

Profile białkowe antygenów powierzchniowych dermatofitów

GRAŻYNA ZIÓŁKOWSKA, STANISŁAW TOKARZEWSKI

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Ziółkowska G., Tokarzewski S.

Protein profiles of surface antigens of dermatophytes

Summary

The objective of the study was to determine the optimal conditions for obtaining species-specific surface antigens of dermatophytes (the present authors' methodology), as well as their protein profile analysis. The studies included the clinical isolates of the following strains: *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum*. The analyzed strains were cultured on Sabouraud's solid medium for 7 and 21 days at a temperature of 25°C (*M. canis*, *M. gypseum*) and at 37°C (*T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*). Surface antigens were obtained from this material according to the present authors' methodology, the established elution time of antigen fraction was 1.3 and 24 h. The obtained protein fractions were stored as a lyophilize at a temperature of -20°C. The protein profiles of each antigen preparation were determined by SDS PAGE technique after Laemmli. The documents and analysis of the fractions obtained were performed with Gel-Doc (Bio-Rad). The studied preparations exhibited from 8 to 18 components of 190 kDa – 14.8 kDa molecular weight, while their qualitative and quantitative composition depended on the conditions of preparation obtainment and fungus species. The comparative analysis of dermatophyte protein profiles comprised the selected preparations obtained after the 24 hours' elution and a week of fungus culture. Besides the common components (70.35 and 25 kDa), the examined surface antigens contained the following species-specific fractions: a band of 27.7 kDa molecular weight was characteristic for *M. canis*, 107 and 87.3 kDa for *M. gypseum* and for *T. mentagrophytes* – 73.6; 59.4 and 45.6 kDa. The isolation and detailed characteristics of these proteins are likely to facilitate a quick and more specific diagnostics of dermatophytoses, as well as a thorough recognition of fungus pathogenicity mechanisms.

Keywords: dermatophytes, *Microsporum*, *Trichophyton*

Prowadzone od wielu lat badania struktury antygenowej grzybów miały na celu określenie immunologicznej aktywności poszczególnych komponentów i ich roli w patogenezie, a także uzyskanie swoistych reagentów diagnostycznych. Antygeny te umiejscowione są u dermatofitów podobnie jak u *Candida albicans* (6), *Aspergillus fumigatus* (7) czy też *Sporothrix schenckii* (4) przede wszystkim na powierzchni i w ścianie komórkowej, a tylko nieliczne mogą lokalizować się w cytoplazmie (8).

Określenie frakcji antygenowych odpowiedzialnych za patogenność i immunogenność tych grzybów napotyka na duże trudności. Eukariotyczna komórka grzyba nie tylko cechuje się złożoną ultrastrukturą i budową fizykochemiczną, ale również podlega ciągłym zmianom w trakcie swojego rozwoju, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. W konsekwencji pula potencjalnych antygenów jest nie tylko obszerna, ale charakteryzuje się wysoką labilnością. Struktura antygenowa zależy, między innymi, od fazy wzrostu grzyba, jego formy morfologicznej, wytwarzanych metabolitów oraz warunków środowiska (5).

Badania Camarago i wsp. (2) wykazały, że większość grzybów chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt, wytwarza charakterystyczne antygeny powierzchniowe, których rozpoznanie pozwala na szybką identyfikację zarazka. Są to rozpuszczalne, wysoce immunogenne i swoiste gatunkowo substancje wytwarzane przez grzyby przez cały okres ich rozwoju. Antygeny te znalazły zastosowanie do identyfikacji wielu gatunków grzybów sprawiających szczególne trudności diagnostyczne (12, 13). Ze względu na wysoki stopień pokrewieństwa antygenowego (9) nie znalazły jednak dotychczas zastosowania w przypadku identyfikacji dermatofitów.

Celem badań było określenie optymalnych warunków otrzymywania specyficznych gatunkowo antygenów powierzchniowych dermatofitów oraz analiza ich profili białkowych.

Materiał i metody

Badaniami objęto izolowane od zwierząt szczepy *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Microsporum gypseum* pochodzące z kolekcji własnej Zakładu Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Cho-

rób Zakaźnych i Inwazyjnych AR w Lublinie. Szczepy te przechowywano w formie liofilizatów w temperaturze -20°C .

Antygeny powierzchniowe. Badane szczepy namnażano na podłożu Sabourauda przez 7 i 21 dni w temperaturze 25°C (*M. canis*, *M. gypseum*) oraz 37°C (*T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*). Materiał uzyskiwany w określonych przedziałach czasowych zbierano z podłoża i zawieszano w jałowej wodzie destylowanej z dodatkiem 0,02% merthiolatu (Merck-Schuchardt) oraz mieszaniny inhibitorów (Proteinase inhibitor cocktail kit, ICN) w proporcji 10 ml roztworu na materiał z jednej płytki. Procedurę uzyskiwania antygenów powierzchniowych wykonano wg metodyki własnej (18), ustalając czas elucji frakcji antygenowej na 1, 3 i 24 godziny. Uzyskane frakcje białka liofilizowano i przechowywano w temperaturze -20°C . Zawartość białka w poszczególnych preparatach określano metodą biuretową (Cormay).

SDS-PAGE. Profile białkowe poszczególnych preparatów antygenowych określano techniką elektroforetyczną w warunkach denaturujących wg Laemmli (10) w aparacie Mini Protean II (Bio-Rad). Dokumentację wraz z analizą uzyskanych frakcji przeprowadzono z zastosowaniem Gel-Doc 2000 (Bio-Rad).

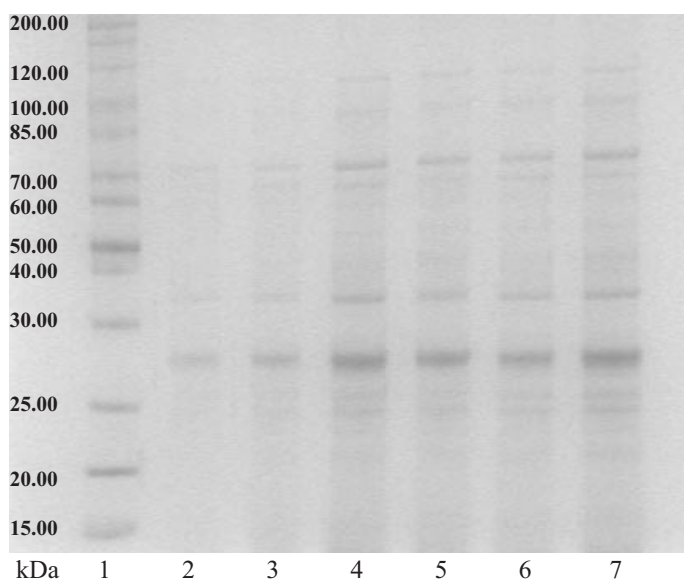
Wyniki i omówienie

Porównawczą analizę profili białkowych dermatofitów *M. canis*, *M. gypseum*, *T. verrucosum* i *T. mentagrophytes* przeprowadzono w oparciu o elektroforegramy ich antygenów powierzchniowych. W pierwszym etapie pracy określono optymalną fazę wzrostu grzybów oraz czas elucji antygenów dla uzyskania bogatej i zróżnicowanej struktury białek powierzchniowych. W tym celu poddano rozdziałowi elektroforetycznemu preparaty antygenowe uzyskane po 7 dniach (logarytmiczna faza wzrostu) i 21 dniach (początek stacjonarnej fazy wzrostu) hodowli dermatofitów na stałym podłożu Sabourauda oraz 1-, 3- i 24-godzinnej ekstrakcji (ryc. 1). Wykazano na przykładzie preparatów *M. ca-*

nis, że czas hodowli grzyba zwiększa ekspresję antygenów powierzchniowych, a przedłużony proces ich elucji powoduje ilościowy wzrost poszczególnych frakcji w ekstrakcie. Na podobne zjawisko w przypadku *Paracoccidies brasiliensis* zwrócili uwagę Camarago i wsp. (3), stwierdzając równoczesny wyraźny spadek reaktywności immunologicznej frakcji uzyskanych ze starszych hodowli. Apodaca i McKerrow (1) sugerują ponadto, że nasilające się w miarę przedłużania hodowli, procesy autolityczne z udziałem endogennych proteaz mogą w sposób przypadkowy modyfikować strukturę uzyskiwanych frakcji antygenowych.

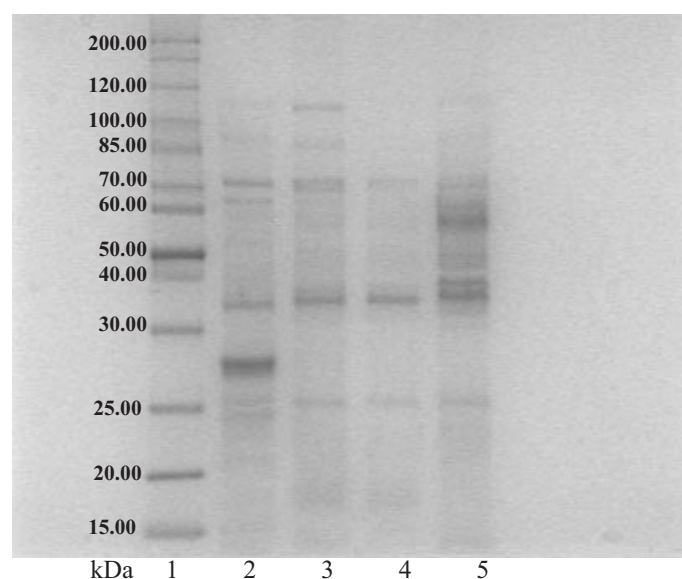
Badane preparaty wykazywały od 8 do 18 komponentów o masie cząsteczkowej od 190 kDa do 14,8 kDa. Najsilniej wyrażona była frakcja o masie 27,7 kDa, a w następnej kolejności frakcja o masie 34,0; 70,0; 25,5 i 24,4 kDa. Frakcje te były reprezentowane we wszystkich preparatach, przy czym ich procentowy udział w poszczególnych profilach białkowych zależał od warunków uzyskiwania preparatów. Zaobserwowano ponadto, podobnie jak inni autorzy (16, 17), stosunkowo słabe wybarwienie poszczególnych prążków białkowych. Może to być spowodowane hydrolityczną aktywnością enzymów proteolitycznych obecnych w antygenach powierzchniowych. Nie opracowano bowiem, jak dotąd, zestawu inhibitorów proteaz, którego działanie byłoby w pełni skuteczne i utrzymujące się przez dłuższy okres (15, 16).

Ze względu na fakt, że profil białkowy preparatu antygenowego uzyskanego po 24-godzinnej elucji grzybni z 7-dniowej hodowli *M. canis* wykazywał wysoką homologię jakościową oraz zbliżony procentowy udział poszczególnych frakcji z antygenami powierzchniowymi 21-dniowej hodowli, antygen ten został wytypowany wstępnie do dalszej analizy.



Ryc. 1. Profile białkowe antygenów powierzchniowych (Ap) *M. canis* hodowanych na stałym podłożu Sabourauda

Objaśnienia: 1 – standardy masy, 2 – Ap 1*/7**, 3 – AP 3/7, 4 – Ap 24/7, 5 – Ap 1/21, 6 – Ap 3/21, 7 – Ap 24/21; * – czas elucji w godzinach; ** – czas hodowli w dniach



Ryc. 2. Profile białkowe antygenów powierzchniowych (Ap), uzyskanych po 24-godzinnej elucji 7-dniowej hodowli dermatofitów na stałym podłożu Sabourauda

Objaśnienia: 1 – standardy masy, 2 – Ap *M. canis*, 3 – Ap *M. gypseum*, 4 – Ap *T. verrucosum*, 5 – Ap *T. mentagrophytes*

Tab. 1. Profile białkowe antygenów powierzchniowych dermatofitów

kDa	<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
107		7,7*		
87,3		9,0*		
73,6				3,9*
70-71	7,6	9,7	13,4	7,1
69		9,8		
65-63	5,4	5,7	6,2	
59,4				8,1*
57-56			8,8	15,5
50		7,4		9,9
45,6				7,7*
38-37			13,6	12,8
35-36	10,6	20,4	26,4	14,1
27,7	32,0*			
25	6,9	10,0	14,5	7,7
22,9	6,3			
17,0		11,3	17,2	

Objaśnienie: * – frakcje gatunkowo swoiste

W kolejnym etapie pracy określono profile białkowe pozostałych gatunków badanych dermatofitów. Analiza elektroforegramów *M. canis*, *M. gypseum*, *T. verrucosum* i *T. mentagrophytes* wykazała, że różniły się one zarówno pod względem gatunku grzyba, jak i warunków ekstrakcji antygenów. Frakcje białkowe uzyskane z 21-dniowej hodowli grzybów, z wyjątkiem *T. verrucosum*, były silniej wyrażone niż w przypadku hodowli 7-dniowej, ale jakościowy ich skład wykazywał wyższą homologię międzygatunkową. Mając na uwadze możliwość identyfikacji gatunkowej dermatofitów na podstawie struktury ich białek powierzchniowych oraz uwzględniając przesłanki z pierwszego etapu pracy, dalszą analizę przeprowadzono w oparciu o elektroforegramy preparatów antygenowych uzyskanych po 24-godzinnej elucji 7-dniowej hodowli poszczególnych gatunków grzybów (ryc. 2, tab. 1).

Profile białkowe antygenów powierzchniowych badanych dermatofitów wykazywały 6 (*M. canis*), 7 (*T. verrucosum*) lub 9 głównych frakcji (*M. gypseum* i *T. mentagrophytes*) o masach cząsteczkowych zawartych w przedziale od 107 kDa do 17 kDa. Komponenty o masie 70 kDa, 35 kDa i 25 kDa były wspólne dla wszystkich badanych dermatofitów, ponadto rodzaj *Trichophyton* zawierał dodatkowo frakcje o masie cząsteczkowej ok. 57 kDa i 38 kDa.

Pokrewieństwo struktury antygenowej dermatofitów jest zjawiskiem powszechnie znanym i udokumentowanym (15-17). Obok wspólnych frakcji wykazano również w antygenach powierzchniowych, komponenty gatunkowo swoiste (tab. 1). Komponenty typowe dla *M. gypseum* to białka o masie 107 kDa (7,7%) i 87,3 kDa (9,0%). *T. mentagrophytes* charakteryzowały prążki

o masie cząsteczkowej 73,6 kDa (3,9%), 59,4 kDa (8,1%) i 45,6 kDa. *M. canis* wykazywał obecność swoistej frakcji 27,7 kDa, która miała bardzo wysoki bo aż 32% udział w elektroforegramie. Komponent o zbliżonej masie cząsteczkowej a zdefiniowanej jako keratynaza, wyizolowali również Simpanya i wsp. (14) oraz Mignon i wsp. (11). Biorąc pod uwagę, że enzym ten, odpowiedzialny, między innymi, za patogenność i inwazyjność, zlokalizowany jest w warstwie zewnętrznej ściany komórkowej *M. canis* można przypuszczać, że wchodzi on również w skład badanych antygenów powierzchniowych jako frakcja o masie 27,7 kDa.

Przeprowadzenie dokładnej analizy porównawczej poszczególnych składowych profili białkowych jest bardzo trudne, stwierdzono bowiem, że wszelkie zmiany w hodowli grzybów, różne procedury ekstrakcji antygenów, hydrolityczna aktywność proteaz, a nawet drobne zmiany w technice wykonywania rozdziału, mogą powodować istotne różnice w elektroforegramach dermatofitów (6).

Wykazanie obecności frakcji antygenowych swoistych dla określonych gatunków dermatofitów jest zachęcającą przesłanką do prowadzenia dalszych badań w tym kierunku. Elucja poszczególnych komponentów białkowych oraz ich charakterystyka, pozwoli być może na uzyskanie reagentów do szybkiej i swoistej identyfikacji tych grzybów oraz do badania ich patogenności.

Piśmiennictwo

1. Apodaca G., McKerrow J. H.: Expression of proteolytic activity by cultures of *Trichophyton rubrum*. J. Med. Vet. Mycol. 1990, 28, 159-171.
2. Camarago Z. P., Taborca C. P., Rodrigues E. G.: The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. J. Med. Vet. Mycol. 1991, 29, 31-38.
3. Camarago Z. P., Unterkircher C., Campoy S. P.: Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. J. Clin. Microbiol. 1988, 26, 2147-2151.
4. Castillo M. C., Tapia F. J., Arciniegas S.: Ultrastructural localization of specific surface antigens in the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*. J. Med. Vet. Mycol. 1990, 28, 91-94.
5. Drouhet E.: Overview of fungal antigens, [w:] Drouhet E.: Fungal Antigens. N. Y. and London, Plenum Press 1988, 3-38.
6. Fukazawa Y., Kagaya K.: Molecular bases of adhesion of *Candida albicans*. J. Med. Vet. Mycol. 1997, 35, 89-99.
7. Hearn V. M., Latge J. P., Prevost M. C.: Immunolocalization of *Aspergillus fumigatus* mycelial antigens. J. Med. Vet. Mycol. 1991, 29, 73-81.
8. Holden C. A., Hay R. J., McDonald D. M.: The antigenicity of *Trichophyton rubrum*: In situ studies by an immunoperoxidase technique in light and electron microscopy. Acta Derm. Venerol. 1981, 61, 207-211.
9. Kaufman L., Standard P. G.: Specific and rapid identification of medically important fungi by exoantigen detection. Ann. Rev. Microbiol. 1987, 41, 209-225.
10. Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 1970, 227, 680-685.
11. Mignon B., Swinnen M., Bouchara J. P.: Purification and characterization of a 31,5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. Med. Mycol. 1998, 36, 395-404.
12. Pasarell L., McGinnis M. R., Standard P. G.: Differentiation of medically important isolates of *Bipolaris* and *Exserohilum* with exoantigens. J. Clin. Microbiol. 1990, 28, 1655-1657.
13. Sekhon A. S., Standard P. G., Kaufman L.: Grouping of *Aspergillus* species with exoantigens. Diagn. Immunol. 1986, 4, 112-116.
14. Simpanya M. F., Baxter M.: Multiple proteinases from two *Microsporum* species. J. Med. Vet. Mycol. 1996, 34, 31-36.
15. Sparkes A. H., Stokes C. R., Gruffydd-Jones T. J.: SDS-PAGE separation of dermatophyte antigen and western immunoblotting in feline dermatophytosis. Mycopathologia 1994, 128, 91-98.
16. Tucker W. D. L., Noble W. C.: Polycrylamide gel electrophoresis patterns of some *Microsporum* species. Mycoses 1991, 34, 303-307.
17. Tucker W. D. L., Noble W. C.: The value of electrophoretic protein patterns for the study of *Microsporum canis*. J. Med. Vet. Mycol. 1990, 28, 117-123.
18. Ziolkowska G.: Opracowanie i standaryzacja warunków uzyskiwania nowego antygenu *Microsporum canis*. Annales UMCS 2004, 59, 213-231.

Adres autora: dr hab. Grażyna Ziolkowska prof. nadzw. AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: g-ziolkowska@go2.pl