

УДК 577.114.5:616-097

УГЛЕВОДНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ПРЕПАРАТОВ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ *Saccharomyces cerevisiae* И *Candida krusei*

© 2018 г. В. Б. Крылов¹, М. И. Петрук¹, А. А. Карелин¹, Д. В. Яшунский¹, Ю. Е. Цветков¹, Н. И. Глушко², Е. В. Халдеева², В. Л. Мокеева³, Е. Н. Биланенко³, Ю. С. Лебедин⁴, С. А. Ерёмин³, Н. Э. Нифантьев¹ *

¹Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991, Россия

²Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Казань, 420015, Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

⁴ООО «ХЕМА», Москва, 105264, Россия

*e-mail: nen@ioc.ac.ru

Поступила в редакцию 12.01.2018 г.

Проведена иммунизация лабораторных животных (Калифорнийский кролик) природными препаратами дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida krusei*. Анализ полученных сывороток осуществляли с использованием библиотек лигандов, построенных из синтетических олигосахаридов, родственных основным углеводным компонентам клеточной стенки грибов. Было показано, что антитела в исследованных сыворотках распознают преимущественно фрагменты маннана, причем профиль углеводной специфичности различался для *S. cerevisiae* и *C. krusei*. Сыворотки против *S. cerevisiae* содержали антитела, распознающие β -глюкан, причем минимальный распознаваемый эпитоп — линейный трисахарид. Полученные результаты необходимы для создания востребованных иммуноферментных диагностикумов для обнаружения и видовой характеристики грибов.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, дрожжевые грибы, антиген, антитело

DOI: 10.1134/S0555109918060107

Дрожжи — это большая группа грибов, имеющих одноклеточную фазу в цикле развития. Некоторые из них существуют постоянно в одноклеточном состоянии, другие способны к образованию мицелия. В эту группу входят как сумчатые, так и базидиальные грибы, поэтому термин не свидетельствует о родственных связях, а лишь об их одноклеточной организации [1, 2]. Эти грибы широко распространены в природе, встречаются на сахаристых субстратах, на поверхности и внутри плодов, на поверхности растений, в почве и в пыли жилых помещений [3]. Дрожжи не только широко используются в разнообразных процессах, включая производство вина, пива, хлеба, ферментированных молочных продуктов, лекарственных препаратов, но и могут вызывать порчу продуктов питания. Некоторые виды дрожжевых грибов обладают патогенными свойствами и способны колонизировать организм человека, вызывая разнообразные заболевания, как поверхностные, так и тяжелейшие инвазивные микозы [4].

Дрожжевые грибы родов *Saccharomyces* и *Candida* относятся к порядку сахаромикетовых (*Saccharomycetales*) и представляют собой наиболее

изученные роды дрожжевых грибов. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* весь жизненный цикл проходит в одноклеточном состоянии. Это давно известные пекарские дрожжи, которые широко используются в пивоварении, виноделии, хлебопечении. У вида *Candida krusei* известно много клинических изолятов, вызывающих различные заболевания людей со сниженным иммунитетом [4].

Методы идентификации дрожжей на протяжении времени менялись — от определения фенотипических и физиологических признаков к молекулярно-генетическим [1, 2]. Однако увлечение последними не способно решить все проблемы, возникающие при идентификации дрожжевых грибов. Надежные методы видовой идентификации дрожжей являются крайне востребованными для промышленности, медицины и экологии. На настоящий момент описано более 1500 видов дрожжей, и для их идентификации необходим быстрый, простой и недорогой метод. Обычные системы дифференциации с использованием морфологических признаков, а также закономерностей ассимиляции и ферментации требуют высокой квалификации исследователя, трудозатрат

и отнимают много времени. Альтернативные методы, такие как анализ жирных кислот, электрофоретическое типирование, анализ ДНК, обеспечивают удовлетворительные результаты, однако трудновыполнимы на регулярной основе в лабораториях пищевой промышленности [1, 2].

В связи с этим иммунологические методы анализа являются наиболее удобными в практическом плане, однако требуют выявления специфических антигенных маркеров, представленных на поверхности клеточной стенки гриба [5]. Клеточная стенка дрожжевых грибов построена в основном из хитина, β -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана, β -(1 $\rightarrow$ 6)-глюкана, и маннопротеинов. Хитин и глюканы образуют жесткую трехмерную структуру, которая защищает клетку от неблагоприятных внешних воздействий. Внешняя же часть клеточной стенки обогащена высокогликозилированными белками (углеводы могут составлять до 90% их молекулярной массы), несущими полисахаридные цепи, построенные из остатков маннозы (маннаны). Именно эти маннанные цепи в значительной мере определяют антигенную специфичность дрожжевых грибов [6].

Различные структурные мотивы маннана являются антигенными факторами дрожжевых грибов [7, 8] и используются в настоящее время для обнаружения поражения грибами рода *Candida* в медицинских диагностических наборах [9]. В частности, для гриба *Candida albicans* было выявлено более десятка антигенных факторов [10], относящихся к маннану. Присутствие или отсутствие тех или иных антигенных структур в составе грибкового маннана существенно зависит от вида и штамма микроорганизма [11]. Существующий на рынке диагностический набор Platelia Candida Ag Plus ("Bio-Rad", Франция) позволяющий детектировать маннан *C. albicans*, не обнаруживает антигены продуцируемые *S. cerevisiae* и *C. krusei* [12]. Структурные особенности маннанов, продуцируемых *S. cerevisiae* и *C. krusei*, играющие критическую роль при их детектировании серологическими методами, на настоящий момент детально не изучены. В связи с этим крайне актуальной задачей является поиск как общих, так и специфических антигенных маркеров, позволяющих определять как общее грибковое загрязнение, так и содержание отдельных видов.

Цель работы — характеристика специфичности антител, продуцируемых при иммунизации препаратами *S. cerevisiae*, *C. krusei*, с использованием гликоряда, построенного из синтетических олигосахаридов, отвечающих основным типам природных полисахаридов грибов.

МЕТОДИКА

Получение иммуногенов. В работе использовали штаммы грибов из коллекции Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования (СПбМАПО): 251 (*C. krusei*) и 56 (*S. cerevisiae*). Для получения биомассы штаммы дрожжевых грибов пересеивали на жидкую питательную среду Сабуро, с расчетом получить начальную плотность культуры 5×10^7 кл./мл и выращивали в течение 48 ч при 28°C. Биомассу отделяли от питательной среды центрифугированием в течение 15 мин при 2000 g и дважды промывали от питательной среды 10-кратным объемом стерильного физраствора. Выход биомассы с 13 л питательной среды составил 90 г.

Биомассу заливали 90 мл глицерина, автоклавировали 45 мин при 1.5 атм и оставляли на 12 ч при 4°C. Затем экстракт отделяли от клеток центрифугированием в течение 30 мин при 8000 g, подкисляли уксусной кислотой до pH 4.0. К охлажденному до 4°C экстракту порциями добавляли холодный этанол при постоянном перемешивании. Для полного осаждения к 90 мл экстракта добавляли 270 мл этанола. Осадок формировался в течение 24 ч при 4°C. Через 24 ч осадок отделяли центрифугированием при 900 g, в течение 15 мин, промывали дважды 5-кратным объемом 96% этанола при перемешивании, затем отделяли центрифугированием при 2000 g 10 мин. Промытый препарат высушивали в эксикаторе под вакуумом над безводным CaCl_2 в течение 2 сут до постоянной массы. После высушивания было получено 1320 мг сухого иммуногена влажностью 10%.

Иммунизация. Антисыворотки против иммуногенов получали на 5 самцах кроликов породы "Калифорнийский кролик" в возрасте 4–6 мес. Животных иммунизировали 6 раз с интервалом 2 нед. свежеприготовленной эмульсией иммуногена (0.2 мг препарата по белку в 0.5 мл дистиллированной воды на кролика) с полным адъювантом Фрейнда для первой иммунизации и с неполным адъювантом Фрейнда для последующих иммунизаций. Эмульсию готовили в соотношении раствор конъюгата/адъювант — 1 : 1. В ходе иммунизации эмульсию вводили в 3–6 мест подкожно вдоль позвоночника. Забор крови проводили из краевой вены уха с помощью вакуумных пробирок Green Vac-Tube 0238 ("GC Pharma", Республика Корея) с разделяющим гелем и активатором свертывания (SiO_2). Полученную сыворотку консервировали 0.1% азида натрия и хранили при 4°C.

Иммуноферментный анализ. Иммуноферментный анализ на стрептавидиновых планшетах Pierce® Streptavidin Coated 96 Well Plates ("Thermo

Scientific", США) проводили в соответствии с инструкцией производителя ("Thermo Scientific Inc.", США, www.thermoscientific.com/pierce) при использовании фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 0.05% твина 20 и 0.1% бычьего сывороточного альбумина для растворения реагентов и промывания планшета. Биотинилированные олигосахариды адсорбировали на дне лунок (15 пмоль олигосахарида в 100 мкл разводящего раствора на одну лунку) в течение 2 ч при 22°C, затем содержимое планшета вытряхивали, промывали 3 раза и наносили исследуемые сыворотки (по 100 мкл, разбавление 1 : 500). Планшет инкубировали 30 мин при 22°C, после чего содержимое планшета вытряхивали, промывали 3 раза. Сорбированные антитела проявляли с использованием меченных пероксидазой хрена IgG против иммуноглобулинов кролика ("ХЕМА", Россия) и хромогенного субстрата ТМВ (водный раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина и перекиси водорода). Оптическое поглощение продуктов ферментативной реакции измеряли на приборе "Multiskan GO" ("Thermo fisher scientific", США) при длине волны 450 нм. Эксперименты для каждой концентрации антител повторяли не менее 3 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование специфичности сывороток, полученных при иммунизации различными природными препаратами грибов, позволяет установить специфические антигенные структуры на поверхности клеточной стенки. В отличие от прямого анализа строения комплексом химических и физико-химических методов при иммунологическом анализе антигенов важную роль играет не только относительное содержание, но и пространственная доступность и иммуногенность углеводных участков. Именно такие структуры являются наиболее перспективными для иммуноферментного детектирования культуры грибов.

Необходимые в данном исследовании синтетические олигосахариды были получены благодаря новым методам химии углеводов, таким как пиранозид-фуранозидная перегруппировка [13], методы регоселективной расстановки защитных групп и стереоселективного гликозилирования [14].

Для обозначения углеводных остатков в синтетических олигосахаридах использована символическая номенклатура гликанов, рекомендованная международным гликобиологическим сообществом (рис. 1) [15].

Синтез использованных в данном исследовании биотинилированных производных **1-18**, от-

вечающих основным типам грибных полисахаридов, был описан нами ранее. Олигосахариды **1-9** [16, 17] (рис. 2а) представляют собой линейные и разветвленные фрагменты β -глюкана различной длины. Олигоманнозиды **10-14** (рис. 2б) отвечают структурным элементам маннана дрожжевых грибов. Олигосахариды, относящиеся к другим типам полисахаридов, — это фрагменты галактоманнана **15-16** [18], линейного α -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкана **17** [19] и хитина **18** [20, 21] (рис. 3а). Такие полисахариды как галактоманнан [22, 23] и α -глюкан [24] являются специфическими маркерами прежде всего для плесневых грибов [25] (например, *Aspergillus fumigatus*), однако их включение при анализе антител против дрожжевых грибов также необходимо для подтверждения специфичности данных антигенов.

Фиксация данных олигосахаридов **1-18** на поверхности планшета осуществлялась за счет сверхпрочного нековалентного взаимодействия биотиновой метки с поверхностью, модифицированной стрептавидином. При этом используемый олигоэтиленгликольный спейсер обеспечивает эффективное экспонирование углеводной части для связывания с антителами [26]. Образование углевод-белкового комплекса детектировалось обработкой поверхности лунки проявляющим конъюгатом вторичных антител с ферментной меткой и последующим добавлением хромогенного субстрата.

Исследование сыворотки интактных животных в разбавлении 1 : 500 не выявило фона естественных антител против исследуемых микоантигенов **1-18**. В то же время сыворотки животных после иммунизации препаратами грибов специфически распознавали определенные типы лигандов.

Так, антитела в сыворотке после иммунизации препаратом из *S. cerevisiae* хорошо распознавали β -(1 $\rightarrow$ 3)-связанные глюканы начиная с трисахарида, причем удлинение цепи усиливало наблюдаемое взаимодействие (рис. 2в). Антитела в сыворотке после иммунизации препаратом из *C. krusei*, напротив, практически не распознавали данные антигены (рис. 2д).

Антитела в сыворотке после иммунизации препаратами как из *S. cerevisiae* так и *C. krusei* распознавали олигосахариды, родственные различным структурным элементам маннана, однако профиль специфичности данных антител существенно различался (рис. 2). Так, антитела, выработанные против *S. cerevisiae*, распознавали преимущественно тетрасахарид **12**, терминированный α -(1 $\rightarrow$ 3)-связанным остатком маннозы. Антитела, выработанные против *C. krusei*, напро-

тив, преимущественно распознавали линейный α -(1 $\rightarrow$ 2)-связанный трисахарид **11**.

Важно было исследовать взаимодействие полученных сывороток с олигосахаридами, отвечающими антигенам плесневых грибов рода *Aspergillus*, изученных нами ранее [27]. Так, ни один из исследованных олигосахаридов **15–18** не распознавался исследуемыми сыворотками против дрожжевых грибов (рис. 3), что говорит о принципиально различной антигенной структуре клеточных стенок.

Таким образом, в ходе работы была исследована углеводная специфичность антител, вырабатываемых против препаратов дрожжевых грибов *S. cerevisiae* и *C. krusei*, и выявлены распознаваемые ими характерные углеводные эпитопы. Полученные результаты являются основанием для разработки методов иммуноферментного контроля поражения грибами, востребованных в экологии и в медицине.

Приготовление иммуногенов и работы по иммунизации лабораторных животных выполнены при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60717X0185). Получение биотинилированных олигосахаридов, создание гликорядов и анализ специфичности антител выполнены в биохимическом модуле ИОХ РАН при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00126).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. // *Yeasts: Characteristics and Identification*, 2 Ed. Cambridge University Press, Cambridge: United Kingdom, 1990. 1002 p.
- Чернов И.Ю. // *Дрожжи в природе*. Товарищество науч. изд. КМК., 2013. Москва, 336 с.
- Glushakova A.M., Chernov I.Y. // *Microbiology* 2010. V. 79. № 6. P. 830–839.
- de Hoog G.S., Guarro J., Gene'J., Figueras M.J. // *Atlas of Clinical Fungi*, 2 Ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, ASM Press, 2000. 1126 p.
- Latgé J.P. // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 66. № 2. P. 279–290.
- Lipke P.N., Ovalle R. // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. № 15. P. 3735–3740.
- Karelin A.A., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E. // *Russ. Chem. Rev.* 2017. V. 86. № 11. P. 1073–1126.
- Krylov V.B., Paulovičová L., Paulovičová E., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E. // *Pure Appl. Chem.* 2017. V. 89. № 7. P. 885–898.
- Oliveri S., Trovato L., Betta P., Romeo M.G., Nicoletti G. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2008. V. 14. № 4. P. 391–393.
- Fukazawa Y., Shinoda T., Tsuchiya T. // *J. Bacteriol.* 1968. V. 95. № 3. P. 754–763.
- Hall R.A., Gow N.A. // *Mol. Microbiol.* 2013. V. 90. № 6. P. 1147–1161.
- Rimek D., Singh J., Kappe R. // *J. Clin. Microbiol.* 2003. V. 41. № 7. P. 3395–3398.
- Krylov V.B., Argunov D.A., Vinnitskiy D.Z., Verkhnyatskaya S.A., Gerbst A.G., Ustyuzhanina N.E., Dmitrenok A.S., Huebner J., Holst O., Siebert H.-C., Nifantiev N.E. // *Chem. Eur. J.* 2014. V. 20. № 50. P. 16516–16522.
- Komarova B.S., Gerbst A.G., Finogenova A.M., Dmitrenok A.S., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E. // *J. Org. Chem.* 2017. V. 82. № 17. P. 8897–8908.
- Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J. // *Essentials of glycobiology*. N.Y.: Cold Spring Harbor, 1999. 823 p.
- Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Grachev A.A., Chizhov A.O., Nifantiev N.E. // *Carbohydr. Res.* 2016. V. 419. P. 8–17.
- Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Nifantiev N.E. // *Carbohydr. Res.* 2016. V. 436. P. 25–30.
- Krylov V.B., Argunov D.A., Solovov A.S., Petruk M.I., Gerbst A.G., Dmitrenok A.S., Shashkov A.S., Latgé J.-P., Nifantiev N.E. // *Org. Biomol. Chem.* 2018. V. 16. № 7. P. 1188–1199.
- Gerbst A.G., Grachev A.A., Yashunsky D.V., Tsvetkov Y.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. // *J. Carbohydr. Chem.* 2013. V. 32. № 3. P. 205–221.
- Юдина О.Н., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э. // *Изв. РАН. Сер. хим.* 2015. Т. 12. С. 2932–2941.
- Юдина О.Н., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э. // *Изв. РАН. Сер. хим.* 2016. Т. 12. С. 2937–2942.
- Argunov D.A., Krylov V.B., Nifantiev N.E. // *Org. Biomol. Chem.* 2015. V. 13. № 11. P. 3255–3267.
- Argunov D.A., Krylov V.B., Nifantiev N.E. // *Org. Lett.* 2016. V. 18. № 21. P. 5504–5507.
- Komarova B.S., Orekhova M.V., Tsvetkov Y.E., Beau R., Aimaniananda V., Latgé J.P., Nifantiev N.E. // *Chem. Eur. J.* 2015. V. 21. № 3. P. 1029–1035.
- Крылов В.Б., Петрук М.И., Григорьев И.В., Лебедин Ю.С., Глушко Н.И., Халдеева Е.В., Аргунов Д.А., Хатунцева Е.А., Топлишек М.В., Комарова Б.С., Карелин А.А., Юдина О.Н., Меньшов В.М., Яшунский Д.В., Цветков Ю.Е., Нифантьев Н.Э. // *Биоорганическая химия*. 2018. Т. 44. № 1. С. 78–86.
- Tsvetkov Y.E., Burg-Roderfeld M., Loers G., Arda A., Sukhova E.V., Khatuntseva E.A., Grachev A.A., Chizhov A.O., Siebert H.-C., Schachner M., Jimenez-Barbero J., Nifantiev N.E. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. № 1. P. 426–435.
- Крылов В.Б., Петрук М.И., Глушко Н.И., Халдеева Е.В., Моисеева В.Л., Биланенко Е.Н., Лебедин Ю.С., Еремин С.А., Нифантьев Н.Э. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2018. Т. 45. № 5. С.

Carbohydrate Specificity of Antibodies Against Specimens of Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei*

V. B. Krylov^a, M. I. Petruk^a, A. A. Karelin^a, D. V. Yashunuskii^a, Yu. E. Tsvetkov^a, N. I. Glushko^b, E. V. Khaldeeva^b, V. L. Mokeeva^c, E. N. Bilanenko^c, Y. S. Lebedin^d, S. A. Eremin^c, and N. E. Nifantiev^{a, #}

^aLaboratory of Glycoconjugate Chemistry, N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

^bKazan Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 420015, Kazan, Russia

^cM.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia

^dXEMA Company Limited, 105264 Moscow, Russia

Received January 12, 2018

The immunization of laboratory animals with natural specimens of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* was carried out. The analysis of the obtained sera was performed using libraries of ligands constructed from synthetic oligosaccharides related to the basic carbohydrate components of the fungal cell wall. It was shown that antibodies in the studied sera recognize predominantly mannan fragments with different specificity profile for *S. cerevisiae* and *C. krusei*. Sera against *S. cerevisiae* contained antibodies that recognize linear trisaccharide epitope of β -glucan. The obtained data are necessary for the design of the required serological EIA diagnosticums for detection and species characteristics of fungi.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, yeast, antigen, antibody.