Praca oryginalna *Original paper*

Mostki błonowe i ich rola w rozprzestrzenianiu wirusa ektromelii in vitro*)

ANNA BORATYŃSKA**), LECH MARTYNISZYN**), LIDIA SZULC**), MAREK NIEMIAŁTOWSKI

Zakład Immunologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Boratyńska A., Martyniszyn L., Szulc L., Niemiałtowski M.

Membrane bridges and their role in the spread of ectromelia virus in vitro

Summary

This work describes the role of membrane bridges in the spread of ectromelia virus (ECTV) Moscow strain (ECTV-MOS) in vitro in BALB/3T3 and Vero cells. In this research, immunofluorescence techniques were used: cells were fixed, stained for the presence of viral antigens, F-actin, and DNA, and viewed under a fluorescence microscope. In both cell lines, ECTV-MOS infection induces production of two types of actin-rich protrusions: tiny actin tails or long filopodia-like structures. It appears that both types contribute to the spread of ECTV-MOS particles and may be classified as membrane bridges.

Keywords: ectromelia (mousepox) virus, F-actin, membrane bridges, actin tails

W 2004 r. Rustom i wsp. (10) przedstawili nowy szlak bezpośredniej komunikacji między komórkami zwierzęcymi – cienkie, błonowe rurki łączące szczurze komórki PC12. Struktury te, które nazwano tunelowymi nanorurkami (tunneling nanotubes, TNT), powstawały *de novo* pomiędzy komórkami PC12 i ułatwiały transport pęcherzyków endocytarnych oraz składników błony i cząsteczek cytoplazmatycznych (10). Pierwotnie TNT opisano jako rurki o średnicy 50-200 nm i długości osiągającej kilkakrotną średnicę komórki, zbudowane z F-aktyny. Błona nanorurek wykazywała ciągłość z błonami obu połączonych komórek. Odkrycie to zmieniło koncepcję postrzegania organizmu zwierzęcego, dotychczas uważanego za zbiór indywidualnych komórek („cegiełek") stykających się ze sobą błonami komórkowymi, podczas gdy organizmy wielokomórkowe z królestwa roślin od ponad 100 lat są uważane za *continuum* dzięki odkryciu cytoplazmatycznych połączeń międzykomórkowych, zwanych plazmodesmami (4, 9, 15).

Pierwotna hipoteza, iż TNT mogą reprezentować powszechny sposób komunikacji międzykomórkowej w królestwie zwierząt, wydaje się znajdować poparcie w późniejszych badaniach. Wykazały one obecność TNT i innych struktur morfologicznie do nich podobnych w różnych typach linii komórkowych – zarówno pierwotnych, jak i ustalonych, ludzkich oraz zwierzęcych, wywodzących się z różnych tkanek (7, 9). Wraz z nowymi odkryciami, stało się oczywiste, że te swoiste „mostki błonowe" nie mają jednego, uniwersalnego modelu budowy, jak również różna jest ich funkcja. Rozszerzyło się również nazewnictwo – oprócz „tunelowych nanorurek" używa się terminów takich, jak: cytonemy (cytonemes), mostki filopodialne (filopodial bridges), mostki epitelialne (epithelial bridges) (12, 16).

Podsumowując, mostki błonowe można podzielić na dwa odmienne typy, w zależności od tego, czy pośredniczą one w wymianie cytoplazmy, czy też nie. Mostki, w których błony obu komórek ściśle do siebie przylegają w miejscu kontaktu, ale bez wytworzenia połączenia cytoplazmatycznego, nazywa się cytonemami lub mostkami filopodialnymi, podczas gdy struktury, które umożliwiają kontakt i przepływ obu cytoplazm, określa się jako nanorurki tunelowe (12).

Mostki błonowe, stanowiąc niejednorodną grupę, są wykorzystywane zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patogennych, w zależności od rodzaju komórek i ich aktualnego stanu. TNT są wytwarzane przez komórki układu odpornościowego – komórki dendrytyczne i monocyty – służąc im do przekazywania sygnałów wapniowych i, przypuszczalnie, obcych antygenów, jak również białek głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I (MHC klasy I) (14). Tymczasem mostki wytwarzane przez limfocyty T nie

*) Badania współfinansowane ze środków Mazowieckiego Stypendium Doktoranckiego 2009.

**) Doktoranci dziennego studium doktoranckiego „Ksenobiotyki oraz biologia czynników zakaźnych i inwazyjnych" na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej SGGW. Kierownik studium i promotor: prof. dr hab. Marek Niemiałtowski.

umożliwiają swobodnego przepływu cytoplazmy ani nie przenoszą sygnałów wapniowych, mogą za to służyć do szybkiego szerzenia się zakażenia wirusowego, jak na przykład ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu 1 (human immunodeficiency virus 1, HIV-1) między komórkami nawet bardzo od siebie odległymi (13).

Takie międzykomórkowe rozprzestrzenianie się wirusów za pomocą różnych wypustek błonowych wytwarzanych przez zakażone komórki wydaje się powszechną strategią i jest dynamicznie rozwijającą się tematyką badań nad wirusami ssaków. Na przykład, wirus choroby Aujeszky'ego (suid herpesvirus 1, SuHV-1; rodzaj *Varicellovirus*) jest transportowany do komórek niezakażonych za pośrednictwem wypustek wytwarzanych przez komórki zakażone (5), a wirus białaczki mysiej (murine leukemia virus, MLV; rodzaj *Gammaretrovirus*) porusza się po zewnętrznej powierzchni mostka filopodialnego zanim wniknie do niezakażonej komórki permisywnej (11). Również dla ECTV, zaszeregowanego do rodziny *Poxviridae* grupującej duże dsDNA-wirusy, w badaniach wykonanych *in vitro* udokumentowano wytwarzanie specyficznych wypustek przez komórki zakażone tym wirusem (3). Struktury te przypominały filopodia, były zbudowane z elementów cytoszkieletu i odpowiadały za przenoszenie wirusa do komórek niezakażonych, co sprzyjało rozprzestrzenianiu zakażenia.

Dlatego też – w świetle opisanych badań i w odniesieniu do obowiązującej nomenklatury – celem badań było: a) określenie, czy wypustki wytwarzane *in vitro* przez komórki pod wpływem zakażenia ECTV-MOS wykazują cechy mostków błonowych oraz b) podjęcie próby klasyfikacji tych struktur.

Materiał i metody

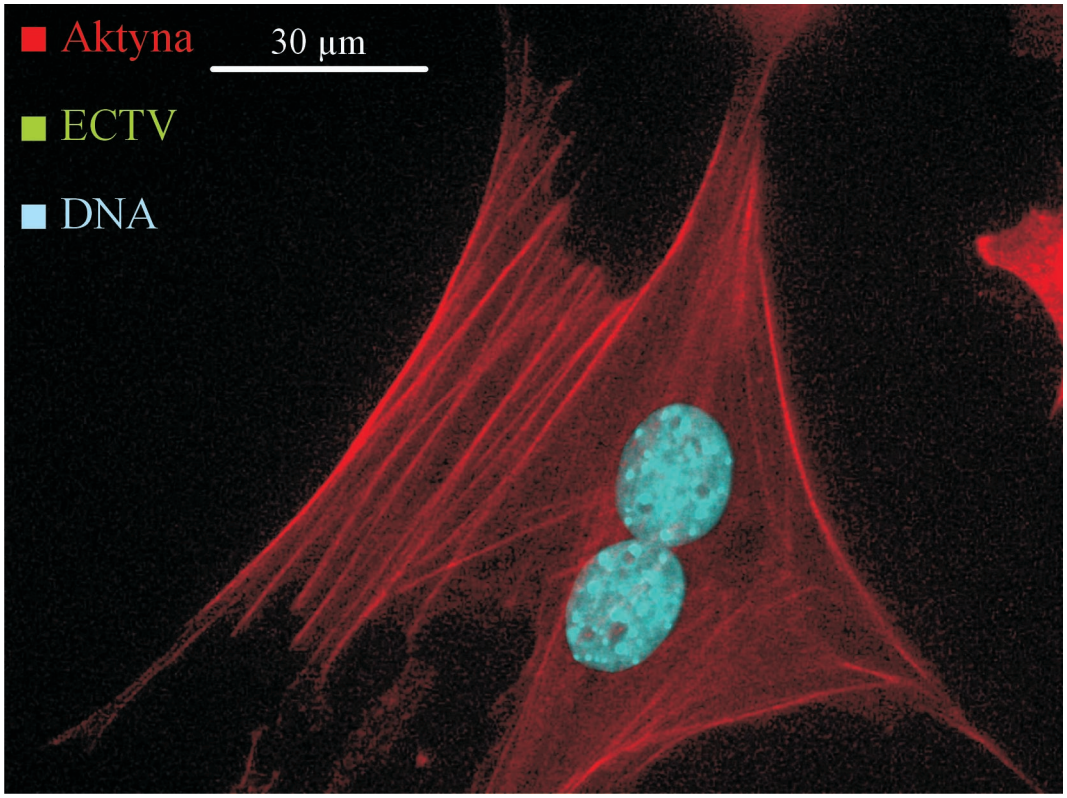
Linie komórkowe. Mysie fibroblasty zarodkowe linii BALB/3T3 clone A31 (ATCC CCL-163) hodowano w podłożu DMEM (4,5 g/l glukozy; HyClone) z dodatkiem 4 mM/l L-glutaminy i 10% surowicy cielęcej (HyClone). Komórki nerki koczkodana zielonego – Vero (ECACC 84113001) hodowano w podłożu DMEM (1 g/l glukozy, HyClone) z dodatkiem 2 mM/l L-glutaminy i 7% płodowej surowicy bydlęcej (Sigma). Hodowle inkubowano w 37°C w atmosferze wzbogaconej 4,5% CO_2.

Wirus. W badaniach wykorzystano wyizolowany w 1947 r. wysoce patogenny szczep Moscow wirusa ektromelii (ECTV-MOS, ATCC 1374), który namnożono w komórkach Vero i BALB/3T3. Zakażanie komórek przeprowadzono w podłożu utrzymującym (z dodatkiem 1% odpowiedniej surowicy) przy m.o.i. (multiplicity of infection) = 5 PFU/komórkę.

Analiza immunofluorescencyjna. Komórki hodowano na szkiełkach nakrywkowych do 70-80% pokrycia powierzchni, a następnie zakażano ECTV-MOS (j.w.). Hodowle w 21. godzinie po zakażeniu (g.p.z.) utrwalano 4% zbuforowanym PFA (Sigma) w PBS i permeabilizowano 0,5% Tritonem-X (Sigma) w PHEM. Niespecyficzne wiązanie przeciwciał blokowano poprzez inkubację w 2% roztworze surowiczej albuminy bydlęcej (BSA; Sigma) w PHEM. Następnie preparaty inkubowano z króliczymi poliklonalnymi przeciwciałami (pAb) anty-ECTV-MOS skoniugowanymi z FITC. Natomiast F-aktynę wybarwiono TRITC-falloidyną (Sigma), a DNA wyznakowano Hoechst 33342 (Calbiochem). Po wybarwieniu preparaty pokrywano ProLong Gold Antifade (Invitrogen), umieszczano na szkiełkach podstawowych i analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus BX60 wyposażonym w kamerę Color View. Do rejestracji i analizy zdjęć użyto programu Cell^F Olympus oraz Image J (1).

Wyniki i omówienie

W badaniach wykorzystano dwie linie komórkowe: BALB/3T3 wywodzącą się od myszy, naturalnego gospodarza ECTV-MOS oraz komórki Vero będące linią permisywną powszechnie używaną do badań wirusologicznych (2). Obie linie komórkowe były



Ryc. 1. Znakowanie immunofluorescencyjne komórek BALB/3T3 – niezakażona kontrola. Wybarwiono: F-aktyna (czerwona), ECTV-MOS (zielony, brak antygenu), DNA (niebieskie)

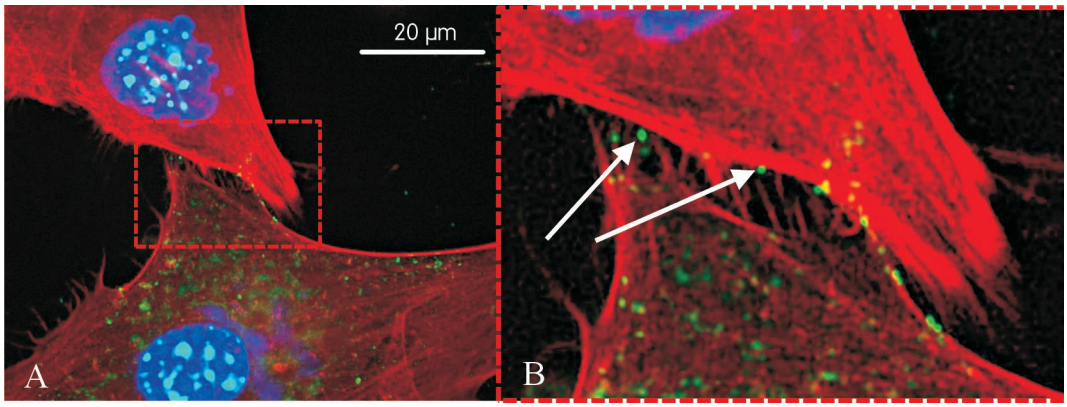
wykorzystywane we wcześniejszych doświadczeniach (3).

Czas, przez jaki prowadzono hodowlę po zakażeniu ECTV-MOS, wynosił 21 godzin – dla komórek zakażonych i niezakażonych (kontrolnych). Został on dobrany na podstawie wcześniejszych obserwacji, tak, aby cykl replikacyjny był już zakończony, a efekt cytopatyczny (CPE) – w tym produkcja wypustek komórkowych – był dobrze widoczny.

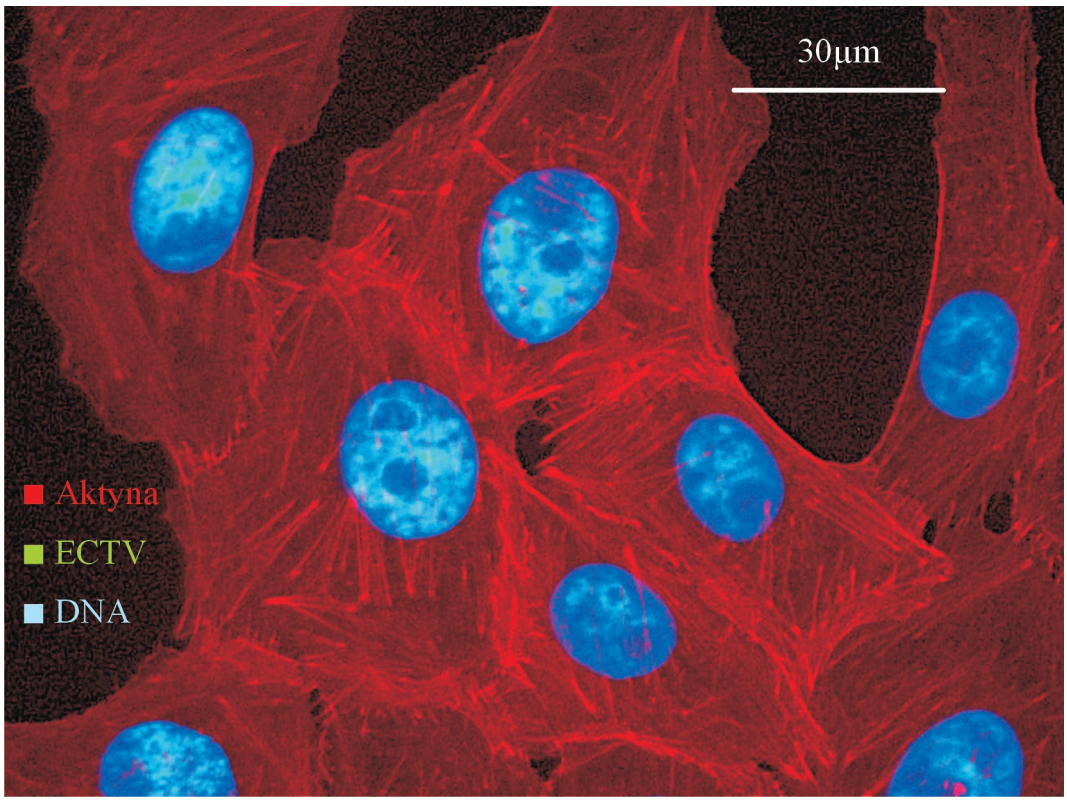
Kontrolne, niezakażone komórki BALB/3T3, jak i Vero, po wybarwieniu immunofluorescencyjnym wykazywały morfologię typową dla danego rodzaju komórek, z niezmienionym cytoszkieletem aktynowym – intensywnie wybarwione falloidyną włókna naprężeniowe zbudowane z F-aktyny tworzyły charakterystyczny dla nich układ (ryc. 1 i 3). W komórkach kontrolnych, zgodnie z oczekiwaniami, nie zostały wykryte antygeny ECTV-MOS oraz nie wybarwiło się żadne inne DNA oprócz DNA jądra komórkowego.

W hodowlach BALB/3T3 zakażonych ECTV-MOS, 21 g.p.z. CPE wyrażony był obkurczeniem i zaokrągleniem komórek, a po barwieniu immunofluorescencyjnym widoczny był zanik aktynowych włókien naprężeniowych i ogólnie słabsza intensywność wybarwienia F-aktyny, zwłaszcza w porównaniu do komórek niezakażonych (ryc. 2). Zakażone komórki produkowały wiriony potomne, zaś antygeny wirusowe wykrywano na obszarze całej komórki. W rejonie okołojądrowym obserwowano miejsca replikacji wirusa – tzw. fabryki wirusowe – rejon ten barwił się również na obecność DNA. Intensywnie wybarwione przeciwciałami anty-ECTV-MOS (zielone) punkty to wiriony potomne. Na powierzchni komórek BALB/3T3 pod wpływem zakażenia ECTV-MOS powstały drobne struktury aktynowe, „mikrokosmki" wynoszące pojedyncze cząstki wirusowe. Rycina 2 wskazuje, że odgrywają one rolę w transporcie wirionów bezpośrednio z komórki do komórki. Struktury te, rozpoznane we wcześniejszych badaniach jako tzw. ogony aktynowe, są charakterystyczne dla zakażenia wirusami z rodzaju *Orthopoxvirus* (3, 6). Według nowych kryteriów, można je zaliczyć do mostków filopodialnych, ale nie do nanorurek tunelowych (12).

Zakażenie komórek Vero ECTV-MOS skutkowało odmiennymi zmianami w ich morfologii. W 21 g.p.z. CPE cechował się głównie wydłużeniem komórek i utratą kontaktu między zakażonymi komórkami. Wy-

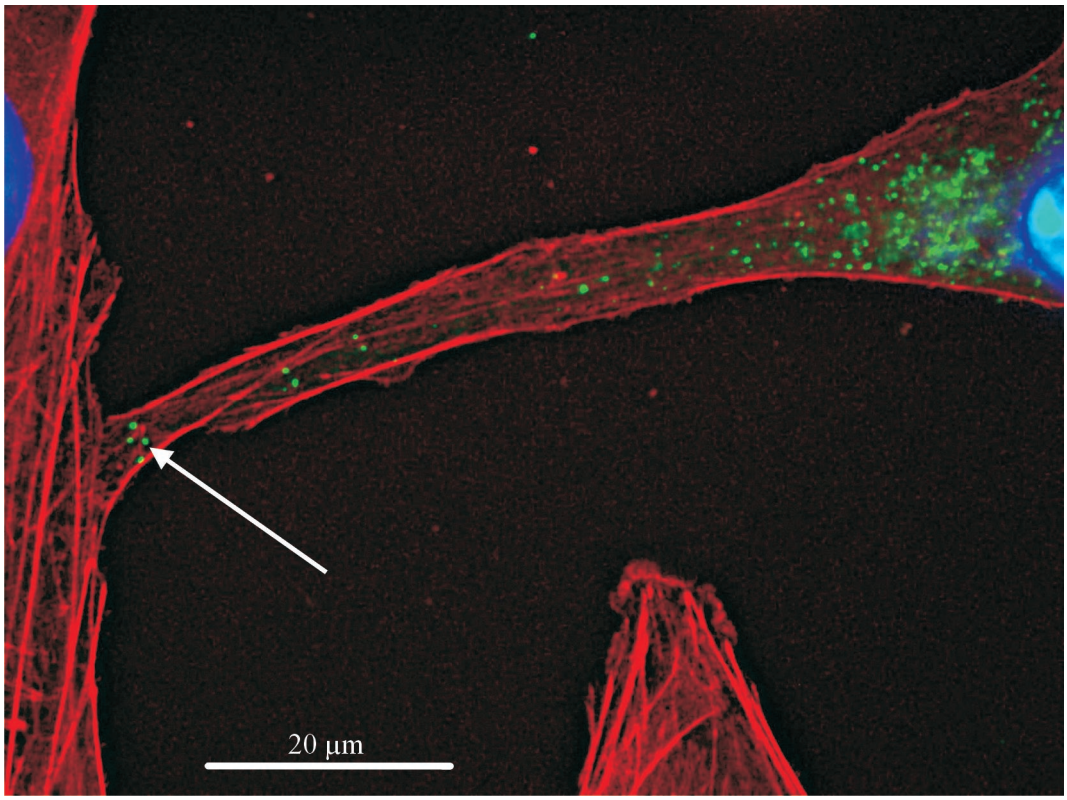


Ryc. 2. Znakowanie immunofluorescencyjne komórek BALB/3T3 – 21 g.p.z. (A). Wybarwiono: F-aktyna (czerwona), ECTV-MOS (zielony), DNA (niebieskie). Oznaczony czerwonym prostokątem obszar w (A) widoczny w powiększeniu cyfrowym w (B). Białe strzałki wskazują wiriony ECTV-MOS przenoszone za pomocą ogonów aktynowych do niezakażonej komórki



Ryc. 3. Znakowanie immunofluorescencyjne komórek Vero – niezakażona kontrola. Wybarwiono: F-aktyna (czerwona), ECTV-MOS (zielony, brak antygenu), DNA (niebieskie)

dłużenie zakażonej komórki było często związane z powstawaniem długich wypustek (przekraczających kilkakrotnie średnicę komórki) zbudowanych z F-aktyny. Wypustki te przypominały filopodia i były zbyt „masywne", by odpowiadać charakterystyce cienkich nanorurek, przynajmniej wg ich pierwotnego opisu (9, 10, 12). Wymiarami odpowiadały bardziej mostkom epitelialnym wykrywanym u mężczyzn w zmienionej nowotworowo prostacie (16). Nie udało się stwierdzić, czy między komórkami połączonymi takim filopodium zachodziła ciągłość błon komórkowych i cytoplazmy. Barwienie F-aktyny sugeruje bliską styczność komórek, jednak bez możliwości określenia granicy między nimi (ryc. 4). Aby określić te zależności, należałoby zbadać ultrastrukturę takich połączeń oraz ciągłość błon komórkowych, jednakże na podstawie uzyskanej dokumentacji fotograficznej można stwierdzić, że mostki te służą jako „korytarze" ułatwiające transport licznych wirionów ECTV-MOS bezpośrednio z komórki do komórki. Można przypuszczać, że swobodny przepływ cytoplazmy w takim „korytarzu" ułatwia szerzenie się zakażenia tym wirusem.



Ryc. 4. Znakowanie immunofluorescencyjne komórek Vero – 21 g.p.z. Wybarwiono: F-aktyna (czerwona), ECTV-MOS (zielony), DNA (niebieskie). Komórka zakażona wytwarza mostek filopodialny zbudowany z aktyny, wchodzący w kontakt z niezakażoną komórką. Mostek służy jako „korytarz" do transportu wirionów ECTV-MOS (biała strzałka)

Z powodu braku specyficznych markerów dla TNT identyfikacja tych struktur opiera się głównie na kryteriach morfologicznych i obecności określonych elementów cytoszkieletu, co jednak sprawia trudności interpretacyjne (8). Celowa jest zatem kontynuacja badań nad udziałem różnych składników komórek permisywnych zakażonych ECTV w rozprzestrzenianiu się zakażenia tym wirusem, co stanowi dobry model badawczy również w odniesieniu do innych wirusów. Może też przyczynić się do lepszego poznania strategii ich działania, jak również mechanizmów patogenezy wirusowej.

Piśmiennictwo

1. *Abramoff M. D., Magelhaes P. J., Ram S. J.*: Image Processing with Image. J. Biophotonics International 2004, 11, 36-42.
2. *Ammerman N. C., Beier-Sexton M., Azad A. F.*: Growth and maintenance of Vero cell lines. Curr. Protoc. Microbiol. 2008, Appendix 4:Appendix 4E.
3. *Boratyńska A., Martyniszyn L., Szulc L., Szczepanowska J., Krzyżowska M., Niemiałtowski M. G.*: Contribution of rearranged actin structures to the spread of ectromelia virus infection in vitro. Acta Virol 2010, 54, 41-48.
4. *Cilia M. L., Jackson D.*: Plasmodesmata form and function. Curr. Opin. Cell. Biol. 2004, 16, 500-506.
5. *Favoreel H. W., Van Minnebruggen G., Adriaensen D., Nauwynck H. J.*: Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. PNAS 2005, 102, 8990-8995.
6. *Frischknecht F., Way M.*: Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. Trends Cell Biol 2001, 11, 30-38.
7. *Gerdes H. H., Bukoreshtliev N. V., Barroso J. F.*: Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. FEBS Lett. 2007, 581, 2194-2201.
8. *Gerdes H. H., Carvalho R. N.*: Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. Curr. Opin. Cell. Biol. 2008, 20, 470-475.
9. *Gerdes H. H., Rustom A.*: Tunneling nanotubes: Cell-cell channels in animal cells, [w:] Baluska F., Volkmann D., Barlow P. W.: Cell-Cell Channels. Landes Bioscience, Georgetown 2005, 200-207.
10. *Rustom A., Saffrich R., Markovich I., Walther P., Gerdes H. H.*: Nanotubular highways for intracellular organelle transport. Science 2004, 303, 1007-1010.
11. *Sherer N. M., Lehmann M. J., Jimenez-Soto L. F., Horensavitz C., Pypaert M., Mothes W.*: Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. Nat. Cell. Biol. 2007, 9, 310-315.
12. *Sherer N. M., Mothes W.*: Cytonemes and tunneling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. Trends Cell Biol. 2008, 18, 414-420.
13. *Sowinski S., Jolly C., Berninghausen O., Purbhoo M. A., Chauveau A., Köhler K., Oddos S., Eissmann P., Brodsky F. M., Hopkins C., Onfelt B., Sattentau Q., Davis D. M.*: Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. Nat. Cell. Biol. 2008, 10, 211-219.
14. *Watkins S. C., Salter R. D.*: Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubes. Immunity 2005, 23, 309-318.
15. *Zambryski P.*: Cell-to-cell transport of proteins and fluorescent tracers via plasmodesmata during plant development. J. Cell. Biol. 2004, 164, 165-168.
16. *Zani B. G., Edelman E. R.*: Cellular bridges: Routes for intercellular communication and cell migration. Commun. Integr. Biol. 2010, 3, 215-220.

Adres autora: mgr inż. Anna Boratyńska, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: a.boratynska@gmail.com