



將 TH-17 陰道滴蟲培養於培養瓶平面，使用 BFA 處理 4 小時，之後進行細胞遷移癒合試驗：

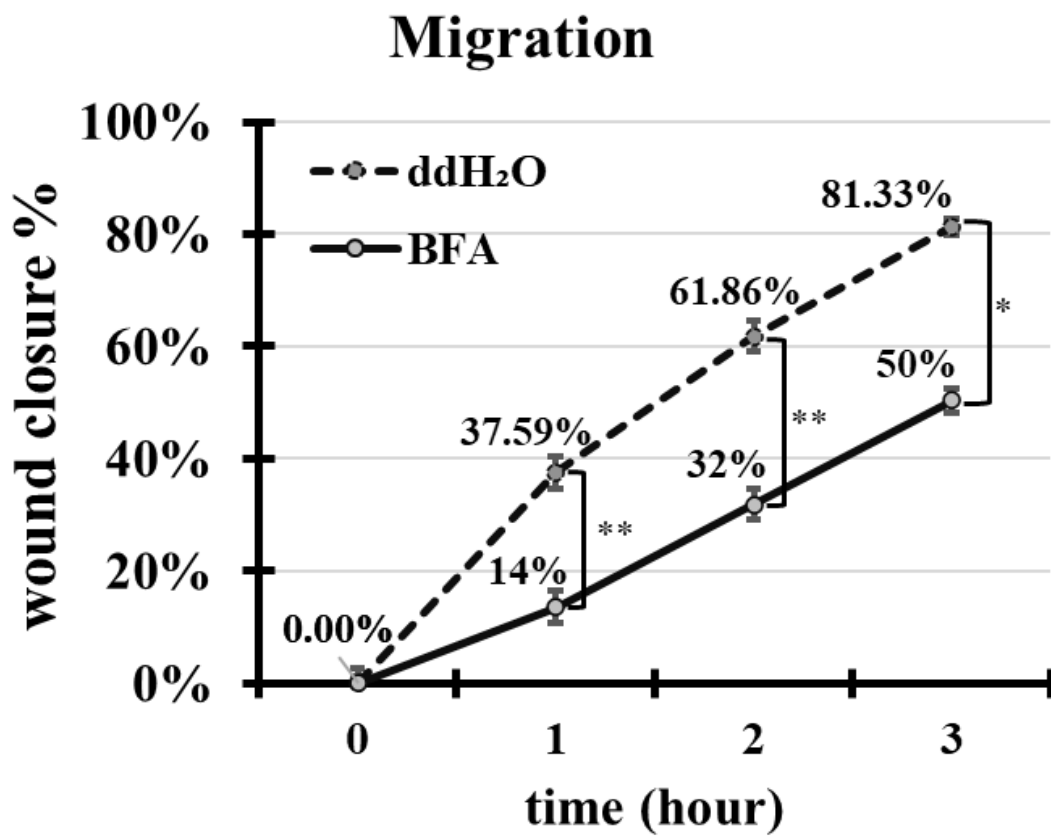
- (A) 間隔 1 小時以相機擷取圖像，共計觀察 3 小時。
- (B) 透過影像軟體 (ImageJ) 分析縫隙填補比例，結果平均自三次生物重複，經統計後如折線圖所示 ( $n=3$ ，平均值  $\pm$  標準差)。統計分析使用學生 t 檢定 (Student's t-test)，顯著性標示為  $p<0.05$  (\*) 和  $p<0.01$  (\*\*)，ns 表示無顯著差異。

(A)



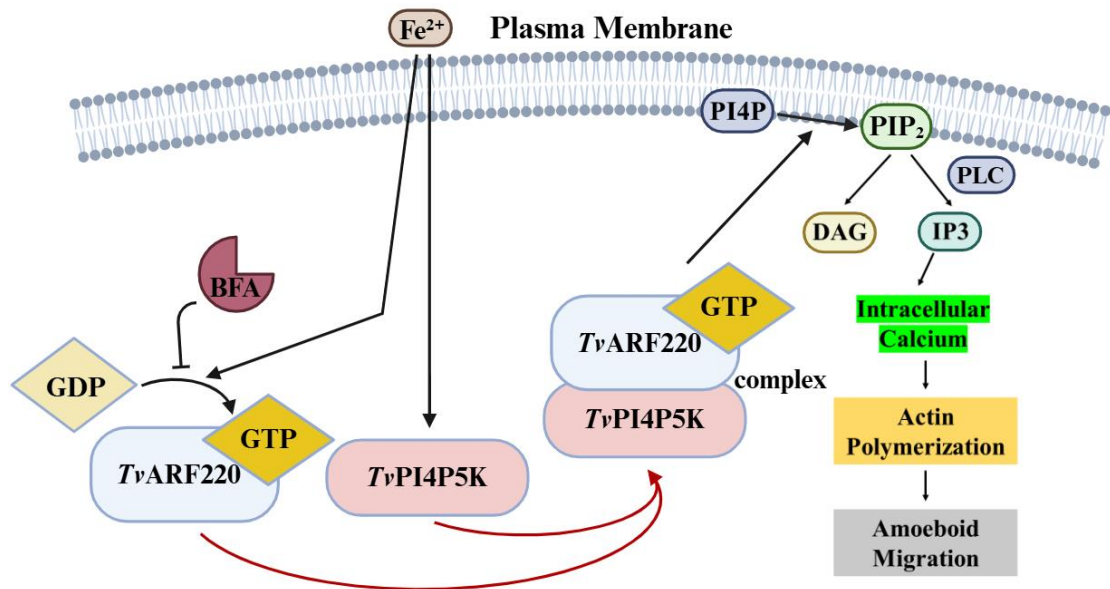


(B)

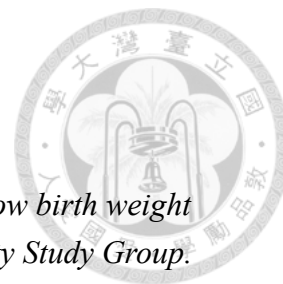


圖十二、推測機制模型

鐵能活化 *Tv*ARF220-GTP 型態促進與 *Tv*PI4P5K 形成複合體，因此一旦 *Tv*ARF220 功能被 BFA 抑制，將進一步連鎖影響 PIP<sub>2</sub> 生合成與下游鈣離子訊息傳導路徑，減緩肌動蛋白細胞骨架重組，最終導致由細胞骨架主導之阿米巴遷移能力下降。



# 參考文獻



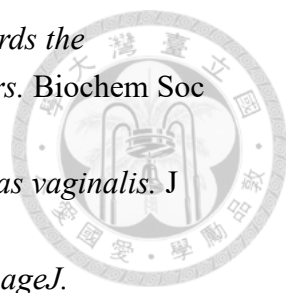
1. Cotch, M.F., et al., *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *The Vaginal Infections and Prematurity Study Group*. *Sex Transm Dis*, 1997. **24**(6): p. 353-60.
2. Gerbase, A.C., et al., *Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs*. *Sex Transm Infect*, 1998. **74 Suppl 1**: p. S12-6.
3. Leitsch, D., *Recent Advances in the Trichomonas vaginalis Field*. *F1000Res*, 2016. **5**.
4. Shafir, S.C., F.J. Sorvillo, and L. Smith, *Current issues and considerations regarding trichomoniasis and human immunodeficiency virus in African-Americans*. *Clin Microbiol Rev*, 2009. **22**(1): p. 37-45, Table of Contents.
5. Stark, J.R., et al., *Prospective study of Trichomonas vaginalis infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' Health Study*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(20): p. 1406-11.
6. Zhang, Z.F. and C.B. Begg, *Is Trichomonas vaginalis a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies*. *Int J Epidemiol*, 1994. **23**(4): p. 682-90.
7. Huang, S.H., et al., *Prevalence, Associated Factors, and Appropriateness of Empirical Treatment of Trichomoniasis, Bacterial Vaginosis, and Vulvovaginal Candidiasis among Women with Vaginitis*. *Microbiol Spectr*, 2023. **11**(3): p. e0016123.
8. Dunne, R.L., et al., *Drug resistance in the sexually transmitted protozoan Trichomonas vaginalis*. *Cell Res*, 2003. **13**(4): p. 239-49.
9. Hirt, R.P., *Trichomonas vaginalis virulence factors: an integrative overview*. *Sex Transm Infect*, 2013. **89**(6): p. 439-43.
10. Arroyo, R., et al., *Signalling of Trichomonas vaginalis for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence*. *Mol Microbiol*, 1993. **7**(2): p. 299-309.
11. Shiratori, M., et al., *Persistent Trichomonas vaginalis infections and the pseudocyst form*. *Trends Parasitol*, 2023. **39**(12): p. 1023-1031.
12. Arroyo, R., J. Engbring, and J.F. Alderete, *Molecular basis of host epithelial cell recognition by Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol*, 1992. **6**(7): p. 853-62.
13. Hirt, R.P., et al., *Trichomonas vaginalis pathobiology new insights from the genome sequence*. *Adv Parasitol*, 2011. **77**: p. 87-140.
14. Lama, A., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-*

- associated, fibronectin-binding protein of Trichomonas vaginalis*. Infect Immun, 2009. **77**(7): p. 2703-11.
15. Kummer, S., et al., *Induction of human host cell apoptosis by Trichomonas vaginalis cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron*. Microb Pathog, 2008. **44**(3): p. 197-203.
16. Sommer, U., et al., *Identification of Trichomonas vaginalis cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23853-60.
17. Quan, J.H., et al., *Trichomonas vaginalis metalloproteinase induces apoptosis of SiHa cells through disrupting the Mcl-1/Bim and Bcl-xL/Bim complexes*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110659.
18. Alderete, J.F., D. Provenzano, and M.W. Lehker, *Iron mediates Trichomonas vaginalis resistance to complement lysis*. Microb Pathog, 1995. **19**(2): p. 93-103.
19. Provenzano, D. and J.F. Alderete, *Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of Trichomonas vaginalis*. Infect Immun, 1995. **63**(9): p. 3388-95.
20. Mendoza-Lopez, M.R., et al., *CP30, a cysteine proteinase involved in Trichomonas vaginalis cytoadherence*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 4907-12.
21. Midlej, V. and M. Benchimol, *Trichomonas vaginalis kills and eats--evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect*. Parasitology, 2010. **137**(1): p. 65-76.
22. Mandal, K., *Review of PIP<sub>2</sub> in Cellular Signaling, Functions and Diseases*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(21).
23. Oude Weernink, P.A., M. Schmidt, and K.H. Jakobs, *Regulation and cellular roles of phosphoinositide 5-kinases*. Eur J Pharmacol, 2004. **500**(1-3): p. 87-99.
24. van Rheenen, J., et al., *EGF-induced PIP<sub>2</sub> hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells*. J Cell Biol, 2007. **179**(6): p. 1247-59.
25. Levental, I., et al., *Calcium-dependent lateral organization in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)- and cholesterol-containing monolayers*. Biochemistry, 2009. **48**(34): p. 8241-8.
26. Nishizuka, Y., *The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion*. Nature, 1984. **308**(5961): p. 693-8.
27. Cohen, G., et al., *Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation*. Dev Biol, 2004. **267**(1): p. 230-41.
28. Berridge, M.J. and R.F. Irvine, *Inositol trisphosphate, a novel second*

- messenger in cellular signal transduction*. Nature, 1984. **312**(5992): p. 315-21.
29. Walensky, L.D. and S.H. Snyder, *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm*. J Cell Biol, 1995. **130**(4): p. 857-69.
30. Antonescu, C.N., et al., *Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(14): p. 2588-600.
31. Ling, K., et al., *Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions*. Nature, 2002. **420**(6911): p. 89-93.
32. Delang, L., J. Paeshuyse, and J. Neyts, *The role of phosphatidylinositol 4-kinases and phosphatidylinositol 4-phosphate during viral replication*. Biochem Pharmacol, 2012. **84**(11): p. 1400-8.
33. Chytla, A., et al., *Plasma membrane and nuclear phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signalling in cancer*. Lipids Health Dis, 2025. **24**(1): p. 39.
34. Chen, Y.J., et al., *PIP<sub>2</sub> regulating calcium signal modulates actin cytoskeleton-dependent cytoadherence and cytolytic capacity in the protozoan parasite Trichomonas vaginalis*. PLoS Pathog, 2023. **19**(12): p. e1011891.
35. Wu, K.Y., et al., *Iron triggers TvPI4P5K proteostasis and Arf-mediated cell membrane trafficking to regulate PIP(2) signaling crucial for multiple pathogenic activities of the parasitic protozoan Trichomonas vaginalis*. mBio, 2025. **16**(2): p. e0186424.
36. 林書帆, 陰道滴蟲 PI4P5K 參與在鐵刺激 PIP<sub>2</sub> 產生的功能角色, in 臺灣大學微生物研究所. 2018.
37. 譚彥汝, 不同陰道滴蟲分離株磷脂酰肌醇 4-磷酸 5-激酶表現量差異分析, in 臺灣大學微生物研究所. 2021.
38. Hongu, T. and Y. Kanaho, *Activation machinery of the small GTPase Arf6*. Adv Biol Regul, 2014. **54**: p. 59-66.
39. D'Souza-Schorey, C. and P. Chavrier, *ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 347-58.
40. D'Souza-Schorey, C., et al., *A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis*. Science, 1995. **267**(5201): p. 1175-8.
41. Peters, P.J., et al., *Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments*. J Cell Biol, 1995. **128**(6): p. 1003-17.
42. Brown, F.D., et al., *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic*. J Cell Biol, 2001. **154**(5): p. 1007-17.
43. Altschuler, Y., et al., *ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells*. J Cell Biol, 1999. **147**(1): p. 7-

- 12.
44. Claing, A., et al., *beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42509-13.
45. Aikawa, Y. and T.F. Martin, *ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis*. J Cell Biol, 2003. **162**(4): p. 647-59.
46. Donaldson, J.G. and C.L. Jackson, *ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(6): p. 362-75.
47. Volpicelli-Daley, L.A., et al., *Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4495-508.
48. Honda, A., et al., *Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation*. Cell, 1999. **99**(5): p. 521-32.
49. Radhakrishna, H., R.D. Klausner, and J.G. Donaldson, *Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase*. J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 935-47.
50. Donaldson, J.G., *Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41573-6.
51. Winterbourn, C.C., *Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction*. Toxicol Lett, 1995. **82-83**: p. 969-74.
52. Lill, R., *Function and biogenesis of iron-sulphur proteins*. Nature, 2009. **460**(7257): p. 831-8.
53. Sanvisens, N., et al., *Regulation of ribonucleotide reductase in response to iron deficiency*. Mol Cell, 2011. **44**(5): p. 759-69.
54. Abbaspour, N., R. Hurrell, and R. Kelishadi, *Review on iron and its importance for human health*. J Res Med Sci, 2014. **19**(2): p. 164-74.
55. Figueroa-Angulo, E.E., et al., *RNA-Binding Proteins in Trichomonas vaginalis: Atypical Multifunctional Proteins*. Biomolecules, 2015. **5**(4): p. 3354-95.
56. Kim, I., E.A. Yetley, and M.S. Calvo, *Variations in iron-status measures during the menstrual cycle*. Am J Clin Nutr, 1993. **58**(5): p. 705-9.
57. Lehker, M.W., R. Arroyo, and J.F. Alderete, *The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan Trichomonas vaginalis*. J Exp Med, 1991. **174**(2): p. 311-8.
58. Garcia, A.F., et al., *Iron and contact with host cells induce expression of*

- adhesins on surface of Trichomonas vaginalis*. Mol Microbiol, 2003. **47**(5): p. 1207-24.
59. Rendon-Gandarilla, F.J., et al., *The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in Trichomonas vaginalis cytoadherence*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 561979.
60. Solano-Gonzalez, E., et al., *The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron-responsive element*. FEBS Lett, 2007. **581**(16): p. 2919-28.
61. Hernandez-Gutierrez, R., J. Ortega-Lopez, and R. Arroyo, *A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from Trichomonas vaginalis, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity*. J Eukaryot Microbiol, 2003. **50 Suppl**: p. 696-8.
62. Alvarez-Sanchez, M.E., et al., *Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in Trichomonas vaginalis*. Microbes Infect, 2007. **9**(14-15): p. 1597-605.
63. Hsu, H.M., et al., *Signal transduction triggered by iron to induce the nuclear importation of a Myb3 transcription factor in the parasitic protozoan Trichomonas vaginalis*. J Biol Chem, 2014. **289**(42): p. 29334-49.
64. Dias-Lopes, G., et al., *Morphologic study of the effect of iron on pseudocyst formation in Trichomonas vaginalis and its interaction with human epithelial cells*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2017. **112**(10): p. 664-673.
65. Helms, J.B. and J.E. Rothman, *Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF*. Nature, 1992. **360**(6402): p. 352-4.
66. Renault, L., B. Guibert, and J. Cherfils, *Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 525-30.
67. Zeeh, J.C., et al., *Dual specificity of the interfacial inhibitor brefeldin a for arf proteins and sec7 domains*. J Biol Chem, 2006. **281**(17): p. 11805-14.
68. Cherfils, J. and P. Melancon, *On the action of Brefeldin A on Sec7-stimulated membrane-recruitment and GDP/GTP exchange of Arf proteins*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 4): p. 635-8.
69. Peyroche, A., et al., *Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain*. Mol Cell, 1999. **3**(3): p. 275-85.
70. Repella, T.L., et al., *Arf6-dependent intracellular trafficking of Pasteurella multocida toxin and pH-dependent translocation from late endosomes*. Toxins (Basel), 2011. **3**(3): p. 218-41.

- 
71. Zeghouf, M., et al., *Arf, Sec7 and Brefeldin A: a model towards the therapeutic inhibition of guanine nucleotide-exchange factors*. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 6): p. 1265-8.
72. Ryu, J.S., et al., *Effect of iron on the virulence of Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol*, 2001. **87**(2): p. 457-60.
73. M.D. Abramoff, P.J.M., S.J. Ram, *Image Processing with ImageJ*. *Biophotonics International*, 2004. **11**(7): p. 36-42.
74. Wang, K.H., et al., *An Atypical F-Actin Capping Protein Modulates Cytoskeleton Behaviors Crucial for Trichomonas vaginalis Colonization*. *Microbiol Spectr*, 2023. **11**(4): p. e0059623.
75. Pasqualato, S., et al., *The structural GDP/GTP cycle of human Arf6*. *EMBO Rep*, 2001. **2**(3): p. 234-8.
76. Neuwald, A.F., *Bayesian classification of residues associated with protein functional divergence: Arf and Arf-like GTPases*. *Biol Direct*, 2010. **5**: p. 66.
77. Smulders, L., et al., *Phosphatidylinositol Monophosphates Regulate the Membrane Localization of HSPA1A, a Stress-Inducible 70-kDa Heat Shock Protein*. *Biomolecules*, 2022. **12**(6).
78. Park, S.J., T. Itoh, and T. Takenawa, *Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type I is regulated through phosphorylation response by extracellular stimuli*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4781-7.
79. Beaudoin, J., et al., *Fission yeast RNA-binding proteins Puf2 and Puf4 are involved in repression of ferrireductase Frp1 expression in response to iron*. *Mol Microbiol*, 2021. **116**(5): p. 1361-1377.
80. Satoh, R., et al., *Fission Yeast PUF Proteins Puf3 and Puf4 Are Novel Regulators of PI4P5K Signaling*. *Biol Pharm Bull*, 2023. **46**(2): p. 163-169.
81. Meng, X., et al., *Triggered Golgi membrane enrichment promotes PtdIns(4,5)P2 generation for plasma membrane repair*. *J Cell Biol*, 2023. **222**(8).
82. Oh, B.C., *Phosphoinositides and intracellular calcium signaling: novel insights into phosphoinositides and calcium coupling as negative regulators of cellular signaling*. *Exp Mol Med*, 2023. **55**(8): p. 1702-1712.
83. Ziomek, G., C. van Breemen, and M. Esfandiarei, *Drop in endo/sarcoplasmic calcium precedes the unfolded protein response in Brefeldin A-treated vascular smooth muscle cells*. *Eur J Pharmacol*, 2015. **764**: p. 328-339.
84. Vitale, N., et al., *Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane*. *J Cell Biol*, 2002. **159**(1): p. 79-89.
85. Chan, W.W.R., et al., *ARF6-Rac1 signaling-mediated neurite outgrowth is*

*potentiated by the neuronal adaptor FE65 through orchestrating ARF6 and ELMO1.* FASEB J, 2020. **34**(12): p. 16397-16413.

86. Schafer, D.A., C. D'Souza-Schorey, and J.A. Cooper, *Actin assembly at membranes controlled by ARF6.* Traffic, 2000. **1**(11): p. 892-903.



# 附錄




## 附錄一、TYI-S33 培養液

藥品名稱	用量
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (SIGMA)	2.66 g
Trypticase (BD)	20 g
Glucose (SIGMA)	10 g
NaCl (Honeywell)	2 g
L-Ascorbic acid (SIGMA)	0.2 g
L-Cysteine hydrochloride monohydrate (SIGMA)	2.2 g
Yeast Extract (MERCK)	10 g
Penicillin G/ Streptomycin solution (GeneTeks)	10 ml
Basal Medium Eagle vitamin solution (SIGMA)	10 ml

將以上藥品用 900 ml 二次水調配，以 0.22  $\mu$ m 孔徑的 filter (Sartorius) 過濾後，另加入經 56°C 去活性處理的 100 ml 牛血清 (Bovine Serum, GIBCO)，短期使用保存於 4°C。

## 附錄二、綜合抑制劑與必要成分



名稱	作用濃度	作用標的
Cocktail protease inhibitor (MCE)	1×	Protease
Protease inhibitor (Cytoskeleton)	1×	Protease
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, SIGMA)	5 mM	Protease
Tosyl-L-lysyl-chloromethyl hydrochloride (TLCK, SIGMA)	200 µg/ml	Protease
Adenosine triphosphate (ATP, Pharmacia)	2 mM	Protease

### 附錄三、抗體



#### 1. 免疫螢光染色

一級抗體	稀釋倍率
Mouse anti-PIP <sub>2</sub> monoclonal antibody (Z-P045 echelon)	1:400
Rat anti-TvARF220 polyclonal antibody (Homemade)	1:1000
Rabbit anti-TvPI4P5K polyclonal antibody (Homemade)	1:1000
二級抗體	稀釋倍率
Cyanine Cy <sup>TM</sup> 3(CY3) conjugated goat anti-rat IgG polyclonal (Jackson)	1:200
Fluorescein (FITC) conjugated goat anti-mouse IgM polyclonal (115-095-003 Jackson)	1:200
Alex488 anti-rat IgG polyclonal	1:200

#### 2. 西方墨點法

一級抗體	稀釋倍率
Mouse anti-actin monoclonal antibody	1:20000
Mouse anti- $\alpha$ -Tubulin monoclonal antibody	1:10000
Rat anti-TvCyP1 monoclonal antibody	1:3000
Rat anti-TvARF220 monoclonal antibody (Homemade)	1:5000
Rabbit anti-TvPI4P5K monoclonal antibody	1:1500
二級抗體	稀釋倍率
Peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG	1:5000
Peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG	1:5000
Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG	1:5000

#### 附錄四、西方墨點法使用溶液



#### Blocking buffer :

Anti-actin : 1 % BSA in 0.1 % Tween 20 in TBS

Anti- $\alpha$ -Tubulin : 5 % 脫脂奶粉 in 0.1 % Tween 20 in PBS

Anti-TvCyP1 : 5 % 脫脂奶粉 in 0.1 % Tween 20 in PBS

Anti-TvARF220 : 5 % 脫脂奶粉 in 0.1 % Tween 20 in PBS

Anti-TvPI4P5K : 5 % 脫脂奶粉 in 0.1 % Tween 20 in PBS

#### 沖洗液 :

根據 blocking 類型選用 PBS / TBS

#### 一級抗體 :

Anti-actin : 1 % BSA in 0.1 % Tween 20 in TBS

Anti- $\alpha$ -Tubulin : 1 % BSA in 0.1 % Tween 20 in PBS

Anti-TvCyP1 : 5 % 脫脂奶粉 in 0.1 % Tween 20 in PBS

Anti-TvARF220 : 5 % 脫脂奶粉 in 0.1 % Tween 20 in PBS

Anti-TvPI4P5K : 5 % 脫脂奶粉 in 0.1 % Tween 20 in PBS

#### 二級抗體 :

Mouse IgG for anti-actin : 1 % BSA in 0.1 % Tween 20 in TBS

Mouse IgG for anti- $\alpha$ -Tubulin : 1 % BSA in 0.1 % Tween 20 in PBS

Rat IgG for anti-TvCyP1 : 5 % 脫脂奶粉 in 0.1 % Tween 20 in PBS

Rat IgG for anti-TvARF220 : 5 % 脫脂奶粉 in 0.1 % Tween 20 in PBS

Rabbit IgG for anti-TvPI4P5K : 5 % 脫脂奶粉 in 0.1 % Tween 20 in PBS