

Wykorzystanie obecności celulozy w ścianie komórkowej cyst *Acanthamoeba* do celów diagnostycznych

Use of the presence of cellulose in cellular wall of *Acanthamoeba* cysts for diagnostic purposes

Monika Derda, Edward Hadaś

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań

Adres do korespondencji: Monika Derda, Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań; E-mail: mderda@ump.edu.pl

ABSTRACT. Species identification within the genus *Acanthamoeba* is based predominantly on morphological and biochemical features. It is labor-intensive and requires cloning and axenization. We described a novel immunocytochemical method for the identification of *Acanthamoeba* spp. based on selective binding of *Clostridium cellulovorans* cellulase to protozoan cyst wall cellulose. Free-living amoebae isolated from different water sources by filtration and subsequent cultivation on non-nutrient agar were assigned to genera *Acanthamoeba*, *Naegleria* or *Hartmannella* using morphological taxonomic criteria. Tissues samples from experimentally infected mice were fixed in formalin and for sectioning embedded in paraffin or snap frozen. The Cellulose-Binding Domain of *C. cellulovorans* cellulase (CBD) obtained as a recombinant protein, were coupled to the fluorescent dye using Alexa Fluor®350, 488, 568 – Protein Labelling Kit or labelled with the biotin using EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin. All coupling procedures were performed according to the methods provided by manufacturers. For staining with CBD conjugate, slides containing cysts collected from the agar plates or tissue sections were immersed with PBS and incubated with CBD for 30 min at room temperature, washed 3 times with PBS. For staining with CBD-biotin slides containing cysts were incubated with biotinylated CBD for 30 min at room temperature. Subsequent washings in changes of PBS were followed by the incubation with Strept ABCComplex/HRP, for 30 min at room temperature, than 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride was added for 15 min. Slides were rinsed with water, dried and examined in the light microscope. We showed that cellulose could be easily detected by immunofluorescence using conjugated CBD in the inner cyst wall of *Acanthamoeba* spp. The reference strains of *Acanthamoeba* spp. and all *Acanthamoeba* strains isolated from water and from tissues of infected animals gave positive reaction. CBD prepared as a biotinylated protein can be also used for the demonstration of *Acanthamoeba* cyst in infected tissues and environmental samples.

Key words: *Acanthamoeba*, cellulase, Cellulose-Binding Domain (CBD)

Wstęp

Wiele pasożytniczych pierwotniaków posiada zdolność tworzenia cyst jako stadiów przetrwalnikowych. Przeważnie głównym składnikiem ściany cyst jest chityna. *Acanthamoeba* stanowi jeden z wyjątków, bowiem w ścianie cyst zamiast chityny występuje celuloza. Celuloza składa się z cząstek D-glukozy połączonych wiązaniami 1,4-glikozydo-

wymi. Chityna jest bardzo podobna, ale zawiera monomery N-acetylo-D-glukozoaminy. Obie te polimorficzne formy mają bardzo podobną krystaliczną makroskopową budowę [1]. Różnicowanie cytochemiczne między celulozą i chityną w mikroskopie świetlnym nie było do tej pory możliwe z powodu podobieństwa składowej szkieletu, którą jest 1,4-heksoza. Badania biochemiczne wykazały, że obecność celulozy m.in. w tkankach roślinnych, ale rów-

niez i w ścianie cyst pierwotniaków, można łatwo wykryć wykorzystując do tego celu specyficzną budowę celulaz [2–4]. Większość celulaz składa się z dziedziny katalitycznej oraz dziedziny wiążącej celulozę (CBD–Cellulose-Binding Domain) połączonych wiązaniem. Katalityczna dziedzina zawiera aktywne miejsce z pozostałością aminokwasu odpowiedzialną za mechanizmy hydrolityczne. Natomiast rolą CBD jest przyłączanie się do celulozy. Celuloza zawarta w ścianie komórkowej cyst może wiązać się z dziedziną wiążącą celulozy (CBD). Zdolność CBD do wiązania się z celulozą może być wykorzystywana w diagnostyce. Indywidualne typy CBD mogą różnić się znacząco w swoich właściwościach, takich jak: powinowactwo, preferencje do krystalicznej albo bezpostaciowej celulozy oraz krzyżowe reakcje z innymi, podobnymi węglowodanami [5–9].

Celem naszych badań było wykorzystanie specyficznej chemicznej budowy cyst *Acanthamoeba* spp. do celów diagnostycznych. Do wykrywania obecności *Acanthamoeba* w próbach środowiskowych i materiale diagnostycznym, wykorzystaliśmy zdolność wybiórczego wiązania celulozy *Clostridium cellulovorans* do celulozy w ścianie cyst pierwotniaków.

Material i metody

Preparaty cyst uzyskano z hodowli akсенicznej na podłożu płynnym Červy [10] oraz z hodowli na stałym podłożu agarowym NNE [11]. Do badań wykorzystano cysty wzorcowych szczepów *Acanthamoeba castellanii* – 309, *A. polyphaga* – 298, *A. rhysodes* – Chang, *Hartmannella vermiformis* – ATCC 50256, *Naegleria* sp. – IC 1 oraz izolaty pełzaków uzyskane ze środowiska. Materiałem badanym były również tkanki myszy zarażonych *Acanthamoeba castellanii*. Do badań wykorzystano 2–3 tygodniowe myszy szczepu BALB/c, którym podawano donosowo ok. 4×10^4 trofozoitów *A. castellanii*. Próby tkanek (płuca, mózg) pobrane od zarażonych zwierząt przechowywano w formalinie, a następnie zatopiono w parafinie i pocięto mikrotomem na skrawki o grubości 5 μm . Przed barwieniem, skrawki parafinowe odparafinowano i odwodniono w dwukrotnie zmienianym ksylenie i etanolu (99,9%, 95,5% i 70%) po 5 min, a następnie preparaty utrwalono w acetonie przez 20 min [12].

Obecność celulozy w ścianie cyst pełzaków wykrywano stosując cztery różne koniugaty CBD mające zdolność wiązania się z celulozą. Do badań wy-

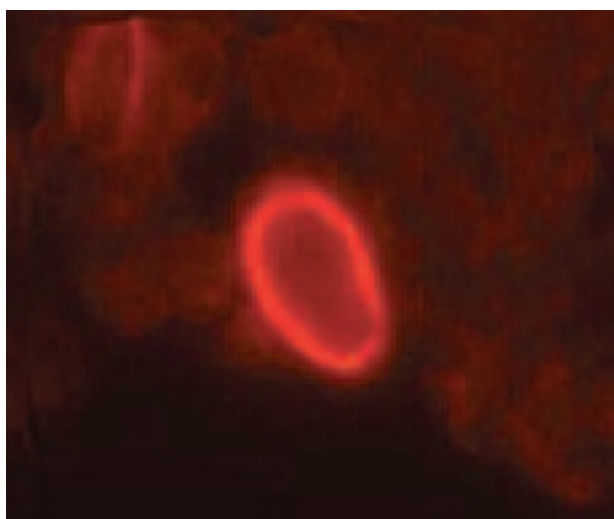
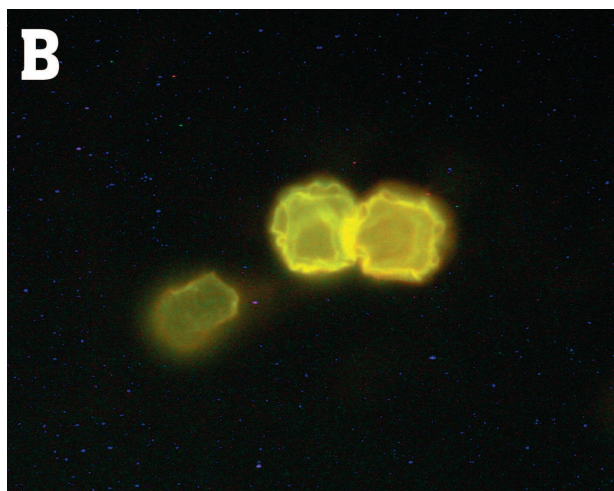
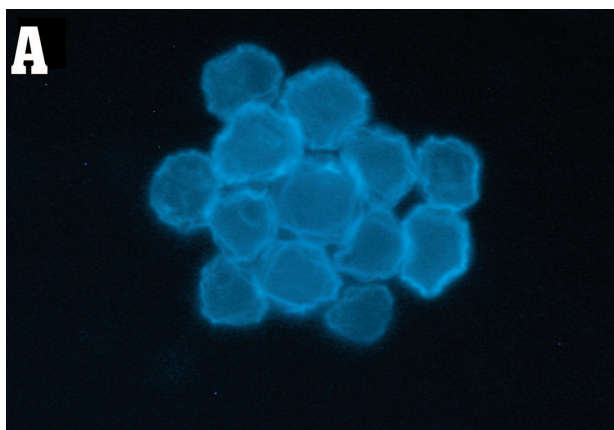
korzystano rekombinowane CBD (Cellulose-Binding Domain) pozyskane od celulitycznych bakterii *Clostridium cellulovorans* (Sigma).

Koniugaty CBD otrzymano jako połączenie rekombinowanego białka z barwnikiem fluorescencyjnym, używając Alexa Fluor®350 (niebieski), Alexa Fluor®488 (zielony) i Alexa Fluor®568 (pomarańczowo-czerwony) – Protein Labeling Kit (Molecular Probes), oraz przez znakowanie białka biotyną używając EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Pierce). Wszystkie procedury postępowania wykonano zgodnie z metodyką rekomendowaną przez producentów.

Koniugaty CBD z barwnikami Alexa Fluor zostały wykorzystane do uzyskania reakcji widocznej w mikroskopie fluorescencyjnym.

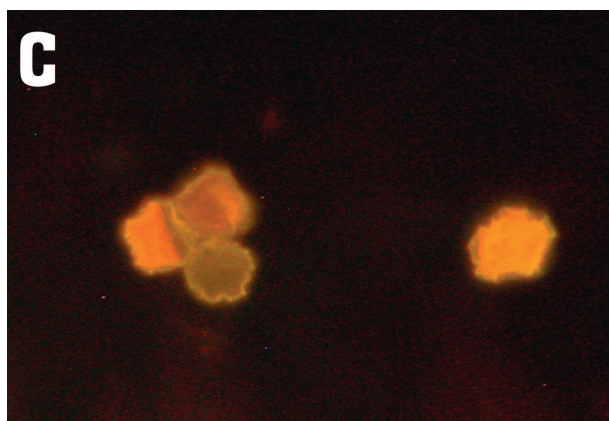
Preparaty zawierające cysty *Acanthamoeba* sp. płukano w PBS, inkubowano z koniugatem CBD przez 30 min w temperaturze pokojowej, a następnie płukano 3 razy w PBS i zatopiono w Histofluidzie (Medlab Products Sp. z o. o.). Do obserwacji mikroskopowej wykorzystano mikroskop fluorescencyjny (mikroskop Nikon–Preoptic Co.) z filtrami UV (Ex 330–380, DM 400, BA 420) oraz B2A (Ex 450–490, DM 505, BA 520). Do wykonania fotografii użyto cyfrowego aparatu fotograficznego Nikon (Nikon Coolpix 995).

Koniugat CBD z biotyną wykorzystano do uzyskania reakcji barwnej widocznej w mikroskopie świetlnym. Podczas barwienia tą metodą preparatów tkankowych, wystąpiła nieswoista reakcja z endogenną peroksydazą i endogenną biotyną. W celu zredukowania nieswoistej reakcji spowodowanej obecnością endogennej biotyny zarówno w tkankach, jak i cystach *Acanthamoeba*, preparaty z tkanek oraz preparaty cyst pochodzących z hodowli akсенicznej zostały poddane inkubacji ze ABCComplex Strept/HRP (Dako), przez 1 godzinę w temp. 37°C i 3 razy płukano w PBS przez 5 min. Endogenna peroksydaza została zablokowana przez 5% H_2O_2 w PBS przez 30 min w temperaturze pokojowej. Po blokowaniu endogennej peroksydazy, preparaty płukano w PBS przez 5 min, a następnie inkubowano z biotynylowanym CBD przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie płukano je trzykrotnie w PBS przez 5 min i inkubowano z ABCComplex Strept/HRP (Dako) przez 30 min w temperaturze pokojowej. Po płukaniu w PBS została dodana 3,3 tetrachloro diaminobenzzydina (Sigma–Aldrich) na 15 min. Preparaty płukano w wodzie, wysuszono, zatopiono na trwałe w Histofluidzie.



Fot. 2. Identyfikacja cyst *Acanthamoeba* w skrawkach parafinowych z tkanek eksperymentalnie zarażonych myszy przy użyciu fluorescencyjnego koniugatu CBD z Alexa Fluor®568 (czerwona fluorescencja wewnętrznej ściany cyst)

Phot. 2. Identification of *Acanthamoeba* cyst in paraffin section of experimentally infected mouse tissue with fluorescent CBD conjugate coupled to Alexa Fluor®568 (red fluorescence of the inner cyst wall)



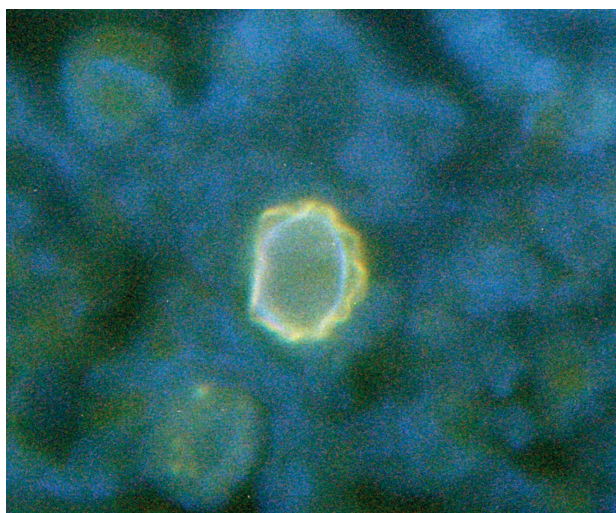
Fot. 1. Cysty *Acanthamoeba castellanii* pochodzące z hodowli. Reakcja barwna uwidaczniająca obecność celulozy w ścianie cysty *Acanthamoeba* po zabarwieniu koniugatami CBD: A. koniugat CBD z Alexa Fluor®350; B. koniugat CBD z Alexa Fluor® 488; C. koniugat CBD z Alexa Fluor®568

Phot. 1. *Acanthamoeba castellanii* cysts from culture. The colour reaction displaying presence of cellulose in wall of *Acanthamoeba* cysts after staining with CBD conjugates: A. CBD-Alexa Fluor®350 conjugate; B. CBD-Alexa Fluor®488 conjugate; C. CBD-Alexa Fluor®568 conjugate

Wyniki

Stwierdzono, że zastosowanie fluorescencyjnych koniugatów CBD pozwala na szybkie wykrywanie cyst *Acanthamoeba* spp. Do identyfikacji cyst *Acanthamoeba* spp. pochodzących z hodowli mogą być wykorzystywane wszystkie przebadane przez nas koniugaty fluorescencyjne (Fot. 1 A, B, C). Przy identyfikacji pasożytów w tkankach najlepsze efekty uzyskano stosując koniugat CBD z Alexa Fluor®568 (Fot. 2). W przypadku preparatów tkankowych reakcja barwna po zastosowaniu Alexa Fluor®350 i Alexa Fluor®488 jest słabiej widoczna. Jasna autofluorescencja cyst *Acanthamoeba* w świetle UV utrudnia obserwację niebieskiego zabarwienia pochodzącego od celulozy, gdy użyty jest Alexa Fluor®350 i zielonego gdy użyty jest Alexa Fluor®488 (Fot. 3). Czerwony fluorochrom w koniugacie z Alexa Fluor®568, daje możliwość rozróżnienia między autofluorescencją zewnętrznej ściany, a badaną reakcją w wewnętrznej ścianie i pozwala dokładnie zlokalizować celulozę w cyście *Acanthamoeba* spp.

Wykazano, że CBD przygotowane jako białko biotynylowane może zostać użyte do identyfikacji cyst *Acanthamoeba* sp. w mikroskopie świetlnym. Wykorzystano w tej reakcji powinowactwo między



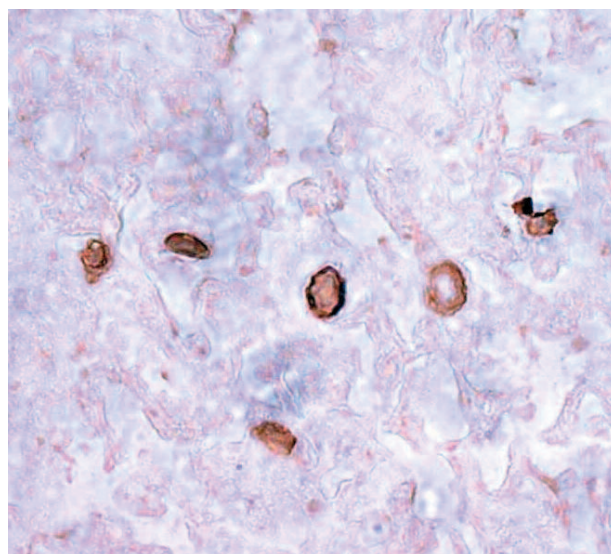
Fot. 3. Identyfikacja cyst *Acanthamoeba* w skrawkach parafinowych z tkanek eksperymentalnie zarażonych myszy przy użyciu fluorescencyjnego koniugatu CBD z Alexa Fluor®350 (niebieska fluorescencja wewnętrznej ściany cysty i żółta autofluorescencja zewnętrznej ściany cysty)

Phot. 3. Identification of *Acanthamoeba* cyst in paraffin section of experimentally infected mouse tissue with fluorescent CBD conjugate coupled to Alexa Fluor®350 (blue fluorescence of the inner cyst wall and yellow autofluorescence of the outer cyst wall)

awidyną i biotyną. Powinowactwo wiązania awidyna-biotyna jest powszechnie używane w metodach histochemicznych. Jednakże obecność biotyny endogennej w różnych komórkach i tkankach może spowodować fałszywie pozytywne wyniki [13–16]. Przy badaniu preparatów z tkanek konieczne jest zniwelowanie ewentualnych fałszywie pozytywnych wyników. W tym celu do opracowanej przez nas metody wprowadziliśmy fazę blokowania endogennej biotyny, co znacząco zmniejszyło tło zanieczyszczające (Fot. 4). Wprowadzenie fazy blokowania endogennej biotyny wydłużyło nieco czas potrzebny do dokonania analizy próby, ale wywołało zadowalające efekty niwelujące zanieczyszczenia.

Dyskusja

Diagnostyka laboratoryjna inwazji *Acanthamoeba* spp. oparta jest na identyfikacji pasożyta w zarażonej tkance. Chociaż zostały opisane różne techniki identyfikacji pasożyta włączając w to metody immunocytologiczne i molekularne, to podstawową procedurą jest nadal hodowla na agarze [17]. Ta metoda zwykle jest łączona z histopatologiczną oceną



Fot. 4. Identyfikacja cysty *Acanthamoeba* w tkance mózgowej myszy po zabarwieniu biotynylowanym CBD
Phot. 4. Identification of *Acanthamoeba* cyst in cerebral mouse's tissue stained with biotinylated CBD

preparatu w celu potwierdzenia inwazji tkanki przez pasożyta.

Rozpoznanie pasożytów w preparatach z tkanek jest często trudne i zależy od wiedzy specjalistycznej z zakresu patomorfologii. Do diagnostyki często wykorzystuje się tradycyjne metody histologiczne oraz metody barwienia przy użyciu barwników fluorescencyjnych np. kalkofluoru [18].

Podjęto też próby wykorzystania dimerów domeny wiążącej celulozę (D-CBD) celulazy *Trichoderma reesei* do barwienia immunocytochemicznego. Celem tych badań było różnicowanie cyst pierwotniaków zawierających celulozę od tych zawierających chitynę [2, 3]. My zastosowaliśmy uproszczone barwienia z użyciem Alexa Fluor®350, 488 i 568 oraz biotyny w celu bezpośredniej koniugacji CBD. Metody te pozwolą na szybką demonstrację celulozy w ścianie cysty *Acanthamoeba* pochodzących zarówno z hodowli, jak również z zarażonych tkanek.

Opisane przez nas koniugaty CBD mogą być alternatywnymi narzędziami diagnostycznymi wykorzystywanymi do bezpośredniego barwienia cyst *Acanthamoeba*. Koniugaty te mogą być również przydatnymi markerami do identyfikacji i klasyfikacji pełzaków pochodzących ze środowiska.

Próby wykrycia celulozy w ścianie cyst *Acanthamoeba* podjęli wcześniej już Linder i wsp. [3]. Jednym z problemów, z którym spotkali się w swoich badaniach było wykrywanie celulozy znajdują-

cej się w wewnętrznej ścianie cysty. Pozytywne wyniki uzyskali tylko w przypadku cyst pękniętych lub uszkodzonych na skutek zamrażania.

W naszych badaniach wykorzystaliśmy preparaty tkankowe pocięte mikrotomem na skrawki o grubości 5 μm oraz preparaty zawierające cysty *Acanthamoeba* pochodzące z hodowli. Cysty w preparatach tkankowych były uszkodzone, w przeciwieństwie do cyst pochodzących z hodowli. Wykonanie skrawków parafinowych ułatwiło dostęp CBD do docelowej cząsteczki i w tym przypadku uzyskaliśmy silniejszą reakcję barwną. W przypadku cyst nieuszkodzonych reakcja była słabsza, ale mimo wszystko pozwoliła na wykrycie celulozy w ich wewnętrznych ścianach.

Literatura

- [1] Blackwell J. 1988. Physical methods for the determination of chitin structure and conformation. *Methods in Enzymology* 161: 435–442.
- [2] Linder M., Winięcka-Krusnell J., Linder E. 2001. Identification of *Acanthamoebae* in clinical and environmental samples using cellulose-binding domains of cellulase as immunocytochemical marker for cyst wall cellulose. Proceedings of IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-living Amoebae. Paris, July 2001: 198–201.
- [3] Linder M., Winięcka-Krusnell J., Linder E. 2002. Use of recombinant cellulose binding domains of *Trichoderma reesei* cellulase as a selective immunocytochemical marker for cellulose in protozoa. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2503–2508.
- [4] Shpigel E., Roiz L., Goren R., Shoseyov O. 1998. Bacterial cellulose-binding domain modulates in vitro elongation of different plant cells. *Plant Physiology* 117: 1185–1194.
- [5] Goldstein M. A., Takagi M., Hashida S., Shoseyov O., Doi R. H., Segwl I. H. 1993. Characterization of the cellulose-binding domain of the *Clostridium cellulovorans* Cellulose-Binding Protein A. *Journal of Bacteriology* 175: 5762–5768.
- [6] Linder M., Salovuori I., Ruohonen L., Teeri T. 1996. Characterization of double cellulose-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry* 35: 21268–21272.
- [7] Linder M., Selber K., Nakari-Setälä T., Qiao M., Kula M. R., Penttilä M. 2001. The hydrophobins HFBI and HFBI from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems. *Biomacromolecules* 2: 511–517.
- [8] Linder M., Teeri T. T. 1996. The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 12251–12255.
- [9] Linder M., Teeri T. T. 1997. The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology* 57: 15–28.
- [10] Červa L. 1969. Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*. *Science* 163: 576.
- [11] Culbertson C. G., Holmes D. H., Overton W. M. 1965. *Hartmannella castellanii* (*Acanthamoeba* sp.). Preliminary report on experimental chemotherapy. *American Journal of Clinical Pathology* 43: 361–364.
- [12] Mazur T., Hadaś E., Gustowska L., Winięcka-Krusnell J., Linder E. 1999. Secondary amoebic eye infections in mice due to *Acanthamoeba* spp. *Parasitology Research* 85: 776–778.
- [13] Hsu S. M., Raine L., Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29: 577–580.
- [14] Martin H., Murray C., Christeller J., McGhie T. 2008. A fluorescence polarization assay to quantify biotin and biotin-binding proteins in whole plant extracts using Alexa-Fluor 594 biocytin. *Analytical Biochemistry* 380: 115–124.
- [15] Wang H., Pevsner J. 1999. Detection of endogenous biotin in various tissues: novel functions in the hippocampus and implications for its use in avidin-biotin technology. *Cell and Tissue Research* 296: 511–516.
- [16] Wood G. S., Warnke R. 1981. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29: 1196–1204.
- [17] Visvesvara G. S. 1987. Laboratory diagnosis. In: *Amphizoic amoebae. Human pathology*. (Ed. E. G. Rondanelli). Piccin Nuova Libreria, Padova: 193–215.
- [18] Bottone E. J. 1993. Free-living amebas of genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 60: 260–270.

Wpłynęło 14 lipca 2008

Zaakceptowano 10 grudnia 2008