

Candida albicans Maya Hücre Duvarında Ekspres Edilip Hif Duvarında Edilmeyen β -1,2 Mannan Yapılarının Monoklonal Antikorlar ile Gösterilmesi

Demonstration of β -1,2 Mannan Structures Expressed on the Cell Wall of *Candida albicans* Yeast Form But Not on the Hyphal Form by Using Monoclonal Antibodies

Cevahir AYDIN^{1,2}, Haluk ATAÖĞLU²

¹ Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.

¹ Ankara University Institute of Biotechnology, Ankara, Turkey.

² Matriks Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti., Gazi Teknopark, Ankara.

² Matriks Biotechnology Industry and Trade Ltd. Co., Gazi Teknopark, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 05.09.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 19.11.2014

ÖZ

Candida albicans, insanda hem kommensal hem de fırsatçı patojen olarak bulunabilen polimorfik bir maya mantarıdır. Kandida hücre duvarının ana komponentlerinden birisi olan mannan, mantar-konak ilişkisinde ve mayanın virülansında rol oynamaktadır. *C. albicans* enfeksiyonlarının gelişiminde, mikroorganizmanın maya formundan hif formuna geçiş yeteneği önem taşır. Hif formu, maya formunda olmayan çeşitli antijenik özelliklere sahiptir ve hif oluştuğunda hücre duvarında yapısal değişiklikler meydana gelir. Bu dönüşüm ile ilgili birçok faktör etkili olsa da, tam olarak yeterli bilgi mevcut değildir. Bu çalışmada, *C. albicans*'ın form değiştirdiğinde duvar yapısında yer alan mannanın konfigürasyon değişiminin monoklonal antikorlar kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada *C. albicans* (NIHA 207) serotip A suşu ile kontrol olarak benzer hücre duvar yapısına sahip *Salmonella choleraesuis* 211 ve *Salmonella infantis* suşları kullanılmıştır. *C. albicans*'ın maya formu, YEPD agar besiyerinde 28°C'de inkübasyon ile, hif formu ise YEPD buyyon besiyerinde çalkalamalı inkübatör üzerinde 37°C'de 3-4 saat inkübasyon ile üretilmiştir. Mannan içeriği, hücrelerin eksponansiyel fazda toplanıp yıkanmasından sonra, pelletin 20 mM sitrat tamponu ile süspanse edilip 125°C'de 90 dakika otoklavlanmasıyla elde edilmiştir. Monoklonal antikor üretimi için hibridoma yöntemi kullanılmış; Balb/C farelerinin antijen ile immunize edilmesinden sonra toplanan splenositlerin, F0 myeloma hücreleri ile füzyon oluşturması sağlanmıştır. HAT besiyeri içerisinde oluşan klonlar arasından hibrid hücrelerin ürettiği antikorlar ELISA yöntemi ile izlenmiştir. Antikorların izotip tayini, ticari bir kit (Pierce Biotechnology, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Monoklonal antikorları içeren kültür süpernatantları toplanmış ve amonyum sülfat çöktürme yöntemi ile saflaştırılmıştır. Deney reaksi-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Haluk Ataoğlu, Matriks Biyoteknoloji Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti., Gazi Üniversitesi Teknoplaza Binası, BZ17, Gölbaşı, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 485 4294, **E-posta (E-mail):** halukataoglu@matriksbiotek.com

yonlarının tespitinde sandviç ELISA ve immüno Floresans (IF) yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmamızda, 2B7 klonu tarafından üretilen ve *C. albicans* maya hücre duvarına karşı özgüllüğü yüksek olan IgM sınıfından monoklonal antikorlar (mAb-2B7) elde edilmiştir. Bu antikorların, *C. albicans*'a benzer hücre duvar yapısına sahip bakterilerden *S. choleraesuis* 211 ve *S. infantis* suşları ile çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır. *C. albicans* maya formunda bulunan mannan β -1,2 bağının varlığı, bu bağlara özgül ticari bir monoklonal antikor (mAb-ACMK-1; Matriks Biotek®, Ankara) kullanılarak doğrulanmıştır. Ayrıca, mAb-ACMK-1'in IF yönteminde *C. albicans*'ın maya formu ile yüksek floresans verirken hif formu ile ışımaya vermediği izlenmiştir. İlk defa elde edilen bu veri, hif duvarında β -1,2 mannan bağlarının ya seyrek olarak bulunduğunu ya da hiç bulunmadığını göstermektedir. Her iki monoklonal antikorun da mannan antijenini tanımasına rağmen, epitop özellikleri farklı olduğundan mAb-2B7 *S. choleraesuis* 211 ile reaksiyon verirken mAb-ACMK-1 aynı bakteri ile reaksiyon vermemiştir. Sonuç olarak monoklonal antikorlar, kandidaların antijenik yapılarının tanımlanmasına olanak sağlayacak, böylelikle serumda mannan varlığını tespit eden ticari testlerin duyarlılık ve özgüllüğünü artıracak yeni determinantların tespit edilmesi mümkün olabilecektir.

Anahtar sözcükler: *Candida albicans*; maya; hif; mannan; β -1,2 bağı; monoklonal antikor.

ABSTRACT

Candida albicans is a polymorphic fungus that may be observed as both commensal and opportunistic pathogen in humans. As one of the major components of *Candida* cell wall structure, mannan plays an important role in the fungus-host cell interaction and in virulence. The ability to switch from yeast to hypha form of microorganism is crucial in the development of *C. albicans* infections. Hyphal form has different antigenic properties compared to yeast form and structural changes occur in the yeast cell wall during transition from yeast to hypha form. Although there are several factors associated with this transition process, sufficient information is not available. The aim of this study was to investigate the change of configuration in mannan structure found in *C. albicans* cell wall by using monoclonal antibodies. *C. albicans* (NIHA 207) serotype A strains were used as test strains throughout the study, together with *Salmonella choleraesuis* 211 and *Salmonella infantis* as controls with similar cell wall structures to that of *C. albicans*. Cultures were maintained on YPD-agar medium by incubating at 28°C for yeast forms, and on YPD-broth medium in a shaking incubator at 37°C for 3-4 hours for the growth of hyphal forms. Cells were harvested in the exponential phase, and after being washed, the mannan content from *C. albicans* were extracted from pellet by heating in 20 mM sodium citrate buffer for 90 minutes at 125°C. Hybridoma technique was used for the production of monoclonal antibodies. After immunizing the Balb/C mice with antigen, the splenocytes were harvested and fusion was performed between spleen cells and F0 myeloma cells. The clones grown in HAT medium were screened for the presence of antibody producing hybrid cells by ELISA method. The antibody isotypes were determined by using a commercial kit (Pierce Biotechnology, ABD). The culture supernatants which contained monoclonal antibodies were collected and purified according to the ammonium sulphate method. Sandwich ELISA and immunofluorescence (IF) methods have been used to detect the experimental reactions. In our study, highly specific class IgM murine monoclonal antibodies (mAb-2B7) against *C. albicans* yeast cell wall were obtained from clone 2B7. These antibodies cross-reacted with *S. choleraesuis* 211 and *S. infantis* bacteria sharing similar cell wall structure of *C. albicans*. The existence of mannan β -1,2 bonds on the surface of *C. albicans* yeast form was confirmed with a commercial monoclonal antibody (mAb-ACMK-1; Matriks Biotek®, Turkey) specific for those bonds. Besides, mAb-ACMK-1 interacted with *C. albicans* yeast form and gave intense fluorescence (high positive reaction) in IF method, but no fluorescence (negative) was detected with hyphal form. This data, obtained for the first time with this study, indicates that the mannan β -1,2 bonds are either found infrequently or none in the fungal hyphal wall. Although both monoclonal antibodies recognize the mannan antigen, mAb-2B7 reacted with *S. choleraesuis* 211, while mAb-ACMK-1 did not, due to the difference of epitope specificity. In conclusion, monoclonal antibodies may facilitate the characterization of antigenic structures of *Candida*, which will lead for the identification of new determinants that may increase the sensitivity and specificity of commercial tests used for mannan detection in serum.

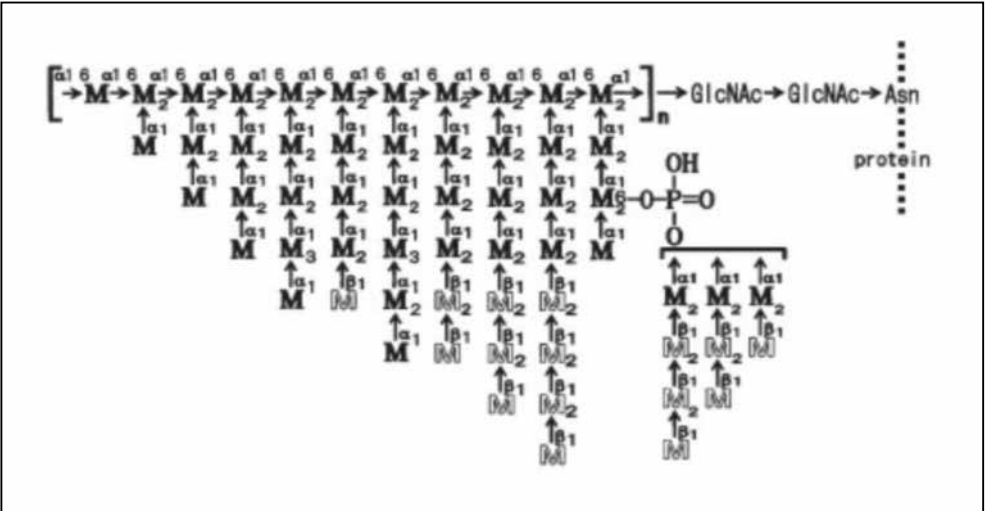
Keywords: *Candida albicans*; yeast; hypha; mannan; β -1,2 linkage; monoclonal antibody.

GİRİŞ

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan ve insanların normal florasında bulunan maya mantarlarıdır¹⁻³. Normal florada maya mantarı şeklinde bulunur, doku invazyonu sırasında ise hif formunda görülür⁴. Serum içerisinde 37°C 'de 2-3 saatte germ tüp oluşur ve hif formuna döner². Germ tüp formu maya hücresinde olmayan çeşitli antijenik özelliklere sahiptir³. *C.albicans*'ın germ tüp oluşumu döneminde hücre yüzey hidrofobitesini değiştirir; böylece plastik yüzeylere ve epitelyuma bağlanma yeteneği artar⁴. Fırsatçı patojen olan *Candida* türleri, çevresel ve bireysel koşulların organizma aleyhine geliştiği durumlarda hafif yüzeysel enfeksiyonlardan, ağır sistemik enfeksiyonlara kadar çeşitli klinik tablolara yol açabilir.

Kalitatif ve kantitatif olarak *C.albicans* hücre duvarının ana komponentlerinden biri olan mannan, primer fizyopatolojik öneme sahiptir¹⁻³. Tomurcuklanan maya hücrelerindeki mannan hif hücrelerinden daha fazladır⁴. Mannan birkaç fosfat grubu ile birlikte α -1,2, α -1,3, α -1,6 ve β -1,2 bağlı mannopiranoz ünitelerinden oluşur⁵. β -1,2 bağlı mannoz üniteleri çok güçlü antijenik bir yapı olan oligomannozil yan zincirini içermektedir. β -1,2 bağlı manno-oligosakkaridler mannan yan zincirine bir fosfat grubu aracılığıyla bağlıdır⁶. *C.albicans*'da glikolizasyon ile asparajine bağlanmış mannan hücre duvar yapısı Şekil 1'de görülmektedir⁶.

Patojenite ve virülans ile ilgili biyolojik fonksiyonların birçoğu hücre duvarında yerleşiktir. *Candida* türlerinin hücre duvar mannoprotein yapısı konak-mantar ilişkisinde ve virülansında çok önemlidir⁶. *Candida*'nın patojenite mekanizmalarını anlamada *C.albicans*'ın maya formundan hif formuna geçiş arasındaki farklılıkların aydınlatılması gerekmektedir. *Candida* mannanının kimyasal yapısının tam olarak anlaşılması, yeni anti-fungal ilaçların ve immünoterapötik uygulamaların geliştirilmesine olanak tanıyacaktır.



Şekil 1. *C.albicans* serotip A mannan hücre duvar yapısı (Shibata ve ark.⁶'dan uyarlanmıştır).

Bu amaçla alışmamızda, *C.albicans*'ın form değiştirdiğinde duvar yapısında yer alan mannanın konfigürasyon değişiminin monoklonal antikorlar kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kullanılan Suşlar

Çalışmada *C.albicans* (NIHA 207) serotip A suşu kullanıldı ve YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) agar besiyerinde 28°C'de üretildi. *C.albicans* hif formu, suşun sıvı besiyerine 10 µg/ml yaş hücre olacak şekilde pasajlanması ve 37°C'de 3-4 saat çalkalamalı inkübatörde bekletilmesiyle elde edildi. Kontrol olarak, benzer hücre duvar yapısına sahip *Salmonella choleraesuis* 211 ve *Salmonella infantis* suşları kullanıldı ve devamlılığı LB (Luria-Bertani) agar besiyerinde sağlandı. Koloniler 96°C'de su banyosunda 2 saat kaynatıldıktan sonra ELISA testi için kullanıldı.

Hücre Duvar Antijenlerinin Eldesi

C.albicans hücreleri, ekspanansiyel fazda toplandı. Bir kez %0.9 NaCl, bir kez de distile su ile yıkanarak hücre pelleti 20 mM sitrat tamponu (pH: 7.0) ile süspansiyon edildi. Mannan içeriği, Ballou'nun⁷ tanımladığı metoda göre 125°C'de 90 dakika otoklavlanarak ekstrakte edildi. Jelaniöz madde, 4°C'de 20 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant üzerine mannoproteinin çöktürülmesi için 3 hacim %100 metanol ilave edildi ve 24 saat 4°C'de manyetik karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Presipitat toplandı, distile suda çözüldü ve ardından 4°C'de 24 saat boyunca distile suya karşı (3 kez su değiştirilerek) diyaliz edildi. Karbonhidrat içeriği fenol sülfürik asit yöntemine göre tayin edildi⁸. Elde edilen mannan kompleksi liyofilize edildi.

Candida Alkalın Ekstraksiyonu (CAE)

C.albicans hücreleri, ekspanansiyel fazda toplandı ve besiyerinden ayrıldı. 500 µl 1.85 M NaOH ve %5 merkaptotanol ilave edilerek 15 dakika buzda bekletildi. Ardından 500 µl %50 TCA (trikloroasetik asit) ilave edilerek 15 dakika buzda bekletildi. 3500 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı. Pellet üzerine 0.13 ml %75 gliserol, 0.23 ml distile su ve 0.08 ml %25'lik SDS (sodyum dodesil sülfat) solüsyonu konuldu; 5 dakika 96°C'de su banyosunda kaynatıldı. Kaynama sonrası 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant toplandı⁹. 1 M TrisCl (pH: 8.8) özeltisi ile titre edilerek pH 7.4'e ayarlandıktan sonra 24 saat PBS'e karşı (3 kez su değiştirilerek) diyaliz edildi. Protein tayini Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, ABD) protokolüne uygun olarak yapıldı. Karbonhidrat tayini ise fenol sülfürik asit yöntemine göre yapıldı⁸.

Hibridoma Yöntemi ve Monoklonal Antikorların Üretilmesi

Hibridoma yönteminde kullanılacak olan immün hücrelerin eldesi için, 6 haftalık (25-30 g) 7 adet Balb/C fare kullanıldı. İmmünizasyon evresinde fareler; ilk dozda tam Freund adjuvanı, diğer dozlarda ise tam olmayan Freund adjuvanı ile birlikte 750, 1500 ve 3000 µg yaş hücre/hayvan olacak şekilde, sırasıyla bir gün arayla haftada üç gün

intraperitoneal yolla 6 ay immünize edildi. Antijene karşı oluşan immün yanıt ELISA ile izlendi. Son enjeksiyondan sonra farenin dalağı alındı. Hücre füzyonu, Kohler ve Milstein'in¹⁰ metodu referans alınarak gerçekleştirildi. Kısaca, splenositler ile F0 myeloma hücreleri arasında, %50 PEG solüsyonu (Sigma) varlığında füzyon oluşturuldu ve hücre süspansiyonu HAT (hipoksantin, aminopterin, timidin) besiyeri içerisinde 96 kuyulu plaklara yayıldı. Plaklar 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi ve bir hafta sonra HAT besiyeri (Sigma), HT besiyeri (Sigma) ile değiştirildi. İki hafta boyunca besiyerinde gelişen hibridoma kültür süpernatantları, uygun antikorları üretmeleri yönünden ELISA ile izlendi. Toplamda 480 adet kuyu tarandı ve antijene özgül monoklonal antikorlar seçildi. Antikorların izotip tayini, ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Pierce Biotechnology, ABD) protokolüne uygun olarak yapıldı. Monoklonal antikorları içeren kültür süpernatantları toplandı ve amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle %35 (w/v) oranında saflaştırıldı.

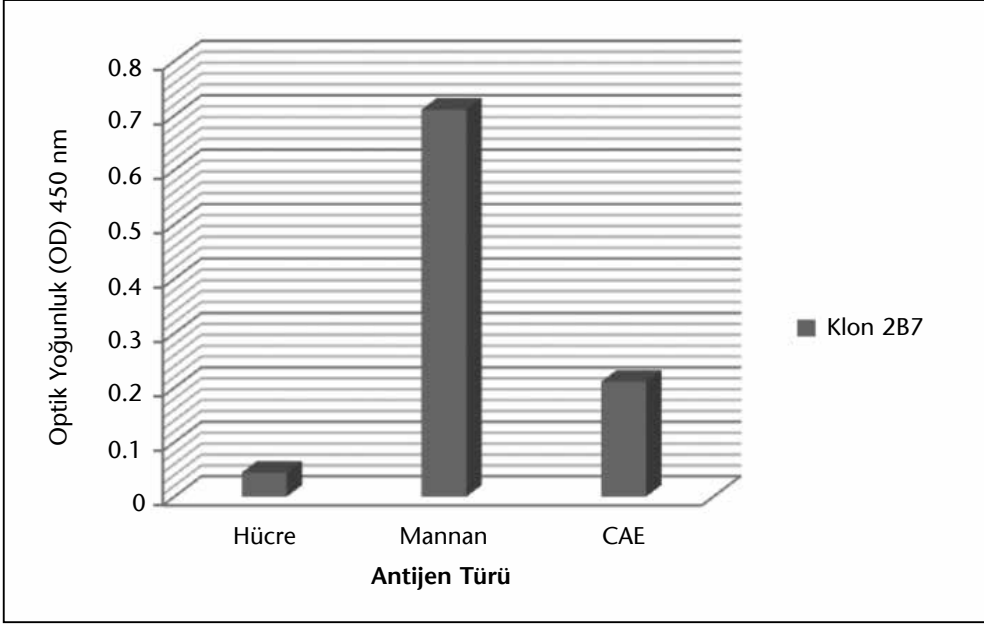
Çalışmada ayrıca, mannan yapısının β -1,2 bağına özgül olan ticari monoklonal antikorlar (ACMK-1; Matrics Biotek®, Ankara) kullanıldı.

ELISA Yöntemi

Mikroplak kuyuları; 100 μ g hücre/ml ve 20-70 μ g protein/plak konsantrasyonu olacak şekilde, 0.05 M Na₂CO₃/HCO₃ (pH: 9.6) kaplama solüsyonu ile her kuyuda 100 μ l hacim şeklinde kaplandı. Plağın üzeri kapatılarak 4°C'de 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün çıkarılan mikroplak 1 saat oda ısısında bekletildi ve yıkama tamponuyla (PBS - %0.5 Tween 20) 3 kez yıkandı. Her kuyuya 200 μ l bloklama ajanı [1x Stabil Coat (SurModics Inc, ABD) 100:1 FCS, PBS-Tween 20 içerisinde] eklendi ve üzeri kapatıldıktan sonra 30 dakika 37°C'de, ardından 30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. Süre bitiminde plakların içi aspire edildi. Primer antikor olarak, IgM izotipindeki 2B7 ve ACMK-1 monoklonal antikorları ayrı ayrı 100 μ l/kuyu şeklinde dağıtıldı ve 2 saat çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Daha sonra plaklar 3 kez yıkanarak her kuyuya sekonder antikorlar (anti-fare IgM; 2500:1) 100 μ l olacak şekilde dağıtıldı. Çalkalayıcı üzerinde 45 dakika inkübe edildi ve sonra yıkama işlemi aynı koşullarda tekrarlandı. Plaklara TMB substratından 100 μ l/kuyu şeklinde ilave edildi; 10-15 dakika karanlık ortamda oda ısısında bekletildikten sonra 1 M H₂SO₄ çözeltisinden 50 μ l/kuyu şeklinde ilave edildi. Sonuçlar 450 nm'de spektrofotometrik olarak okundu ve eşik (cut-off) değerinden yüksek olan örnekler pozitif olarak değerlendirildi [Eşik değer = Ortalama negatif kontrol + (Standart sapma negatif kontrol)²].

İmmüno Floresans (IF) Yöntemi

Bu amaçla kullanılacak olan lam kuyuları önce sırayla 20 μ l distile su, %70 etil alkol ve tekrar distile su ile yıkandı. Kuyulara 20 μ l Poly-L-Lysine (Sigma, P1524) konularak bekletildi ve çekildi. Paraformaldehit ile fikse edilmiş hücreler 100-200 μ g/10 ml PBS şeklinde hazırlandı ve lam kuyularına 20'şer μ l konuldu. Kuruması beklendikten sonra kuyulara primer antikorlar eklendi ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda PBS ile yıkama yapıldı ve bu kez floresan ile işaretli sekonder antikorlar [anti-fare IgM-FITC



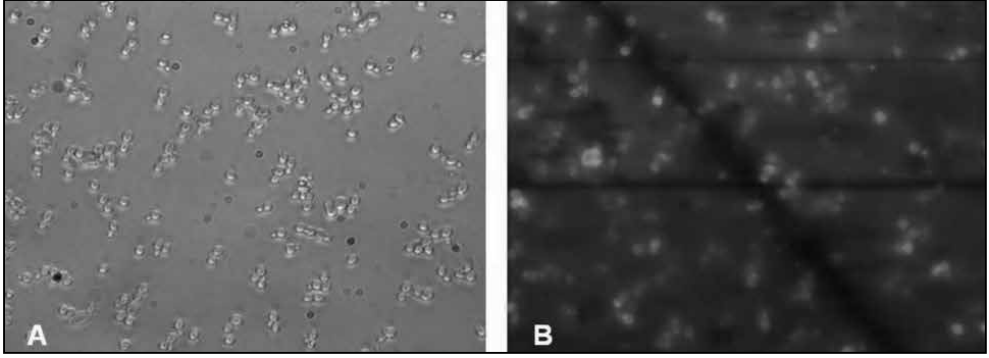
Şekil 2. ELISA yöntemi ile saptanan mAb-2B7 antikor düzeyleri (Grafik, OD değerlerinden eşik değerleri çıkarıldıktan sonra oluşturulmuştur. Eşik değerleri; hücre için 0.358, mannan için 0.539 ve CAE için 0.263'dür).

(2500:1)] ilave edilip 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra PBS ile yavaşça yıkanan lam kuyuları üzerine gliserol damlatılarak lamel ile kapatıldı ve floresan mikroskopta değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, *C.albicans*'a karşı yüksek özgüllükte monoklonal antikorlar (mAb-2B7) elde edilmiş ve bu antikorlar *C.albicans* maya formu ile IF yönteminde pozitif reaksiyon vermiştir (Şekil 2, Resim 1). Bu antikorlar, benzer yapıdaki bakteriler kullanılarak test edildiğinde, mAb-2B7'nin, hücre duvar yapısı lineer formda β -1,2 mannandan oluşan *S.choleraesuis* 211 ve *S.infantis* ile pozitif yanıt verdiği izlenmiştir (Tablo I).

β -1,2 bağına özgül monoklonal antikorlar (mAb-ACMK-1) ile yapılan değerlendirmede; bu antikorların ELISA yönteminde *C.albicans* maya formu ve CAE ile pozitif reaksiyon verdiği belirlenmiştir (Tablo II). Bunun yanında mAb-ACMK-1, IF yönteminde maya formu ile ışığa verirken hif formu ile vermemiştir (Resim 2,3). Bu durum, β -1,2 bağılı mannanın, maya hif yaptığında morfolojide meydana gelen değişiklik nedeniyle hif uzantılarında görünmediğini ortaya koymuştur. Bu antikorlar, *S.choleraesuis* 211 bakterisi kullanılarak test edildiğinde; mAb-ACMK-1'in dallanmış β -1,2 mannan duvar yapısı olan *C.albicans* ile pozitif yanıt verirken, lineer β -1,2 mannan duvar yapısı olan *S.choleraesuis* 211 ile yanıt vermediği saptanmıştır (Tablo III).



Resim 1. *C. albicans* maya formunun; **A)** Faz kontrast mikroskobu, **B)** Floresan mikroskobu görüntüsü (Klon 2B7 süpernatanı primer antikor olarak kullanılmıştır).

Tablo I. mAb-2B7'nin *S. choleraesuis* 211 ve *S. infantis* ile Verdiği ELISA Testi Sonuçları

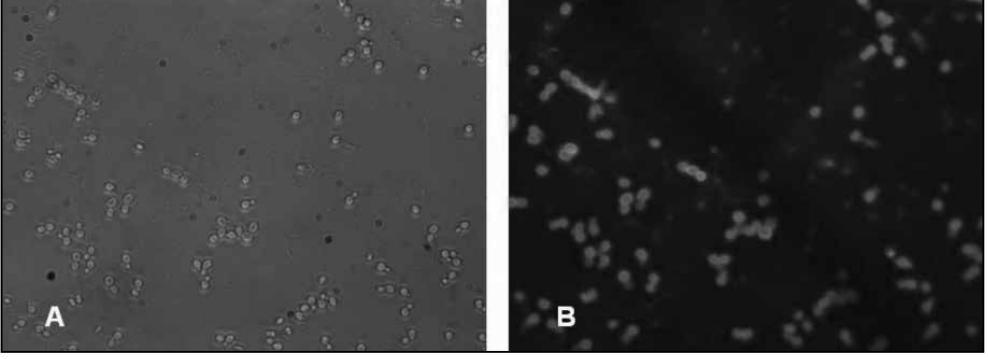
Plağın kaplandığı antijen	<i>S. choleraesuis</i> 211 hücre (100 μ g/ml)	<i>S. infantis</i> hücre (100 μ g/ml)
Primer antikor	2B7 süpernatanı	2B7 süpernatanı
Sekonder antikor	Anti-fare IgM (2500:1)	Anti-fare IgM (2500:1)
Yanıt (OD değeri)	2.429	2.070
Kör (Blank) değeri	0.244	0.221

Tablo II. mAb-ACMK-1'in *C. albicans* Maya Formu ve CAE ile Verdiği ELISA Testi Sonuçları

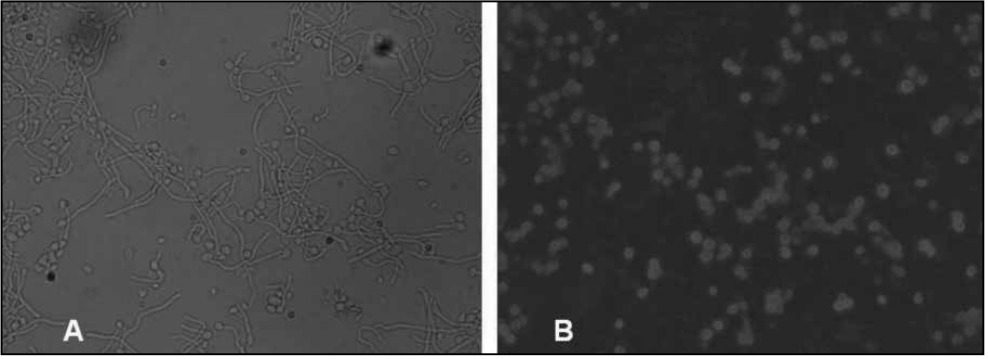
Plağın kaplandığı antijen	<i>C. albicans</i> hücre (100 μ g/ml)	CAE (15 μ g/plak)
Primer antikor	ACMK-1 mAb (8000:1)	ACMK-1 mAb (8000:1)
Sekonder antikor	Anti-fare IgM (2500:1)	Anti-fare IgM (2500:1)
Yanıt (OD değeri)	0.972	0.560
Kör (Blank) değeri	0.279	0.238

Tablo III. mAb-ACMK-1'in *S. choleraesuis* 211 ve *C. albicans* Maya Formu ile Verdiği ELISA Testi Sonuçları

Plağın kaplandığı antijen	<i>S. choleraesuis</i> 211 hücre (100 μ g/ml)	<i>C. albicans</i> hücre (100 μ g/ml)
Primer antikor	ACMK-1 mAb (8000:1)	ACMK-1 mAb (8000:1)
Sekonder antikor	Anti-fare IgM (2500:1)	Anti-fare IgM (2500:1)
Yanıt (OD değeri)	0.187	0.972
Kör (Blank) değeri	0.279	0.279



Resim 2. *C.albicans* maya formunun; **A)** Faz kontrast mikroskobu, **B)** Floresan mikroskobu görüntüsü (mAb-ACMK-1 primer antikor olarak kullanılmıştır).



Resim 3. *C.albicans* hif formunun; **A)** Faz kontrast mikroskobu, **B)** Floresan mikroskobu görüntüsü (mAb-ACMK-1 primer antikor olarak kullanılmıştır)

TARTIŞMA

Candida türü mayalar hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden olup, çoğunlukla yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda görülmektedir¹¹. En sık etken olan *C.albicans* bu hastalarda derin doku invazyonu gösterir ve yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara neden olur¹². Yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden sistemik kandidiyazın önlenmesinde erken tanı ve uygun tedavi büyük önem taşımaktadır¹³.

Candida türlerinin hücre duvar yapısı, mantar-konak ilişkisinde ve virülansında çok önemlidir⁶. Bu durum in vivo/in vitro ve kendi içinde de farklı çoğalma koşullarına göre değişiklik gösterir. Mannan yapının benzer olabilmesi için çoğalma koşullarının aynı olması gerekmektedir¹⁴. Sistemik ve derin enfeksiyonlarda ise *C.albicans*'ın hif yapma özelliği önemli virülans faktörlerinden birisidir. Bu çalışmada, *C.albicans*'ın form değiştirdiğinde duvar yapısındaki mannanın konfigürasyon değişiminin gösterilmesi planlanmış ve bu amaçla kullanılan *C.albicans* serotip A mannanı, antijenik yapısı nedeniyle serotip B'yi de kapsadığından dolayı tercih edilmiştir.

Serotip A'da, hem asitle modifiye olmuş β -1,2 bağılı mannan yapılar hem de serotip A'ya özgü aside dirençli β -1,2 dallanmaları yer almaktadır. Mannan yapısı, serolojik yanıtı oluşturan en önemli kandida antijeni olup, B hücrelerini, yardımcı T hücrelerinden bağımsız olarak, doğrudan aktive etmekte ve dolayısıyla sadece IgM yanıtına yol açmaktadır. Bilindiği gibi, timusa bağımsız (T-independent; TI) antijenlere karşı oluşan hümoral immün yanıtta, immünoglobulin izotip değişimi ve bellek B hücre farklılaşması olmamakta, dolayısıyla IgM antikorları sınıf değiştirmemekte ve sekonder antikor yanıtı görülmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda, hibridoma seçimi yapılırken anti-fare IgM antikorları tercih edilmiştir. Eloy ve arkadaşları¹⁵ yaptıkları çalışmada, %100 özgüllük ve %86 duyarlılıkla IgM antikorlarının, anti-kandida antikorlarını saptamak için en iyi test sistemi olduğunu ifade etmişlerdir. Polonelli ve arkadaşlarının¹⁶ çalışmasında da, *C. albicans*'a karşı elde edilmiş monoklonal antikorlar (mAb K20) IgM izotipindedir.

C1 grubu *Salmonella*'ların (*S. choleraesuis* 211 ve *S. infantis*) hücre duvar yapısı, *C. albicans* ile benzerlik göstermektedir. *Candida* türlerinin mannanı, çeşitli bağlarla bağılı mannan moleküllerinden oluşur. *Salmonella* türlerinin O antijenleri ise tekrarlayan ünitelerden oluşan lineer zincirlerden oluşur. Çalışmamızda elde edilen mAb-2B7 antikorları da, bu benzerlik nedeniyle *S. choleraesuis* 211 ve *S. infantis* ile çapraz reaksiyon vermiştir (Tablo I). Nnalue ve arkadaşları¹⁷ tarafından yapılan bir çalışmada da, *Candida* türlerinin mannanı ile *Klebsiella* K24 polisakkaridi ve *Salmonella* C1 ve EO-antijenleri arasında çapraz reaksiyon tespit edilmiştir.

C. albicans'ı diğer kandidalardan ayıran en önemli özelliklerden biri germ tüp oluşmasıdır. Bilindiği gibi faktör 5 serumu, aside duyarlı β -1,2 bağılı manno-oligosakkaride karşılık gelir⁶. Bununla birlikte mAb-ACMK-1, mannan yapısındaki β -1,2 bağına özgüdür. β -1,2 bağılı mannoz ünitelerinin daha antijenik yapıda olması nedeniyle buna karşı üretilen antikorların koruyuculuğu da yüksektir⁶. Bu durum, kandida enfeksiyonlarının önlenmesinde monoklonal antikorların kullanımını gündeme getirmiştir¹⁸⁻²². Nitekim Han ve arkadaşlarının¹⁸ çalışmasında, β -1,2 bağılı mannanlara karşı elde edilen monoklonal antikorların deneysel kandidiyaz ve vajinal enfeksiyonu önlediği gösterilmiştir. Kavishwar ve Shukla²¹ elde ettikleri G5 monoklonal antikorlarının, in vivo deney koşulları altında tedavi ve profilaktik kullanım için faydalı olduğunu bildirmişlerdir. Lee ve arkadaşları²², β -1,2 mannana özgül olarak geliştirilen IgM tipindeki monoklonal antikorlar ile flukonazol kombinasyonunun, sistemik kandidiyaza karşı etkili olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda *C. albicans* suşu, β -1,2 bağına özgül mAb-ACMK-1 ile hem ELISA hem de IF yönteminde pozitif sonuç vermiş ve bu durum *C. albicans* maya formu yüzeyinde β -1,2 bağının var olduğunu göstermiştir (Tablo II, Resim 2). Buna karşın *C. albicans* hif oluşturduğunda hücre duvar yapısında değişiklik meydana gelmektedir. Nitekim çalışmamızda da mAb-ACMK-1, *C. albicans*'ın maya formu ile floresans verirken, hif yapısıyla ışığa vermemiştir. İlk defa elde edilen bu veri, hif duvarında β -1,2 mannan bağlarının ya seyrek olarak bulunduğunu ya da hiç bulunmadığını göstermektedir. Ayrıca, β -1,2 bağına özgül ACMK-1 monoklonal antikor, hücre duvarı lineer formda β -1,2 bağına içeren suşlardan *S. choleraesuis* 211 ile test edildiğinde çapraz reaksiyon vermemiştir (Tablo III). Çalışmamızda elde edilen her iki monoklonal antikorun da (ACMK-1 ve 2B7)

β -1,2 bağıını tanımasına rağmen, mAb-2B7'nin *S.choleraesuis* 211 ile reaksiyon verirken mAb-ACMK-1'in vermemesinin, epitop özelliklerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Sonuç olarak, *C.albicans*'ın hücre duvarı mannan yan zincirlerinin kimyasal yapısının ve antijenik özelliklerinin tanımlanması, patojenite mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli bir basamak teşkil etmektedir. Çalışmamızda elde edilen antikorlar ile, enfeksiyon sırasında dolaşımdaki mannan veya anti-mannan antikorların ELISA veya IF gibi test sistemlerinde geliştirilmesi ve bu antikorların in vitro/in vivo test ve tedavi yöntemlerinde denenmesi, bundan sonraki çalışma planımızı oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Johnson MA, Cartmell J, Weisser NE, Woods RJ, Bundle DR. Molecular recognition of *Candida albicans* (1 \rightarrow 2)- β -mannan oligosaccharides by a protective monoclonal antibody reveals the immunodominance of internal saccharide residues. *J Biol Chem* 2012; 287(22): 18078-90.
2. Xu H, Nobile CJ, Dongari-Bagtzoglou A. Glucanase induces filamentation of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS One* 2013; 8(5): e63736.
3. Shibata N, Suzuki A, Kobayashi H, Okawa Y. Chemical structure of the cell-wall mannan of *Candida albicans* serotype A and its difference in yeast and hyphal forms. *Biochem J* 2007; 404(3): 365-72.
4. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Pathogenicity determinants of *Candida*. *Cerrahpaşa J Med* 2000; 31(3): 172-86.
5. Bates S, Hall RA, Cheetham J, et al. Role of the *Candida albicans* MNN1 gene family in cell wall structure and virulence. *BMC Res Notes* 2013; 6: 294.
6. Shibata N, Kobayashi H, Suzuki S. Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2012; 88(6): 250-65.
7. Ballou CE. Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects. *Methods Enzymol* 1990; 185: 440-70.
8. DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28(3): 350-6.
9. Trinel PA, Faille C, Jacquinet PM, Cailliez JC, Poulain D. Mapping of *Candida albicans* oligomannosidic epitopes by using monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1992; 60(9): 3845-51.
10. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256(5517): 495-7.
11. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, et al. Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med* 2014; 40(9): 1303-12.
12. Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules* 2014; 19(1): 1085-119.
13. Schell WA, Benton JL, Smith PB, et al. Evaluation of a digital microfluidic real-time PCR platform to detect DNA of *Candida albicans* in blood. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(9): 2237-45.
14. Koyama T, Makita M, Shibata N, Okawa Y. Influence of oxidative and osmotic stresses on the structure of the cell wall mannan of *Candida albicans* serotype A. *Carbohydr Res* 2009; 344(16): 2195-200.
15. Eloy O, Tabella C, Harzic M, Pina P, et al. Detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful for diagnosis of deep seated candidiasis. *Ann Biol Clin (Paris)* 2002; 60(6): 711-4.
16. Polonelli L, Beninati C, Teti G, et al. Yeast killer toxin-like candidacidal Ab6 antibodies elicited through the manipulation of the idiotypic cascade. *PLoS One* 2014; 9(8): e105727.

17. Nnalue NA, Weintraub A, Oscarson S, Lindberg AA. Cross-reactivity between the mannan of *Candida* species, *Klebsiella* K24 polysaccharide and *Salmonella* C1 and E O-antigens is mediated by a terminal non-reducing β -mannosyl residue. *Eur J Biochem* 1994; 220(3): 973-9.
18. Han Y, Ulrich MA, Cutler JE. *Candida albicans* mannan extract-protein conjugates induce a protective immune response against experimental candidiasis. *J Infect Dis* 1999; 179(6): 1477-84.
19. Han Y, Riesselman MH, Cutler JE. Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannan as an IgM protective antibody. *Infect Immun* 2000; 68(3): 1649-54.
20. Cutler JE. Defining criteria for anti-mannan antibodies to protect against candidiasis. *Curr Mol Med* 2005; 5(4): 383-92.
21. Kavishwar A, Shukla PK. Candidacidal activity of a monoclonal antibody that binds with glycosyl moieties of proteins of *Candida albicans*. *Med Mycol* 2006; 44(2): 159-67.
22. Lee JH, Jang EC, Han Y. Combination immunotherapy of MAb B6.1 with fluconazole augments therapeutic effect to disseminated candidiasis. *Arch Pharm Res* 2011; 34(3): 399-405.