

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA ALBICANS* KÖKENLERİ
ARASINDA ANTİFUNGAL DİRENÇ GENLERİNİN AKTARIMI**

DOKTORA TEZİ

Israa İbrahim Khalil JABBAN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

ANKARA
Ocak 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA ALBICANS* KÖKENLERİ
ARASINDA ANTİFUNGAL DİRENÇ GENLERİNİN AKTARIMI**

DOKTORA TEZİ

Israa İbrahim Khalil JABBAN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2010-59 proje numarası ile desteklenmiştir.

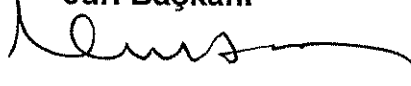
ANKARA
Ocak 2012

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 06/ 01/ 2012

Prof. Dr. Nedim SULTAN
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Ayşe KALKANCI
Gazi Üniversitesi



Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN
Ankara Üniversitesi



Doç. Dr. Işıl FİDAN
Gazi Üniversitesi



İçindekiler

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller	v
Resimler	vi
Grafikler	vii
Tablolar	viii
Semboller, Kısaltmalar	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ekoloji.....	3
2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri.....	5
2.3. Tedavide kullanılan Antifungaller.....	5
2.4. Azoller.....	6
2.5. Flukonazol Direncinin Moleküler Mekanizmaları.....	10
2.6. Antifungal Direnç Genlerinin Moleküler Olarak Tanımlaması.....	17
2.7. Mantarlarda Plazmidler.....	18
2.8. Transformasyon.....	20
2.9. Mantarlarda Transformasyon.....	20
2.10. Transformasyon Yöntemleri.....	23
2.10.1. Sferoblast Yöntemi.....	23
2.10.2. Lityum Asetat Transformasyon Yöntemi.....	23
2.10.3. Elektroporasyon Yöntemi.....	24
2.10.4. Cam Boncukları Kullanarak Transformasyon Yöntemi.....	26
2.10.5. Biyolistik Yöntemi.....	27
3.GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Gereçler.....	28

3.1.1. Cihazlar.....	28
3.1.2. Maya Kökenleri.....	29
3.1.3. Bakteri Kökenleri.....	30
3.1.4. Kimyasallar ve Besiyerleri.....	30
3.2. Yöntem.....	35
3.2.1a. Kökenlerin Toplanması.....	35
3.2.1b. Antifungal İlaçların Hazırlanması.....	35
3.2.1c. Antifungal Duyarlılık Testi (Mikrodilüsyon yöntemi).....	35
3.2.2. Bakterilerden Plazmid DNA Eldesi.....	36
3.2.3. Mayalardan Plazmid DNA Eldesi.....	37
3.2.4. Mayalardan DNA Eldesi.....	41
3.2.5. Mayalardan RNA Eldesi.....	42
3.2.6. Revers Transkriptaz PZR (RT-PZR) ile cDNA Eldesi.....	43
3.2.7. Bakterilerde Transformasyon.....	45
3.2.8. Bakterilerde Transformasyon için Elektroporasyon Yöntemi.....	46
3.2.9. Mayalarda Transformasyon.....	49
3.2.10. Mayalarda Transformasyon için Elektroporasyon Yöntemi.....	51
3.2.11. Bakterilerde ve Mantarlarda Transformasyonun Doğrulanması için Agar Dilüsyon Yönteminin Uygulanması.....	52
3.2.12. Direnç Aktarımın Moleküller Yöntemler ile Gösterilmesi.....	53
3.2.13. Elektroforez Yöntemi.....	56
3.2.14. Gerçek zamanlı PZR (RT-PZR).....	57

4.BULGULAR.....	59
5.TARTIŞMA.....	73
6.SONUÇ.....	80
7.ÖZET.....	81
8.SUMMARY.....	82
9.KAYNAKLAR.....	83
10.EKLER.....	101
TEŞEKKÜR.....	102
ÖZGEÇMİŞ.....	103

Şekiller

Şekil 1. Flukonazolün kimyasal yapısı.....10

Şekil 2. Antifungal ilaçlara karşı direncin moleküler mekanizmaları.....16

Resimler

Resim 1: Elektroporasyon cihazı, NEON™ Transfection System.....	47
Resim 2: Neon™ Pipette Station.....	47
Resim 3: A, Duyarlı köken, Flukonazol içeren YPD besiyeri.....	64
B, Duyarlı köken, Flukonazol içermeyen YPD besiyeri.....	64
C, Direnç aktarılan, transformant köken, Flukonazol içeren YPD besiyeri	65
Resim 4: Duyarlı ve dirençli <i>C.albicans</i> DNA ve plazmid DNA amplikonların jel elektroforezi ile görüntülenmesi, DNA ve Plazmid CDR genin görüntüsü.....	68
Resim 5: CDR2 ve ACT1 PZR sonuçları, jel elektroforezi ile görüntülenmesi, A: CDR2, B: ACT.....	69

Grafikler

Grafik 1. NanoDrop analiz ekranı örnek DNA ölçüm görüntüsü.....	62
Grafik 2. Aktarımda kullanılan kökenlerin PZR belirlenmesi.....	71
Grafik 3. Transformant kökenlerde dirençten sorumlu CDR genlerinin Gösterilmesi.....	72

Tablolar

Tablo 1. Dirençli mutant kökenler ve duyarlı kökenler.....	29
Tablo 2. Flukonazol'ün <i>Candida albicans</i> klinik ve referans suşları için MİK Değerleri.....	59
Tablo 3. Kökenlerden elde edilen DNA ve plazmid DNA miktarları.....	61
Tablo 4. Konvansiyonel PZR yöntemiyle kökenlerde ERG11,MDR1,CDR2 direnç genlerin ve internal kontrol olarak kullanılan ACT1 genin, DNA ve Plazmid DNA örneklerinde gösterilmesi.....	63
Tablo 5. Kullanılan kökenler ve elde edilen transformant kökenlerden izole edilen RNA ve RNA' dan RT-PZR ile elde edilen cDNA miktarları...	66
Tablo 6. Gen aktarımında kullanılan kökenler ve transformant olan kökenlerin konvansiyonel PZR ile DNA, plazmid DNA ve cDNA moleküllerin sonuçları.....	67
Tablo 7. Transformant Kökenlerin 1 n 2. ekimden plazmid ve cDNA direnç genlerinin sonuçları.....	70

Semboller, Kısaltmalar

DNA: Deoxyribonucleic acid

cDNA: Complementary DNA

ssDNA: Single strand DNA

RNA: Ribonucleic acid

mRNA: Messenger Ribonucleic acid

rRNA: Ribozomal Ribonucleic acid

LiAc: Lityum asetat

PEG: Polietilen glikol

CDR: Atım pompaları (efflux pump)

14DM: 14 α -demetilaz

ERG11: Lanosterol 14-alfa-demetilaz enzimi kodlayan gen

MDR: Multi drug resistance gene family

ATP: Adenozin tri fosfat

ACT: Aktin geni

MFS: Major facilitator superfamily, transporters

FLU1: Fluconazole resistance, Hap43p-induced gene

IPT1: Inositolphosphotransferase

RFLP: Restriction fragment length polimophisim

RAPD: Random amplification of polymorphic DNA

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RT-PZR: Reverz transkripsiyon PZR

RT: Ters transkriptaz

ARSs: Autonomously replicating sequences

CLSI: Clinical laboratory standards institution

LPT: Lökosit parçalama tamponu

SDA: Sabouraud dextrose agar

MHA: Muller Hinton agar

YPDA: Yeast peptone dextrose agar

PBS: Fosfat buffer salin

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
MOPS: 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
TRİS: (hydroxymethyl) aminomethane
EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit
TE: Tris ve EDTA
ZYM: Zymolyase enzimi
FKI: Fenol-Kloroform-İzoamilalkol
DTT: Dithiothreitol
TBE: Tris-Borik asit-EDTA tamponu
ABC: ATP bağlı kaset taşıyıcıları
AIDS: Acquired Immuno Deficiency Syndrome

1.GİRİŞ

Mantarlardan *Candida* türleri bağışık sistemi baskılanmış konaklarda görülen enfeksiyonların en önemli etkenlerindedir.^{1, 2} *C.albicans*, kommensal mantardır ve en önemli özelliği, fırsatçı patojen etken olabilmesidir.³

Mantar enfeksiyonlarına duyarlı olan konak sayısının artması, profilaktik ve ampirik amaç ile azollerin kullanılmasını da arttırmıştır.⁴ Bu artmış kullanım beraberinde direnç sorununu gündeme getirmiştir. Gözlenen direnç sorunu, direnç mekanizmalarını anlamaya yönelik çalışmaların yapılmasına da hız kazandırmıştır.^{5, 3}

Azollere karşı direncin gelişmesi, önemli bir sorun olmuştur. Azollerden flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve posakonazol ergosterol biyosentezinde anahtar bir enzim olan 14- α demetilaz'ı bloke ederek etki gösterirler.^{6, 7, 8}

Mantarların aktarılabilecek genetik elemanları içerdikleri gösterilmiş olmasına rağmen, sağlam mantar hücreleri ekzojen DNA'yı kolayca alamayabilir.⁹ Bakteri ve mantar hücresi içinde kromozomdan ayrı olarak sitoplazma içinde ya serbest olarak (plazmid) veya hücre kromozomu ile birleşmiş hâlde (episom), DNA karakterinde ekstrakromozomal genetik elementler bulunmaktadır. Bu plazmidlerden gen aktarımında yararlanılamamakta, bunların yerine in vitro koşullarda ve amaca göre hazırlanan yapay plazmidler tercih edilmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* enfeksiyon etkeni olmadığı halde gen aktarımında kullanılan bir maya

mantarıdır. *Candida albicans* ise klinik önemi daha fazla olmasına rağmen genom yapısı nedeni ile gen aktarımında yaygın olarak kullanılamamaktadır.^{10, 11, 12, 13, 14, 15, 16}

DNA'nın bakterilerin içine etkili bir şekilde girmesi (transformasyon) moleküler biyoloji alanında büyük öneme sahip bir mekanizmadır.¹⁷ Maya hücreleri alkali metal katyonlarla, tirol bileşikleriyle dondurup çözündürme ile DNA alabilecek hale getirilebilir. Transformasyon yöntemi olarak mantarlarda lityum asetat (LiAc) yöntemi, polietilen glikol (PEG) yöntemi, elektroporasyon yöntemi, cam boncuklar kullanılabilir. *Candida albicans* transformasyonu için LiAc ve elektroporasyon yöntemleri ile iyi sonuçlar elde edilmiştir.¹⁸

Azollere karşı direnç gelişmesinde hedef enzimin değişmesi, mutasyona uğraması, atım pompalarının aşırı ifadelmesi gibi mekanizmalar rol oynamaktadır. Atım pompalarından (efflux pump) CDR1 ve CDR2'yi kodlayan genlerinin değişmesi ilaçlara karşı duyarlılığın azalmasına neden olmuştur. Bu genlerdeki farklılıkların belirlenmesi antifungal ilaçlara duyarlılığın belirlenmesinde kullanılmaktadır.^{19, 20, 21} Antifungal direncin aktarılabildiğine dair bir kanıt bulunmamaktadır. Bu tezin amacı; dirençli *C. albicans* kökenlerinden plazmid izolasyonu yapılması ve bu plazmidin duyarlı kökenlere aktararak, duyarlı kökenlerde transformasyon yolu ile direnç geliştirilmesidir.^{22, 23}

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Ekoloji

Mantar enfeksiyonları, 1980'li yıllardan itibaren giderek artan sıklıkta görülmeye başlamıştır. Özellikle son yıllarda modern tıptaki gelişmelere paralel olarak fırsatçı etkenler olan mantarların önemi artmıştır. Mantarlar 37°C'de üreme yeteneği ile invaziv hastalık etkeni olarak karşımıza çıkabilmektedirler.¹

Candida türleri fırsatçı patojenlerden en yaygın olanıdır. Enfeksiyon patogenezinde katkıda bulunduğu düşünülen virülans özellikleri arasında *Candida*'ların dokulara adezyon yeteneği, maya-hif dimorfizmi sergileyebilmeleri, hücre yüzey hidrofobikliği, proteinaz, fosfolipaz gibi hücre dışı enzimleri salgılayabilmeleri ve fenotipik dönüşüm sayılabilir.²⁴

Alman B. Lagenbeck 1839'da pamukçukta maya benzeri bir mantarın varlığını göstermiş olan ilk kişidir. 1923'te Christine Marie Berkhout, Utrecht Üniversitesi'ndeki doktora çalışmasında *Candida* cinsi ve *albicans* türünü tanımlamıştır. Yıllar boyunca bu cinsin ve türün tanımlanması evrim geçirmiştir. Cins için *Mycotorula* ve *Torulopsis*, tür için ise *Monilia albicans* ve *Oidium albicans* artık kullanılmayan isimlerdir. Şu anda kullanılan ismi, Uluslararası Botanik Kongresi (*International Botanical Congress*) tarafından "korunmaya alınmış isim" (Lat., *nomen conservandum*) tanımı altındadır.

Sınıflandırmanın ayrıntıları *Candida albicans* maddesinde bulunabilir. Yaygın kandidoz % 25 oranda mortalite ile ilişkilidir. *Candida* türleri derinin, gastrointestinal sistemin, genitoüriner yolların normal flora üyesi mikroorganizmalarıdır. Sağlıklı kişilerde mukozal yüzeyleri zararsız olarak kolonize ederken bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda yüzeysel ve hayatı tehdit eden sistemik infeksiyonlara neden olabilirler.^{25, 26} *C.albicans* klinik izolatlarda en sık görülen türdür. Fakat non-*albicans* türlerin son zamanlarda arttığı gözlenmiştir. Mantar etkenleri, yüksek virülans ve tedaviye yanıtızsızlık nedeni ile önem kazanmışlardır. Amerika Birleşik Devletleri'nde *Candida* türleri kan dolaşımı infeksiyonları arasında 4. sırada yer almaktadır.^{27, 28}

Maya genetiği giderek önem kazanmaktadır. *C. albicans* diploid bir organizma olduğu için genetik çalışmalarda uzun süre yer alamamıştır. Son yıllarda moleküler tekniklerdeki gelişmeler ve genetik analizlerde kullanılan paraseksüel yöntemler kullanılarak *C.albicans*'ın ototrofik mutant kökenleri elde edilmiştir. *S.cerevisiae*'dan elde edilen bilgilere dayanarak *C.albicans* kökenlerinin moleküler biyolojisi araştırılmıştır. Özellikle yeni antifungal ilaçların geliştirilmesine yönelik moleküler hedeflerin tanımlaması için çalışmalar yapılmaktadır.²⁶

Moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılarak elde edilen bilgilere göre tek tip köken ile kolonizasyon gerçekleşmektedir. Hastada gelişen rekürren enfeksiyonun kaynağı genellikle tek kökendir. Bazen birden fazla köken veya alt tür enfeksiyona neden olabilir. Rekürren enfeksiyonlarda aynı hastadan flukonazole duyarlı ve sonra dirençli *C.albicans* kökenlerinin izole edildiği gösterilmiştir.²

2.2.Mikrobiyolojik Özellikleri

Candida'lar 3-5 µm çapında, yuvarlak veya oval, tomurcuklanarak çoğalan maya mantarlarıdır. ²⁸ *Candida* cinsi içindeki mayalar Sabouraud dekstroz agarda (SDA), 24-48 saatte, 25⁰-37⁰C'de, 2-3 mm çapında, beyaz veya krem renginde, düzgün yüzeyli veya göbekli ve uzayan inkübasyon ile birlikte çıkıntılı, mat ya da parlak koloniler oluştururlar. *Candida albicans* maya-hif dönüşümü göstermesi ve bazı hidrolitik enzimleri üretmesi nedeni ile virülansı en yüksek türdür. Mannan temel alınarak yapılan serotiplendirmede serotip A ve B olarak ikiye ayrılabilir. Klinik izolatlar arasında serotip A, serotip B'den daha fazladır. ²⁹ Serum içinde 2 saat bekletildiğinde çimlenme borusu (germ tüp) oluşturur. Mısır unu tween 80 agarda klamidospore oluşturur. Son yıllarda germ tüp pozitif olan, klamidospore oluşturan veya oluşturmeyen üç tür *C.albicans*'dan ayrılarak yeniden sınıflandırılmışlardır. Bunlar *C. africana*, *C. stellatoidea*, *C. dubliniensis* türleridir. Bu türler fenotipik olarak *C. albicans*'dan ayrılamazlar. ³⁰

2.3.Tedavide kullanılan antifungaller

Son yıllarda mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antifungallere yenileri eklenmekte ancak direnç sorunu da devam etmektedir. ^{31, 32} Etki mekanizmalarına göre antifungal ilaçlar altı gruba ayrılmıştır;

1.Poliyenler; ergosterole bağlanarak etki gösterirler. Membranda delikler oluşturur ve hücre içeriğinin kaybedilmesine neden olurlar. Bu grupta amfoterisin B ve nistatin bulunur.

2.Azoller; ergosterol sentezinin anahtar enzimlerinden lanosterol 14 alfa demetilaz enzimini bloke ederek etki ederler. Hücrede ergosterol oluşmaz, onun yerine lanosterol birikir. İmidazoller ve triazoller olmak üzere iki grup bulunmaktadır. İmidazoller ketokonazol, mikonazol, ekonazol, tiokonazol iken, triazoller flukonazol, vorikonazol, itrakonazol, posakonazol, ravukonazol olarak sayılmaktadır.

3.Alilaminler; ergosterol sentezinde skualen epoksidaz enzimini bloke ederler. Hücrede ergosterol azalır, skualen birikir. Terbinafin ve naftifin bu gruptadır.

4.Ekinokandinler; hücre duvarındaki beta gluklan sentezini bloke ederler. Kaspofungin, mikafungin, anidulafungin bu gruptadır.

5. Flusitozin gibi anti metabolitler; Flusitozin hücrede 5-florourasil'e dönüşür ve DNA-RNA üzerinde etki ederek protein sentezini bozar.

6. Griseofulvin; hücrenin bölünmesini engeller.

2.4. Azoller

Azol sınıfı antifungaller yapısal olarak imidazoller (azol halkasında 2 nitrojen bulunduranlar) ve triazoller (azol halkasında 3 nitrojen

bulunduranlar) olarak iki gruba ayrılır. Imidazoller arasında yalnızca ketokonazolün sistemik etkinliği vardır. Triazollerin tümü sistemik etkinliğe sahiptir. Ravukonazol, albakonazol ve isavukonazol henüz araştırma aşamasında olan triazollerdir. Genel olarak azoller, *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* gibi maya benzeri mantarlara karşı fungistatik aktivite gösterir. Ancak itrakonazol, vorikonazol, posakonazol ve ravukonazol *Aspergillus* türlerine karşı fungisidal etki de göstermektedir. Triazoller sitokrom p-450 bağımlı bir enzim olan lanosterol 14 α - demetilaz inhibisyonu yolu ile etki ederler. ^{24, 33, 34}

Ciddi *Candida* infeksiyonlarını önlemek için azoller ile profilaksi tedavisi rutin olarak uygulanmaktadır. Özellikle kemoterapi tedavisine başlayan, hematolojik malignitesi olan hastalıklara, kemik iliği ve organ nakli yapılmış hastalara triazoller ile profilaksi başlanmaktadır. Bu uygulama mortalite oranını ve parantral antifungal tedavi ihtiyacının azalmasını sağlamıştır. ^{35,63} Son yirmi yılda antifungallerin tüketimi artmıştır. Binlerce ton azol, bitki patojenlerine karşı kullanılmıştır. Toprak ve suda azollerin yarı ömrü uzun (365 güne kadar) olduğu için çevrede seçici baskı oluşmasına neden olmuştur. ^{4, 37, 38}

Flukonazol gibi geniş spektrumlu antifungal ilaçların uzun süreyle veya profilaktik olarak kullanılması, dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu nedenle, tedavinin başarısızlığı ciddi bir klinik sorun hâline gelmiştir. Flukonazole doğal direnç gösteren *C.krusei* posakonazol ve vorikonazole duyarlıdır. *Candida glabrata* türü yüksek MİK değerlerinde flukonazole duyarlıdır. ^{23, 39, 40, 41, 8}

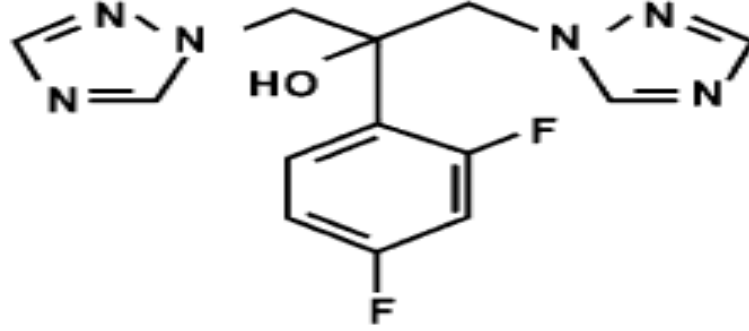
Flukonazol

Flukonazol, 1990'larda keşfedilen bir triazoldür. Flukonazol, *C.albicans* infeksiyonlarında en çok kullanılan ilaçlardan biridir. ^{42, 21} Oral biyoyararlılığı yüksektir. Mide asidine duyarlı değildir. Toksikitesi düşük olan birinci kuşak bir triazoldür. ^{43, 24} Flukonazol, suda çözünen bir ilaçtır, oral ya da intravenöz yoldan uygulanabilir. Proteine bağlanması düşüktür ve santral sinir sistemi dahil olmak üzere tüm organ ve dokulara dağılabilir. Eksfoliyatif dermatit ve karaciğer yetmezliği gibi ciddi yan etkileri nadirdir. ^{24, 41, 8}

Flukonazol yaygın biçimde kullanılır ve *Candida* türlerinin çoğu, *Cryptococcus neoformans*, dermatofitler, *Trichosporon* türleri, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* ve *Paracoccidioides brasiliensis*'e karşı etkilidir. ^{24, 21} Toksikitesinin az olması, uygulama kolaylığı ve maya benzeri mantarların çoğuna karşı gösterdiği fungistatik etkinlikten dolayı, kandidoz, kriptokokkoz ve koksidiyoidomikoz tedavisinde flukonazol önemli bir role sahiptir. Mantar infeksiyonlarının tedavisi ve önlenmesinde azollerin, özellikle flukonazolün yaygın bir şekilde kullanımı, direncin artmasına neden olmuştur. Kandidemi ve mukoza kandidozun da başlangıç tedavisi olarak seçilmiştir. Yüksek riskli gruplarda profilaktik olarak, AIDS'li hastalarda ise *Cryptococcus*'a bağlı menenjit infeksiyonlarında idame tedavisinde kullanılmaktadır. ^{24, 44, 45}

In vitro olarak uygulanan duyarlılık yöntemleri antifungal ilaçların ilk geliştirildiği yıllardan itibaren mevcuttur. ⁴⁶ Duyarlılık yöntemlerin standardizasyonu çalışmaları sonucunda 1992 yılında mantarlarda antifungallara karşı duyarlılığı ve MİK değerlerini ölçmek için mikrodilüsyon yöntemi standart olarak tanımlanmıştır. 1997 yılında *Candida* ve *Cryptococcus* türleri için M27-P mikrodilüsyon yöntemi önerilmiştir. ^{42, 46} Bu yöntem ile sonuçları etkileyen anahtar değişiklikler (inokulumun hazırlanışı, kullanılan besiyeri, ısı derecesi, inkubasyonun süresi ve MİK değerlerinin sınır değerleri gibi) belirlenmiştir.⁴⁶ Son olarak düzenlenen antifungal duyarlılık test koşulları M27-A3 belgesi olarak yayımlanmıştır. Bu belgeye göre flukonazol için direnç sınır değeri > 64 µg/ml, doza bağlı duyarlılık sınır değeri 16-32 µg/ml, duyarlılık sınır değeri < 16 µg/ml olarak belirlenmiştir. Itrakonazol için direnç sınır değeri ≥ 1 µg/ml, doza bağlı duyarlılık sınır değeri 0.25 - 0.5 µg/ml, duyarlılık sınır değeri ≤ 0.125 µg/ml olarak belirlenmiştir. Amfoterisin B için 1 ve altındaki değerler duyarlılık olarak kabul edilmektedir. 5-flusitozin için ≥ 32 µg/ml dirençli, 8-16 µg/ml orta derecede duyarlı, ≤ 4 µg/ml duyarlı olarak kabul edilmektedir.

fluconazole



Şekil 1. Flukonazolun kimyasal yapısı. ⁸

2.5. Flukonazol Direncinin Moleküler Mekanizmaları

Flukonazole karşı direnç gelişmesi ilacın kullanım düzeyi, konağın bağışık durumu gibi doğrudan köken ile ilintili olmayanlardan başlayarak birçok faktörden etkilenmektedir. Köken ile ilişkili olan direnç mekanizmaları mantar hücresi içinde antifungalin hedefi olan birçok bölgeyi ilgilendirmektedir. ⁴⁷

1.Ergosterol biyosentez yolundaki değişiklikler

Sitokrom p450 bağımlı lanosterol-14 α -demetilaz mantarlarda hücre duvar yapısında ergosterol sentezini düzenler. Azoller, bu enzimin demir grubuna bağlanır. Bu bağlanma ergosterolün oksidatif demetilizasyonunu engeller. Enzimin işlevindeki değişiklik, ergosterol sentezinin azalmasına neden olur. Böylece mantarlarda hücre duvar stabilizasyonu, besin taşınması, ve kitin sentezi etkilenir. Sonuçta mantar hücrelerin replikasyonu bozular. ^{4, 48, 49} Sitokrom p450 lanosterol 14 α -demetilaz (CYP51A1) enzimindeki değişiklikler *C.albicans*larda antifungal ilaçlara karşı direncin gelişmesine neden olur. ^{50, 51}

2. İlacın hedef enzimini (14DM) kodlayan ERG11 geninde mutasyonlar

Candida albicans kökenlerinde dirence neden olan en önemli mekanizmalardan biridir. Mutasyon fonksiyonu etkilemeden ilacın hedef yapıya bağlanmasını engellemektedir. 14DM enzimindeki değişikliklerin flukonazole dirençten sorumlu olduğunu tanımlamak için duyarlı ve dirençli suşlarda ERG11 gen dizisi araştırılmıştır. ERG11 gen dizisi dirençli kökenler arasında karşılaştırıldığında F105L, E166D, K287R, G448E, G450E, G464S ve V4881 amin asitlerinde değişim saptanmıştır. Flukonazole dirençli *C.albicans* kökenlerinde ERG11 geninin her iki allelinde R467K ve G464S mutasyonları belirlenmiştir. Her iki amino asit demir bağlanma bölgesine yakın bir yerde bulunur. ERG11 dizilerinde oluşan mutasyonların direnç

fenotipine önemli katkısı vardır. ^{25, 52} ERG11 genindeki farklı nokta mutasyonları azollerin bağlanma afinitesini etkiler ve in vitro olarak dirençli kökenlerin oluşumuna neden olur. ^{4, 48}

3.ERG11 geninin aşırı bir şekilde ifade edilmesi

Tüm mantar türlerinde ERG11 lanosterol-14 α -demetilaz enzimini kodlamaktadır. ²¹ ERG11 geninin amplifikasyonu veya daha fazla ifadesi lanosterol-14 α -demetilaz enziminin aşırı üretimine neden olmaktadır. Bu mekanizmanın azollere karşı direnç gelişmesinde kısıtlı etkisi vardır. ^{25, 42}

Flukonazole dirençli *C.albicans* izolatlarında ERG11 geninin aşırı ifadesi saptanmıştır. Bu genin ifadesi hücrelerde enzimin yüksek seviyede üretilmesine neden olmaktadır. Sonuç olarak enzimi inhibe etmek için flukonazolun hücre içinde yüksek yoğunlukta birikmesi gerekmektedir. Kontrol vektörü taşıyan *S.cerevisiae* transformant hücrelere göre ERG11 geninin aşırı bir şekilde ifade edildiği *C.albicans* hücreleri flukonazola karşı 5 kat daha fazla direnç göstermektedir. ²⁵

Candida glabrata suşlarında ERG11 genine ait mRNA seviyelerindeki artış nedeninin flukonazola karşı duyarlılığın azalmasıyla ilişkili olduğu saptanmıştır. *C.albicans* suşlarında ERG11 geninin aşırı bir şekilde ifade edilmesi, gendeki mutasyon kadar olmasa da flukonazola direncin gelişmesinden sorumludur. ²⁵

Ergosterol sentezinde rolü olan enzimleri kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar, direncin gelişimine neden olmaktadır. Bu nedenle mantar hücreleri ergosterol biyosentezinde alternatif yolların kullanılmasına yönlendirilir. Nadir görülen bu mekanizma fungemi geçiren hastalardan izole edilen flukonazole dirençli *C.albicans* suşlarında saptanmıştır. Mantar hücrelerinde membran sterollerinin yapılmasından sorumlu olan delta 5,6-sterol desatüraz (ERG-3) geninde mutasyonların oluşumu, suşların virulent ve hif oluşturma yeteneğinin azalmasına neden olmuştur. ⁴ Dirençli klinik *C.albicans* izolatlarında desatüraz enzimini kodlayan ERG3 genindeki mutasyonun görülmesi, mantarlar tarafından kullanılan alternatif direnç yollarından biridir. ^{4, 53, 54}

4.Efflux pumps (Atım pompaları) mekanizmasını kodlayan genlerin aşırı ifadesi (ekspresyonu).

*Candida albicans*larda hücre yüzeyinde tanımlanmış atım pompaları bulunmaktadır. Bu pompalar, majör kolaylaştırıcılar ve ATP-bağlayan kaset taşıyıcıları olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Majör kolaylaştırıcılar proton gradienti yolu ile, ATP bağlayan kaset sistemi ise ATP hidrolizi yoluyla gereken enerjiyi sağlar. ⁴⁰ Azoller mantar hücresine pasif yayılma yoluyla girer ve membrandan atım pompa mekanizmasıyla atılırlar. Mantar hücreleri içindeki ilacın birikiminin engellenmesi flukonazola karşı dirençten sorumlu olan önemli bir mekanizmadır. ^{55, 56} Membranda ergosterol düzeyindeki azalma veya plazma membranında bulunan fosfatidil klorin ve fosfatidil etanol amin arasındaki oranın azalması nedeniyle membran

fonksiyonları değişmektedir. Bu değişim ilaçların hücre içine girmesini engelleyebilmekte veya atımını arttırmaktadır.³²

ATP bağlayıcı kaset ailesi üyesi olan atım pompaları *Candida* drug resistance (CDR), Multi Drug Resistance (MDR) genleri tarafından kodlanmaktadır.^{57, 58} *C.albicans* mayalarında bugüne kadar en az 7 CDR geni tanımlanmıştır. CDR1 ve CDR2 genlerinin azollere karşı direncin gelişmesine neden oldukları belirlenmiştir.^{32, 59, 60} Azole dirençli mantarlarda, ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları kodlayan genlerin ifadesi duyarlı suşlara göre daha fazladır. Şimdiye kadar dirençli *C.albicans* suşlarında ABC-taşıyıcı genlerinden sadece CDR1 ve CDR2 genleri tanımlanmıştır.^{51,61} CDR1 ve CDR2 genlerinin silinmesi azollere, amorolfine ve terbinafine karşı aşırı duyarlılığa neden olmaktadır.³²

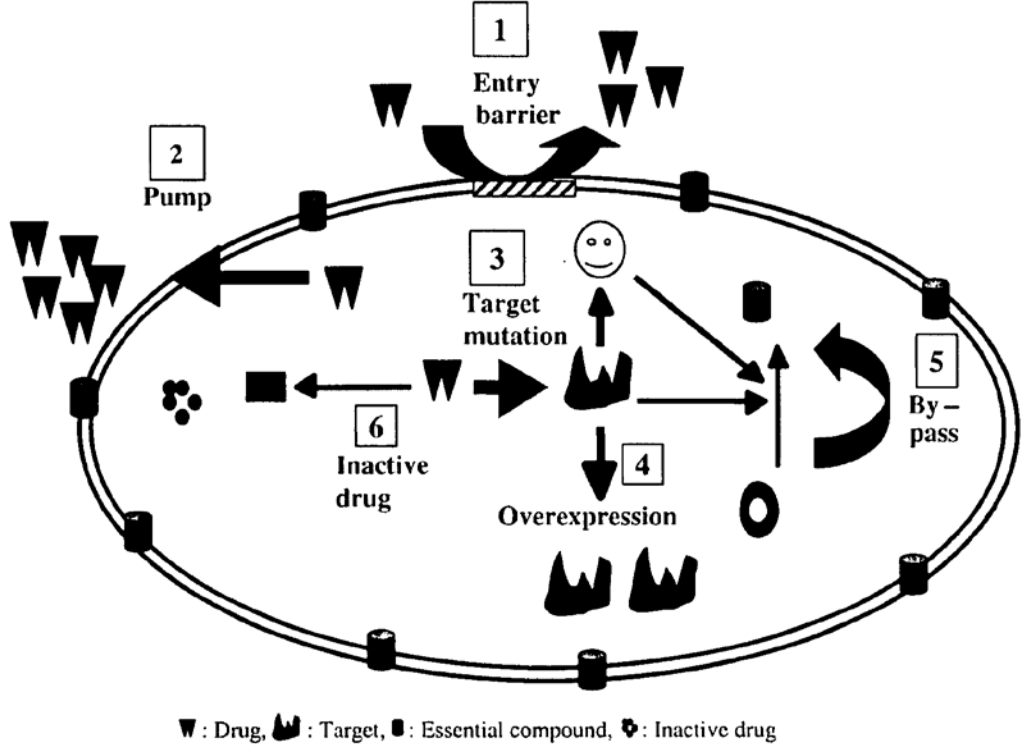
Atım pompalarının tamamını kontrol eden TAC1 geni transkripsiyonel bir aktivatör protein kodlar. ABC taşıyıcı genlerin aşırı ifadesinin yanı sıra bazı dirençli *C.albicans* klinik izolatlarında, majör kolaylaştırıcı ailesine ait olan proteinlerin yanında multidrug taşıyıcı CaMDR1 geninin ve BEN geninin aşırı ifadesi belirlenmiştir.⁵³

Elde edilen dirençli *Candida albicans* kökenlerinden FLU1 olarak adlandırılan yeni bir gen izole edilmiştir.⁶² MDR1 genine benzer FLU1 geni duyarlı transformant *S.cerevisiae* hücrelerinde flukonazola direncin geliştirmesinden sorumlu olmuştur. Ancak klinik *C.albicans* kökenlerinde FLU1 geninin fazla ifadesinin flukonazola dirençten sorumlu olduğu henüz

kanıtlanmamıştır. ²⁵ FLU1 geni amino asit dizilimi açısından CaMDR1 (eski BENr) benzerlik göstermiştir. Klinik olarak izole edilen azollere duyarlı ve dirençli *C.albicans* kökenleri arasında FLU1 ifadesi ile ilgili anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. ⁶²

Tedavi sırasında flukonazole karşı dirençli olan birçok klinik *C.albicans* kökeninde, ilaca karşı direnç ile MDR1 geni arasındaki bağlantı farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Yeni çalışmalara göre, Cdr1p taşıyıcıların sitoplazmik membranın iç tabakasından dışa doğru fosfolipidlenmesi membranın yapısında değişikliğe neden olmuştur. ⁶³

Maya hücre membran yapısının majör bileşeni olan sfingolipitler *S.cerevisae* hücrelerinde saptanmıştır. Plazma membran fonksiyonu için önemlidir ve hücrelerin morfogenez özelliklerini etkileyen faktörlerden biridir. IPT1 geni tarafından kodlanır. Antifungal ilaçlara karşı direncin gelişiminde rolü vardır. Sfingolipitler yapısındaki herhangi bir değişim veya azalma Cdr1p ilaç sızıntı pompasını etkiler ve *C.albicans* türlerinin azollere karşı duyarlılığını artırır. ⁵⁵



Şekil 2: Antifungal ilaçlara karşı direncin moleküler mekanizmaları

- (1) Hücre içine ilacın girmesini engelleyen hücre membranındaki ve/veya hücre duvarındaki değişiklikler,
- (2) İlaçların hücre içinde birikmesini engelleyen atım (efluks) pompaların aşırı ifadesi,
- (3) İlaçların hedefe bağlanmasını engelleyen hedefteki mutasyonlar,
- (4) İlaçların hedefindeki aşırı ifadenmenin ilaçların biyokimyasal reaksiyonlarını inhibe etmesi,
- (5) Sentez yolunda diğer genlerdeki mutasyonlar nedeni ile ilaçların hedef genin ürünü için gerekli olan materyali atlatması,
- (6) İlaçların degrade veya inaktive olması.

2.6. Antifungal Direnç Genlerinin Moleküler Olarak Tanımlaması

Uygun bir tedavi sürecinin başlaması için enfeksiyona neden olan izolatların tür tayini ve duyarlılığının belirlenmesi şarttır. ³⁴ Son çalışmalar, antifungal ilaçlara duyarlılığın değerlendirilmesinde, moleküler yöntemlerin tamamlayıcı test olarak kullanılabilceğini, hatta bazı durumlarda üremeyi esas alan yöntemlerin yerini alabileceğini göstermektedir.⁶⁴ Vajinal veya sistemik kandidoz enfeksiyonlarında azollere karşı direncin gelişimi, az rastlanan bir olaydır. Buna karşın, flukonazole direnç, AIDS hastalarında, orofarengiyal kandidoz için uzun süreli veya tekrarlayan antifungal tedaviler sonucunda sıklıkla gelişebilmektedir. ^{54, 65, 66}

Duyarlılık testlerinin klinik açıdan önemli olduğu, flukonazole dirençli *C.albicans*'ın saptanması ile ortaya konmuştur. Antifungal direncin moleküler yöntemler ile belirlenmesi kültür ve izolasyon gibi zaman alıcı ve zorlu olabilecek basamakları ortadan kaldırmaktadır. Mikrobiyal veya konağa ait artıkların bulunması, yüksek özgüllük ve duyarlılıkta PZR ve hibridizasyon yöntemleri kullanıldığında sorun yaratmayabilir. ^{54, 67, 68}

Antifungal dirençte potansiyel mekanizmaları araştırmak için mantarların tanısında ve identifikasyonunda kullanılan moleküler yöntemlerin birçoğu kullanılmaktadır. Ayrıca antifungal ilaçlara direnç ve duyarlılığı, benzer suşlar arasında farklılığı belirlemede yine çeşitli moleküler yöntemler (RFLP, karyotiplendirme, RAPD ve çeşitli PZR) kullanılmaktadır. ^{69, 70}

Mayalarda antifungal dirençte rol oynayan genleri hedef alan PZR yöntemi basit ve hızlı bir yöntem olarak kullanılabilir. ⁷¹

Polimeraz zincir reaksiyonu genelde 3 aşamayla tamamlanır; çift zincirli DNA kalıbının yüksek ısıda denatürasyonu, hedef primer parçalarının bağlanması ve kalıp DNA zincirinin uzamasıdır. ⁷² PZR tekniği bazen DNA yerine RNA kullanılarak başlatılabilir. Elde edilen genomik RNA önce kalıp DNA'ya çevirmek üzere revers (ters) transkripsiyona uğratılır. Bu PZR işlemine reverz transkripsiyon PZR (RT-PZR) denmesinin nedeni budur. RT-PZR tekniğinde ilk adım (RT), ters transkriptaz retroviral enzimin etkisi ile elde edilen RNA'dan tamamlayıcı tek bir (komplementer) DNA (cDNA) ipliğinin üretimidir. DNA sentezinin başlatılması için bir oligonükleotid primeri gereklidir. Primer RNA'ya bağlanır ve DNA polimeraz enzimin ters transkriptaz etkisi ile mRNA'nın 5' tarafına doğru cDNA uzanır. RT adımı, kantitatif RT-PZR tekniğinde, değişkenliğin kaynağıdır. Elde edilen cDNA ikinci aşamada klasik PZR işlemi ile çoğaltılır. RT-PZR gen ifadesinin kantitatif ölçümü için yararlı bir yöntemdir. Duyarlı ve çok küçük miktarlardaki RNA geninin ifadesini analiz etmek için idealdir. ^{72, 73, 74, 75}

2.7.Mantarlarda Plazmidler

Plazmidler canlı hücrelerde bulunan, çoğalabilen küçük ekstragenomik DNA molekülleridir. Çekirdekten ayrı olarak çoğalırlar fakat bazen DNA genomuna kovalent olarak bağlı olabilirler. ⁵ Mayalarda lineer ve sarmal plazmidler gösterilmiştir. Plazmidler mayaların çevreye adaptasyonu

ve memeli hücrelerde canlı kalmaları için önemlidir. Plazmidin kopya sayısı maya hücrelerinin üreme hızına bağlıdır. Tanımlanan lineer plazmidler; DNA polimeraz, RNA polimeraz veya ikisini birden kodlamaktadır. Bazen lineer ve dairesel plazmidler bir arada görülebilir. Filogenetik ağaç analizi aracılığı ile organizmalarda rRNA genleri kromozom dışındaki moleküllerde saptanmıştır.

76

Bazı mantar türlerinde bağımsız kopyalanan (Autonomously replicating sequences) diziler (ARs) saptanmıştır. Bu diziler integratif transformasyon protokollerinin geliştirilmesinden sonra tanımlanmıştır. Buna benzer dizileri taşıyan vektörler kolay aktarılabilir ve gen klonlamasını kolaylaştırır. Plazmidler ve diğer aktarılabilen genetik elemanlar *Saccharomyces cerevisiae* türü mayalarda bulunmaktadır. Bu maya genetik madde aktarımında model organizmadır. Plazmidler, *C.albicans*larda da vardır, fakat *S.cerevisiae*'de bulunan plazmidlere göre daha az stabildir. ⁷⁷ Maya hücrelerinde bulunan plazmidler filamentöz mantarların plazmidlerinden farklıdır. Maya plazmidleri çekirdekte ve sitoplazmada bulunmuştur. Filamentöz plazmidler ise mitokondri içindedir. ⁵

Kromozom ve plazmid DNA' ları alkali ortamda denatüre olur, pH nötr hale geldiğinde hızla renatüre olurken kromozom DNA'sı tek zincirli formda kalacaktır. Bu özellik, plazmid DNA'sının izolasyonunda kullanılan yöntemlerin temelini oluşturmaktadır. ⁷⁸. Maya hücrelerinde gen aktarımı için vektör olarak kullanılan ColE1 DNA plazmidi maya kromozomuna integre olabilir. Bu integrasyon eklenme şeklinde (additive) veya yer değiştirmek

şeklinde olabilmektedir. Bazı çalışmalara göre aktarılan diziler, kromozomun farklı yerlerine integre olabilmektedir.⁷⁹

2.8. Transformasyon

Moleküler biyolojide transformasyon bir hücrenin içine yabancı bir DNA'nın girmesi, bu DNA'nın genomun parçası hâline gelmesi ve aktarılan genlerin ifadenmesi sonucu, hücrenin değişime uğraması olarak tanımlanmaktadır. DNA'nın hücre içine girmesi bir virüs aracılığı ile olursa buna **transdüksiyon**, bakteri hücrelerinin birbiri ile teması sonucu birinden diğerine aktarılması sonucu oluyor ise **konjugasyon** denmektedir. Doku kültüründeki hücrelerin transformasyonuna ise **transfeksiyon** denmektedir.⁸⁰ Sifat olarak "transformasyona uğramış" anlamında, "transforme" terimi kullanılmaktadır. Hücre içine RNA da aktarılabilir. Bu aktarım sonucunda hücrenin özellikleri geçici olarak değişebilir. Ancak hücrede kalıtsal bir değişiklik meydana gelmediği için, bu aktarım gerçek bir transformasyon olarak kabul edilmez.⁸⁰ Transformasyonda hücre yüzeyinde oluşan bozulma eksojen DNA'nın hücre içine girebilmesine olanak sağlar.⁸¹

2.9. Mantarlarda Transformasyon

Transformasyon ilk defa 1928'de, bakteriyel pnömoniye karşı bir aşı bulmaya çalışan bir İngiliz bakteriyolog olan Frederick Griffith tarafından uygulanmıştır. Griffith *Streptococcus pneumoniae*'nin ısıtıldığında virülansının

değiştiğini göstermiştir. Virülan olmayan bakteri ile virülan bakteri karıştırıldığında zararsız bakterinin virülan hâle dönüştüğünü göstermiştir. 1944'te bu dönüştürücü faktörün DNA olduğu Oswald Avery, Colin MacLeod, ve Maclyn McCarty tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacılar DNA'nın bakterilerin içine alınması ve onunla bütünleşmesine **transformasyon** adını vermişlerdir.⁸⁰

Mantarlarda genetik transformasyon ilk defa Oppenorth tarafından 1960 yılında *Saccharomyces cerevisiae* mayalarında gerçekleştirilmiştir. Khan ve San tarafından birkaç maya türüne DNA aktarılmasıyla ilgili kapsamlı bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde farklı maya kökenleri arasında DNA parçaları aktarılmış ve oluşan koloniler fenotipik olarak değerlendirilmiştir. En iyi transformasyon için DNA hücre duvarı ve plazma zarından geçebilmeli ve sitoplazmayı aşarak çekirdeğe ulaşmalıdır.⁸² Transformasyon yolu ile aktarılan bakteri genleri maya genomu içinde "Mendel Kuralları"na uyan kalıtsal bileşenler olarak görülebilir.⁷⁹

Case ve arkadaşları mantar hücrelerini sferoplast haline çevirerek aktarılan DNA'yı alabilmelerinin mümkün olduğunu göstermişlerdir. Yüksek yoğunlukta lityum iyonları kullanılarak mantarların hücre duvarının geçirgenliği artırıldığında DNA parçalarını almaları sağlanmaktadır.⁸³ Aktarılan genlerin kopya sayıları transformasyon sonuçlarını etkilemektedir. Gen kopyası çok olunca transformasyonun etkinliği azalmaktadır. Bakterilerde ve mayalarda yapılan transformasyon çalışmaları küflere oranla daha fazladır.⁸⁴

Saccharomyces cerevisiae transformasyonu için kullanılan yöntemler *C.albicans* hücrelerinde de uygulanmıştır. Fakat hücre duvarı sert olduğu için protokolde bazı değişiklikler yapılmıştır. ARS dizisine bağlı plazmid vektörleri kullanılarak transformasyon yeterliliği 10^3 transformant/ μg DNA'ya kadar artmıştır. Gen aktarımı deneylerinde birden fazla plazmid vektörü kullanılabilir. ²⁶

Lityum asetat ve sferoblast transformasyon yöntemlerinin *C.albicans* için sınırlı düzeyde etkili oldukları saptanmıştır. Hızlı ve kolay bir yöntem olan lityum asetat yöntemi ile *C.albicans* suşlarında düşük transformasyon (50-100 transformant / μg DNA) başarısı gösterilmiştir. Sferoblast yöntemi ile daha iyi (300 transformant / μg integratif DNA ve 10^3 - 10^4 transformant / μg replikatif DNA) sonucu elde edilmiştir. Son yıllarda *S.cerevisiae* gibi birçok maya türüne uygulanan elektroporasyon transformasyon yöntemi diğer iki yönteme göre daha hızlı ve kolay bir yöntem olarak değerlendirilmiştir. Elektroporasyon yöntemiyle *C.albicans* kökenlerinde gen aktarımı yaklaşık 250 transformant / μg DNA değerinde saptanmıştır. ⁸⁵

Saccharomyces cerevisiae hücrelerinde ARS dizilerini içeren vektörler ile yüksek oranda aktarım yapılabilmektedir fakat bu diziler hücre içinde stabil değildir. ⁸⁶ Genelde transformasyon için kullanılan plazmidler prokaryot hücrelerde bulunmaktadır. Doğal plazmidler mayalarda ve diğer mantar türlerinde saptanmıştır. Organizmaya bağlı, kromozom dışındaki DNA molekülleri dairesel veya lineer şekilde, sitoplazmada, mitokondri veya çekirdekte görülebilir. ⁷⁶

2.10. Transformasyon Yöntemleri

2.10.1. Sferoblast yöntemi

Mayalarda sferoblast elde etmek için hücre duvarının enzimatik uygulama ile ortadan kaldırılması yöntemi ilk defa Eddy ve Williamson tarafından 1957 yılında bildirilmiştir.⁸⁷ Sferoblast oluşturulması için tuzlu karışımlar, ısı ve soğuk uygulaması, proteinaz K, litalaz gibi enzimler kullanılabilir. Sferoblast oluşmasında polietilen glikol (PEG) kullanımı 1974 yılında Kao ve Michayluk tarafından bildirilmiştir. Maya hücre karışımının bir süre bu maddelerden biri içinde bekletilmesi hücre yapısını bozacak ve sferoblast oluşmasını sağlayacaktır.^{88, 89}

2.10.2. Lityum asetat transformasyon yöntemi

Transformasyon yöntemi PEG, lityum asetat (LiAc) ve soğuk şok aşamalarını içerecek şekilde standart hale gelmiştir. 1991 yılında, Moerscheu ve arkadaşları LiAc transformasyon protokolünü açıklamıştır.⁹⁰ Triton x-100 veya diğer deterjanlarla ve Li⁺ gibi metal iyonlar ile karşılaşmış maya hücreleri plazmid DNA'yı alabilmektedir. Transformasyon deneylerinde kullanılan tüm katyonlar arasında LiAc en etkili katyon olarak ayrılmaktadır. Lityum ve PEG kullanılarak dairesel ve lineer plazmid DNA'lar aktarılabilir.^{91, 92}

Tek iplikçik DNA (ssDNA) kullanılarak transformasyon verimliliği 2-5 kat daha artmıştır. LiAc ile yapılan transformasyon karışımına buzağı timusu, somon balığı spermi veya *E.coli* taşıyıcı DNA molekülleri eklenerek, aktarılacak DNA çekirdek enzimlerinin etkisinden korunabilir. ^{90, 93} Çift iplikli DNA ile transformasyon verimliliğinin tek iplikli DNA'ya göre 2-5 kat daha az olduğu belirlenmiştir. ⁸²

Lityum asetat protokolü için PEG gereklidir, ısı şoku transformasyon verimliliğini arttırmaktadır ve hücreler logaritmik büyüme evresinin ortasında olduklarında ($OD_{610} = 1.6$) en yüksek verimlilik elde edilmiştir. Bu yöntem hızlıdır ve sferoblast yöntemine göre daha kolaydır. Özel ekipmana ihtiyacı yoktur ve giderek daha yaygın kullanılmaktadır. ⁸² *C.albicans* için gen aktarımı yöntemleri içinde LiAc yöntemi, mevcut olan en güvenilir ve kolay yöntemdir. ⁹⁴

2.10.3.Elektroporasyon yöntemi

Elektrik alanlara maruz kalma ile nükleik asitlerin geçirgen ökaryot hücrelere girmesi, artık yaygın olarak kullanılan bir tekniktir ve elektroporasyon olarak adlandırılmaktadır.¹⁷ Elektroporasyon ilk defa Neumannf ve arkadaşları tarafından fare hücrelerinde kullanılmıştır. Mantarlarda elektroporasyon Hashimoto ve arkadaşları tarafından *S.cerevisiae* hücreleri üzerine uygulanmıştır. Elektroporasyon işlemi elektrik alan oluşturan bir cihaz yardımı ile yapılmaktadır. ⁹⁰

Yapılan çalışmalarda en başarılı sonuçların alınması için voltajın 900 V civarında olması gerektiği, aktarılan hücrelerin logaritmik evrenin başında olması gerektiği ($OD_{600} = 0.3- 1.0$), hücre yoğunluğunun $OD_{600} = 10-20$ olması gerektiği belirtilmiştir. Aktarılması istenilen plazmid 0.1 μg miktarında olmalı ve taşıyıcı DNA gerekli değildir.

Günümüzde geniş bir şekilde hayvan hücreleri, bitki hücreleri ve bazı araştırma laboratuvarlarında bakterilerde transformasyon için standart olarak elektroprasyon kullanılmaktadır. Bu yöntemde uygulanan elektrik akımı ile hücre membranında makro moleküllerin geçişine izin veren geçici gözeneklerin oluşumu sağlanmaktadır. ^{95, 96}

Elektroporasyon yönteminde alanın kuvveti “field strength (kv/cm)”, kapasite “capacitance (μF)” ve direnç “resistance Ω ” değişkenlerdir. Bu birimler her protokol için farklıdır. Elektroporasyon yöntemi diğer yöntemler olan LiAc/ssDNA/PEG ve sferoblast yöntemlerine göre daha hızlıdır. Sarf malzemesi gerektirmemesine rağmen, elektropratr cihazının maliyeti nedeniyle pahalı bir yöntemdir. ^{90, 97}

Elektroporasyon, canlı hücrelerin hızla değişmesine neden olan bir yöntemdir. Yüksek ve güçlü bir elektrik alan kullanarak canlı hücrelerin zarlarında geçici gözeneklerin açılmasını sağlamaktadır. Oluşan gözenekler birbirine yakın hücrelerde meydana gelirse füzyonu kolaylaştırır. Ayrıca bu gözenekler var oldukça difüzyon ve hücre içi ve hücre dışı bileşenlerin değişimi gerçekleşebilmektedir. ^{98, 99, 100}

Elektroporasyon yönteminde önce transformasyon karışımındaki DNA hücre yüzeyinde birikir, elektrik akımının hücre zarında oluşturduğu gözeneklerden plazmid DNA hücre içine girer. Yüksek verimli transformasyonlarda, yaklaşık % 5 transformant maya hücresi elde edilebilir.

90

2.10.4. Cam boncukları kullanarak Transformasyon yöntemi

Cam boncukları kullanarak maya hücrelerine taşıyıcı ve plazmid DNA'nın aktarılması 1988 yılında Costanzo ve Fox tarafından rapor edilmiştir. 0.39, 0.45- 0.52 mm çapında olan Steril cam boncukları, transformasyon karışımına eklenir. Vorteks yapıldıktan sonra maya hücrelerini içeren süpernetant 1.0 M sorbitollu seçici besiyerine ekim yapılır. Elektroporasyon yöntemi gibi hızlı fakat transformasyon verimliliği düşük bir yöntemdir.

Costanzo ve Fox, taşıyıcı DNA ve düşük transformasyon verimliliği gösteren plazmid DNA (yaklaşık 300 transformant/ µg plazmid DNA) varlığında, cam boncukları kullanarak bozulmamış *S.cerevisiae* hücrelerinin aktarıldığını göstermişlerdir. Kullanılan seçici katı besiyerinde ozmotik destek (1.0 M sorbitol) gerekmektedir.⁸²

2.10.5. Biyolistik yöntemi

Biyolistik transformasyon yöntemi ilk kez bitki hücreleri için uygulanmıştır. 1988 yılında maya hücreleri için de kullanılmıştır ^{61, 66}. Biyolistik yöntemde bir çeşit bombardıman yapılmaktadır. Biyolistik yöntemde çeşitli metaller kullanılmış, bunlar arasında tungsten (W) en etkili metal bulunmuştur. ⁸²

Maya hücreleri sıkıştırılmış helyum kullanılarak 0.5 µm altın veya tungstenle kaplı DNA bombaları ile patlatılır. Bu yöntem ile mitokondriyal genler aktarılabilir. Mayalarda mitokondriyal genlerin başarılı olarak aktarılması için tek bir biyolistik protokol uygulanabilir. Bu yöntem, hücrelerin özelliğine bağlı değildir. ⁹⁰

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

- Etüv (Elektro-mag, Türkiye)
- Derin dondurucu, -20 °C (Bosch, Almanya)
- Derin dondurucu, -80 °C (Sanyo, Japonya)
- Otoklav (Sanyo, Japonya)
- Vorteks cihazı (VELP, Scientifica, Almanya)
- Mikrosantrifüj (Heraeus, Almanya)
- 0,5-1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpleri (Greiner Bio-One, Almanya)
- pH metre (Fisher Scientific, ABD)
- Çalkalayıcı (Elektro-mg, Türkiye)
- DNA-RNA ölçüm cihazı, Nanodrop (Thermo Scientific, ABD)
- Hassas terazi (Libror AEG-220, Japonya)
- Mikropipetler ve uçları (Expell, Meksika- Beta Pette™, ABD)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Sınıf 2 biyogüvenlik kabini (Metis biyoteknoloji, Türkiye)
- Işık mikroskobu ve dijital fotoğraf makinesi CX31 (Olympus, Japonya)
- Santrifüj cihazı (BOECO, Almanya)
- Mikrosantrifüj (Beckman Coulter, Almanya)
- Transfection System, Elektroporasyon cihazı (Neon™ Invitrogen, ABD)
- ABI 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ABD)

3.1.2. Maya kökenleri

Candida albicans ATCC 10231 flukonazole duyarlı referans köken olarak kullanılmıştır. Atım pompası (CDR) mutant kökenler İsviçre Lousanne Üniversitesi'nden Dominique Sanglard tarafından bağışlanmıştır.

Tablo 1: Dirençli mutant kökenler ve Duyarlı kökenler

Kökenler	Flukonazol MİK değeri	CDR1/CDR2	ERG11 Mutasyonları
296, dirençli	128	X	S464S, G129A
289, dirençli	128	X	S405F, Y123H
735, dirençli	64	X	S450F
284, dirençli	32	X	S405F
2323, dirençli	32	X	G464S
775, dirençli	128	X	S405F
2321, duyarlı	0.25		
731, duyarlı	0.25		

klirik örneklerden izole edilen *Candida albicans* kökenleri arasından seçilen toplam (13) duyarlı ve dirençli kökenlerin tür tanımlamaları germ tüp testi ve mısır unu tween 80 agarda klamidospore oluşturmaları esasına dayanarak yapılmıştır. Duyarlı ve dirençli *C. albicans* kökenleri ayrıca Can1 primerleri (5' CCT-GTT-TGA-GCG-TCR-TTT 3', 5' TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT 3') kullanılarak tür düzeyinde PZR ile tekrar tanımlanmışlardır.

Kökenlerin flukonazole duyarlılık durumları Clinical Laboratory Standards Institution (CLSI) referans mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak M27-A3 dökümanına göre yapılmıştır.

3.1.3. Bakteri kökenleri

Escherichia coli ATCC 10536, klinik olarak izole edilen ampisiline dirençli *E.coli* kökeni.

3.1.4. Kimyasallar ve besiyerleri

1. Sabouraud glukoz agar (pH 5.6) (Fluka Biochemika, İsviçre)

Pepton 10 gr/L
D (+) Glukoz 20 gr/L
Agar 17 gr/L
Distile su 1000 mL

2. YPAD Broth (Sigma-Aldrich, WGK Almanya):

Bakteriyolojik pepton 20 gr/L
Pepton 20 gr/L
Maya ekstraktı 10 gr/L
Glukoz 20 gr/L
Distile su 1000 mL

3. YPAD Agar (Sigma-Aldrich, WGK Almanya)

Adanine sulfat 0.04 gr/L
Maya ekstraktı 10 gr/L
Pepton 20 gr/L
Dekstroz 20 gr/L
Distile su 1000 mL

4. Nutrient Agar (HIMEDIA, India):

Peptin ile sindirilmiş hayvan dokusu	5gr/L
Sığır eti ekstraktı	3 gr/L
Agar	15 gr/L
Distile su 1000 mL	
Son pH (25°C)	6.8±0.2

5. Mueller Hinton Agar (HIMEDIA, India):

Sığır eti infüzyonu	300 gr/L
Kazein asit hidrolizat	17.50 gr/L
Nişasta	1.50 gr/L
Distile su 1000 mL	
Final pH (25°C)	6.8±0.2

6. Morpholino propano sulponic acid (MOPS, Sigma, ABD)

7.1640 RPIM medium (1X) + 2.05 Mm L-Glutamine (HyClone , ABD)

8. Agar toz (Himedia, India)

9. Flukonazol (Pfizer, ABD)

10. High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Almanya)

11.1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PZR (AMV) (Roche, Almanya)

12. Elektroporasyon kiti, Transfection System 10 µL lik, serial no 2 (invitrogen, ABD).

Kullanılan solüsyonların hazırlanması

Mayalarda transformasyon için kullanılan solüsyonlar

1. Lityum asetat (1.0 M):

5.1 gr lityum asetat dihidrit (Sigma-Aldrich, Almanya)
50 ml su, otoklavlanır ve oda ısısında saklanır.

2. PEG MW 3350 (%50 w/v):

50 gr polyethylen glycol (Sigma-Aldrich, Almanya) 30 ml distile suyla karıştırılır sonra 100 ml'ye tamamlanır, otoklavlanır ve oda ısısında saklanır.

3. Single-Stranded carrier DNA (2.0 mg/ml) :

200 mg salmon sperm DNA (Deoxyribonucleic Acid, Low Molecular Weight from Salmon Sperm -DNA-) Fluka, Germany.

100 ml TE buffer 4 °C derecede bir gece çalkalayıcıda bekletilir.
Sonra -20°C derecede saklanır, transformasyondan önce inaktive edilir.

4.Transformasyon karışımı(TM):

PEG MW 3350	(%50 w/v)	240 µL
Lityum asetat	(1.0 M)	36µL
Single-Stranded carrier DNA	(2.0 mg/ml)	50µL
Plazmid DNA (100ng)+distile deiyonize su		

Toplam hacim:

360 µl

Bakterilerde transformasyon için kullanılan solüsyonlar

1. Solüsyon I: 10 ml hazırlamak için,
 - 0.5 ml % 20 Glukoz
 - 0.4 ml EDTA (Ethylen Diamin Tetra Acetic Acid), 0.25 Molar, pH 8
 - 0.25 ml (Hydroxyl methyl) amino methane Tris- HCL, 1 Molar, pH 8
 - Distile suyla 10 ml'ye tamamlanmıştır.
2. Solüsyon II:
 - 0.2 ml NaOH, 10 Mol
 - 1 ml % 10 Sodium dodesyl Sulphae (SDS)
 - 8.8 ml distile su
3. Solüsyon III (3M Sodyum Asetat. 3H₂O):
 - 204 gr Sodyum Asetat
 - 250 ml su
 - Glaciyal Acetic Acid ile pH 4.8
 - Distile su ile 500 ml'ye kadar tamamlanmıştır.
4. Potasyum asetat 5M CH₃ COOK:
 - 29.4 gr potasyum asetat 60 ml distile suyla içinde çözülüp,
 - 11.5 ml Glacial Acetic Acid
 - 58.5 ml distile su
 - pH 4.2 şeklinde ayarlanır ve soğutulup kullanılmıştır.

5. Lysozyme solüsyonu (Stock):

50 mg saf lysozyme enzim (Amresco, ABD) 1 ml distile suda çözülür, -20°C derecede saklanmış ve 20 µg/ml son konsantrasyon olarak kullanılmıştır.

6. Tris – EDTA (TE) Buffer:

1 ml HCL-Tris, 1 Mol, pH 8

0.4 ml EDTA, 0.25 Mol, pH 8

100 ml distile suyla tamamlanmıştır.

Komplimenter DNA (cDNA) ekstraksiyonu için kullanılan lökosit parçalama tamponu (LPT) hazırlanması

TRIS	10 mM
EDTA	10 mM
Sodium Chloride	50 mM
SDS	%2

Elektroforezde kullanılan 5 x depo TBE (Tris-Borik asit-EDTA) solüsyonu

54 g Tris- Base (Ambresco, ABD)

27.5 g Boric Acid (Merck, Almanya)

20 ml (0.5 M) EDTA (pH 8.0) (Sigma, Almanya)

Erlenmayer içinde distile su ile tüm hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 5x depo solüsyonu agaroz jelin hazırlanmasında ve yürütme tamponu olarak 1x' e çevrilerek kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1a. Kökenlerin Toplanması

Candida albicans kökenleri, SDA besiyerine ekilip 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 0.5-1.0 mm çapında bulunan koloniler direkt mikroskopi ve gram boyası ile incelendikten sonra deneylere geçilmiştir.

3.2.1b. Antifungal İlaçların Hazırlanması

Flukonazol'ün etken maddesi CLSI standardına uygun olarak su içinde çözülmüş ve istenilen final konsantrasyonlara göre sulandırım yapılmıştır. Flukonazol için 128-0.25 µg/ml ~~arasındaki~~ sulandırımlar kullanılmıştır.

3.2.1c. Antifungal Duyarlılık Testi (Mikrodilüsyon yöntemi)

Antifungal duyarlılık testi CLSI önerilerine uygun olarak M27-A3 mikrodilüsyon yöntemi ile yapılmıştır. L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren RPMI 1640 besiyerinin (Thermo) pH'sı, 0.165 M MOPS kullanarak 7.0'ye

ayarlanıp her kuyucuğa 100 µl besiyeri dağıtılmıştır. Üreyen kolonilerden steril distile su kullanılarak McFarland 0.5'e uygun bulanıklıkta hazırlanan süspansiyonlardan 10 µl eklenmiştir. Plaklar 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiş, okuma, bir okuma aynası yardımı ile yapılmıştır. MİK değeri ilaçsız kontrol kuyucuğunda üremenin %50 oranında azaldığı kuyucuktaki antifungal konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Bakterilerden Plazmid DNA Eldesi

Mantarlarda plazmid izolasyonu yapmadan önce bakterilerde plazmid izolasyonu yapılmıştır. Bakterilerde genetik transformasyonu denemek amacıyla önce klinik olarak izole edilen ampisiline dirençli *E.coli* kökeninden alkali lizis yöntemi kullanılarak plazmid DNA'sı elde edilmiştir.¹⁰¹

Aktarılması istenilen (Ampisilin direncinden sorumlu) geni taşıyan plazmid DNA'yı elde etmek için önce ampisiline karşı dirençli olan *E.coli* kökeni ampisilin içeren nutrient sıvı besiyerinde üretilmiştir.

1. Sıvı besiyeri 37°C'de çalkalanarak (80 devir /dk) 24 saat inkübe edilmiştir.
2. Bakteri hücreleri 8000 devirde 10 dk santrifüj edilmiştir.
3. Hücre çökeleğine 2 ml solüsyon 1'den ve lizozim enziminden (50 mg/ml) 0.1 ml eklenmiş, oda ısısında 10 dk bekletilmiştir.
4. Sonra 4 ml solüsyon II'den eklenip vortekslenmiştir. Buzda 10 dk karıştırılarak bekletilmiştir.

5. Sonra 3 ml 5 molarlık soğutulmuş potasyum asetat solüsyonundan eklenmiş, 10 dakika buzda bekletilmiştir. 8000 devirde 10 dk santrifüj edilmiştir.
6. Solüsyona eşit miktarda kloroform-Isoamilalkol (24:1) solüsyonunda eklenmiş, karıştırılıp 8000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşama birkaç kez tekrarlanmıştır.
7. Üstte oluşan sıvı tabaka temiz tüpe aktarılmıştır. Solüsyon III ve 3 molarlık sodium asetat (pH 4.8) 10/1 hacminde karıştırılmış ve eklenmiştir.
8. Oluşan tabakanın iki misli % 96 etanol eklenmiştir. Karışım -20 °C derecede 40 dakika bekletilip, 8000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılıp çökelti 5 ml % 70 etanol ile yıkanmıştır.
9. Çökelti kurutulup, elde edilen plazmid DNA çökeleğine 0.5 ml TE buffer eklenmiştir. Elde edilen bakteri plazmid DNA miktarı nanodrop cihazıyla ölçümü yapılmıştır.

3.2.3. Mayalardan Plazmid DNA Eldesi

- a. Örneklerden plazmid elde edilmesi için Zymoprep I™ Yeast Plazmid Mini preparation Kiti kullanılmıştır.

Maya hücreleri 30°C derecede YPD sıvı besiyerinde veya seçici besiyerinde üretilmiştir.

1. Koloniden 0.5-1.0 ml 1.5'lük epandorfa alınır ve maya hücreleri 2 dakika 600 hızda çökeltiip süpernatant atılmıştır.

3. Solüsyon 1'den 150 ml çökeltiye eklenmiştir.
4. Zymolyase enziminde 2 µl eklenip, vortekslenmiştir.
5. 37 C° derecede 15-60 dakika inkübe edilmiştir.
6. Solüsyon 2'den 150 µl eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.
7. Solüsyon 3'ten 150 µl eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.
8. Örnekler 2 dakika en yüksek hızda çevirilmişdir.
9. Süpernetant yeni tüplere aktarılıp 400 µl İsoopropanol (2-propanol) eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.
10. En yüksek hızda 8 dakika çevirilip süpernatant atılmıştır. Spin yapıp üste kalan sıvı atılmıştır. Plazmid DNA çökelti'ye 35 µl TE buffer'dan eklenmiştir.

Bu yöntem ile elde edilen DNA plazmid *E.coli* transformasyonunda, PZR reaksiyonunda kullanılabilir.

b. Plazmid İzolasyonu için "Easy Yeast Plasmid Isolation" Yöntemi

Plazmid izolasyonu için Easy Yeast plazmid Isolation (Clontech, United state/ Canada) kiti de kullanılmıştır. Bu kitteki protokole göre zimolaz enzimini kullanarak maya hücre duvarları bozmuş sonra elde edilen

sferoblastlar üzerine SDS/alkaline lizisi uygulanmıştır. Plazmid DNA spin kolon ile saflaştırılmıştır.

A. Kullanmadan önce kitte bulunan Y1 resüspansiyon tamponundan 1 ml alınmıştır ve RNaz A solüsyonuna ilave edilmiştir, vortekslenmiştir. Sonra 1 ml de çözülen RNaz tekrar Y1 tamponu içeren tüpe aktarımıştır. Y1 tampon/RNaz A solüsyonu +4 C° de 6 ay saklanabilir. % 96-100 etil alkolden 24 ml Y4 yıkama tamponuna eklenmiştir ve oda ısısında saklanmıştır.

B. Maya hücre duvarını bozmak için:

1. Kökenin içerdği plazmid DNA'ya uygun seçici besiyerinde 1 cm x 1 cm kare şeklinde ekimi yapıp ve 30 C° de 3 gün inkübe edilmiştir.

2. Temiz pipet ucuyla veya öze ile kare şeklinde üreyen maya hücrelerin yarısı (10 mg den daha fazla olmamalıdır) ve 500 µl 10 Mm EDTA içeren 1.5 ml lik epandorfta süspansiyon hale getirilmiştir.

3. Hücreler 11,000 x g devirde 1 dakika santrifüj edilir, süpernatant atılmıştır.

4. Hücre pelletleri 200 µl ZYM tamponla tekrar homojenize bir süspansiyon hale getirilmiştir.

5. Hücrelere 20 µl zimolaz enzim süspansiyonundan eklenmiş iyice karıştırılmıştır.

6. 30°C de çalkalayıcı etüvde 1 saat inkübe edilmiştir.

7. Oluşan sferoblastlar 2000 xg devirde 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.

C. SDS/alkalin lizis ve spin kolon ile plazmid DNA'nın saflaştırılması:

1.Sferoblastlar 250 µl Y1 tampon/RNaz A solüsyonda süspanse edilmiştir.

2. Süspansiyona 250 µl Y2 lizis tamponundan eklenmiş ve tüpler 6-8 defa çevrilerek karıştırılmıştır. Vorteks yapılmaz, oda ısısında 5 dakika bekletilmiştir.

3. Y3 nötralizasyon tamponundan 300 µl eklenmiş ve tüpler 6-8 defa karıştırılmıştır.

4. Süspansiyon 11.000 xg devirde 5 dakika oda ısısında santrifüj edilmiştir. Süpernatant temiz ependorfa alınmış ve bu aşama iki kere tekrar edilmiştir.

5. Elde edilen süspansiyon 2 ml lik ependorflara yerleştirilmiş olan Yeast Plazmid Spin kolon tüplere aktarılmış, 11.000 xg devirde 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüplerindeki sıvı atılmıştır.

6. Spin kolon tekrar 2 ml lik tüplere yerleştirilmiştir. Üzerine 450 µl yıkama tamponundan eklenmiştir. 11.000 xg devirde 3 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı atılır, yıkama tamponunu tamamen kaldırmak için bir daha santrifüj tekrarlanmıştır.

7. Spin kolon tüpleri temiz 1.5 ml lik ependorflara yerleştirilmiş, üzerine 50 µl YE Elution tamponundan eklenmiştir. Oda ısısında 1 dakika bekletilmiştir. En son 11.000 xg devirde 1 dakika santrifüj edilmiştir.

8. Elde edilen plazmid DNA' dan 3 µl miktarında transformasyon deneylerinde kullanılmıştır.

3.2.4. Mayalardan DNA Eldesi

Örneklerden DNA elde edilmesi için ısı ve proteinaz K kullanılan bir izolasyon yöntemi ile Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (FKİ) saflaştırma yöntemi kullanılmıştır.

DNA izolasyonu için 100 mg/ml proteinaz K içeren parçalama tamponundan (TRİS 10mM, EDTA 10mM, NaCl 50mM, SDS %2) 100 µL eklenmiş ve 65C'de 2 saat bekletilmiştir. Proteinaz K'nın etkisizleştirilmesi için tüpler 95C'de 5 dakika bekletilmiştir. Tüpler 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, DNA içeren üst sıvı, çökeleğe dokunmadan temiz tüpe alınmıştır. Elde edilen DNA'nın saflaştırılması için ise fenol-kloroform-izoamil alkol (FKİ) yöntemi kullanılmıştır. DNA içeren 100 µL sıvı üzerine, 150 µL FKİ (25:24:1) eklenmiş ve vortekslenmiştir. Tüpler 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvı dipteki bulanık çökeltiye dokunmadan, temiz tüplere alınmıştır. Üzerine 200 µL kloroform-izoamil alkol (Kİ) (24:1) eklenmiş ve vortekslenmiştir. Tüpler 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvı dipteki bulanık çökeltiye dokunmadan, tekrar temiz tüplere alınmıştır. Bu aşamada alınan her 50 µL üst sıvı için 125 µL (1:2.5) %100'lük etil alkol eklenmiştir. Tüpler DNA'nın çöktürülmesi için 14.000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Bu defa üst sıvı uzaklaştırılmış, çöken DNA üzerine 200 µL %70 lik etil alkol eklenmiştir. Yıkama ikinci defa tekrar edilmiştir. Tüpler son kez 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve kurumaya bırakılmıştır. Çökelek kuruduktan sonra üzerine 30 µL Tris ve EDTA (TE) ile hazırlanan örnek çözme tamponu eklenmiştir. DNA +4C de bir hafta, -20 veya -80⁰C'de 6 ay saklanmıştır.

3.2.5. Mayalardan RNA Eldesi

Örneklerden RNA elde etmek için (ZYMO RESEARCH) ZR Fungal/Bacterial RNA MiniPrep™ Kiti kullanılmıştır. Bu kitle, maya hücre kültürlerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA örnekleri cDNA eldesinde kullanılmıştır. Başlamadan önce kitte bulunan RNA yıkama tampona 48 ml % 100 etanol eklenmiştir.

1. Temiz tüp içinde taze veya donmuş hücrelere 800 ml RNA Lizis tamponu eklenmiş ve karıştırılmıştır.
2. Süspansyon haline getirilmiş maya hücreleri kitte bulunan 2 ml'lik boncuk içeren ZR Bashing Bead™ Lizis tüplerine aktarılmıştır.
3. ZR Bashing Bead™ Lizis tüpleri $\geq 12,000$ xg de 1 dakika çevirilmiştir.
4. Elde edilen süpernatanttan 400 ml toplama tüplerine yerleştirilen Zymo-Spin™ IIC kolon tüplerine aktarılmıştır. Tüpler 30 sn 8,000 x g'de çevirilmiştir.
5. Santrifüj edildikten sonra toplama tüplerde biriken sıvıya 320 ml % 100 etanol eklenmiş ve karıştırılmıştır.
6. Karışım temiz toplama tüplerine yerleştirilmiş olan Zymo-Spin™ IIC kolon tüplerine aktarılmış ve 12,000 x g'de 30 sn santrifüj edilmiştir.

7. Toplama tüplerde biriken sıvı atılmıştır. Zymo- Spin TM III C kolon tüpler temiz toplama tüplerine yerleştirilmiştir. Üzerine 400 µl RNA Prep Tamponundan eklenmiş ve tüpler 12,000 x g'de 1 dakika çevirilmiştir.

8. Kolonlara 800 µl RNA yıkama tamponu eklenmiş 12,000 x g'de 30 saniye santrüfjü edilmiştir. Toplama tüplerinde biriken sıvı atılmış ve Zymo- Spin TM III C kolon tüpleri tekrar toplama tüplerine yerleştirilmiştir. Yıkama aşaması tekrarlanmış ve bu defa 400 µl RNA yıkama tamponu eklenmiştir.

9. Zymo-Spin TM III C kolonlar temiz toplama tüplerine yerleştirilmiş ve 12,000 x g'de 2 dk santrifüj edilmiştir.

10. Zymo-Spin TM III C kolonlar toplama tüplerden dikkatlice kaldırılmış ve DNase/RNase-Free tüplere yerleştirilmiştir. Kolonlara 6 µl DNase/RNase-Free su eklenmiş ve 1 dk bekletilmiştir.

Kolonlar 10,000 x g'de 30 sn santrüfjü edilmiş ve elde edilen RNA örnekleri -70°C'de saklanmıştır.

3.2.6. Revers Transkriptaz PZR (RT-PZR) ile cDNA Eldesi

cDNA elde etmek için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Almanya) kullanılmıştır. RNA örneği 1-4 µg / µl olarak konulmaktadır.

Birinci başlanma karışımı (1X) için:

BİLEŞEN	MİKTAR
RNA	2 µl
Anchored primer	1 µl
Su	8.4 µl
Total Hacim	11.4 µl

1. Hazırlanan karışımdan ependorflara aktarılmıştır.
2. 10 dakika 65 C° derecede bekletilmiştir.
3. Ependorflar buzda bekletilmiştir.
4. Bu arada diğer karışım hazırlanmıştır.
5. Buzda bekleyen ependorflara yeni karışımdan eklenilmiştir.
6. 30 dakika 55°C'de inkübe edilmiştir.
7. Isıtıcıda 85°C'de 5 dk bekletilmiştir.
8. Buzda aktarılarak -20°C'de saklanılmıştır. Elde edilen mRNA örnekleri -20°C'de kısa bir süre için bekletilebilir. Daha uzun süreli saklama için -20°C'de derin dondurucu tercih edilmektedir.

cDNA sentezi için ikinci basamak karışım (1X) için:

BİLEŞEN	HACİM
Tampon	4 µl
RNAaz inhibitörü	0.5 µl
dNTP	2 µl
DTT	1 µl
Revers Transkriptaz	1.1 µl
Total Hacim	8.6 µl

3.2.7. Bakterilerde Transformasyon

a. Bakteri hücrelerin kompetant hale getirilmesi

Klinik izole edilen dirençli *E.coli* suşundan elde edilen plazmid DNA'nın duyarlı referans *E.coli* ATCC 10536 kökenine aktarılması için duyarlı bakteri hücreleri kompetant hale getirilmiştir. *E.coli* ATCC 10536 kökeninden tek koloni alıp 5 ml Nutrient sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

İkinci gün 1ml alınıp 50 ml nutrient sıvı besiyerine eklenmiştir. Ekim 600 nanometrede 0.5 yoğunluğu gösterene kadar 80 devirde/dk olan çalkalayıcı etüvde 37°C'de inkübe edilmiştir.

Hücreler 8000 devirde 10 dk santrifuj edilip, 1 ml soğutulmuş transformasyon buffer'dan (50 mM CaCl₂, 10mM Tris- HCl ,pH 8) eklenmiştir. Karışıma sonra aynı solüsyondan 39 ml daha eklenmiştir. Karışım buzda 1 saat bekletilip sonra 8000 devirde 15 dakika santrifuj edilmiştir. Çökeltiye 1 ml transformasyon buffer'dan eklenmiştir. Hücreler 4°C'de 24 saat bekletilmiştir.

b. Bakterilerde transformasyon için klasik kimyasal yöntem

Elde edilen plazmid DNA dan 100 µl temiz tüpe alınmış üzerine hazırlanan kompetant *E.coli* hücrelerinden 0.5 ml eklenmiştir. Karışım buzda 20 dk bekletilip sonra 42°C'de 2-3 dk ısı şoku uygulanmıştır. Karışım içeren tüpe 1 ml nutrient sıvı besiyeri eklenmiştir. 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Nutrient sıvı besiyerini kullanarak karışımdan 10⁻⁵e kadar dilüsyonlar yapılmıştır. Her dilüsyondan 0.1 ml alınıp seçici besiyerine (ampicillin içeren nutrient agar) yayılmıştır. Kontrol olarak kompetant hücrelerden 0.1 ml aynı besiyerlerine yayılmıştır. Ekimler 37°C'de 1 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra transformasyon sıklığı hesaplanmıştır. ¹⁰³

Transformasyon sıklığı = Transformant koloni sayısı / Canlı bakteri kolonisi sayısı

3.2.8. Bakterilerde Transformasyon için Elektroporasyon Yöntemi

Elektroporasyon cihazı

NEON™ Transfection System (Catalog no. MPK5000), dokunmatik ekran bulunduran cihaz kullanılmıştır. Dokunmatik ekran da cihazı çalıştırmak için tuş ve kullanılmakta olan protokolün parametrelerini gösteren dijital gösterge ekranı vardır.



Resim 1: Elektroporasyon cihazı, NEON™ Transfection System

Neon™ Pipette Station:

Pipet istasyonunun cihaza bağlamasını sağlayan yüksek voltajlı ve sensörlü bağlayıcı bulunmaktadır. Neon pipet ile Neon tüp bağlandıktan sonra elektroporasyon uygulanabilmektedir. Pipet istasyonunun iki elektrodu vardır.



Resim 2: Neon™ Pipette Station

Neon tüpler, elektroporasyon esnasında karışımları içeren Neon pipet istasyonu içine yerleştirilir.

Neon Tips, tek kullanımlık olup, biyolojik örneğe yüksek elektrik alanı sağlayan altın kaplı elektrodlar içerir.

Genel kurallar:

DNA'nın kalitesi ve miktarı aktarımın verimliliği açısından önemlidir. Saflaştırılmış DNA (plazmid) deiyonize su veya TE buffer tekrar karıştırılır. 0.5-5 µg/ml arasında bir konsantrasyonda olmalıdır. DNA miktarının kullanılan total hacmin % 10'unu geçmemesi gerekmektedir. Aktarılması istenilen DNA'nın saflığından emin olmak için 260/280 absorbas'da ölçülebilir. Elektroporasyon için en az 1.8 olmalıdır. Cihaz düzenli olarak 4-7 kb miktarında plazmidler ile test edilmelidir. 20 kb'dan daha büyük plazmidler aktarımın verimliliğini olumsuz şekilde etkileyebilir. Hücreler Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen fosfat buffer salin (PBS) ile yıkanmalıdır. Hücre çökelekleri kit içinde bulunan resüspansiyon buffer R ile tekrar süspansiyon haline getirilir. Son yoğunluk 2.0×10⁷ hücre/ml şeklinde hazırlanmalıdır. Seçici besiyeri mayalar için, antifungal (flukonazol 128 µg/ml) içeren YPD besiyeri hazırlanmalıdır, bakteriler için, antibiyotik (Ampisilin 30 µg/ml) içeren MHA besiyeri kullanılmıştır. Elektroporasyon uyguladıktan sonra kontrol ekimi yapılır. 30-37°C'de 1-2 gün inkübasyondan sonra sonuçlar değerlendirilebilir.

Elektroporasyon protokolü

Elektroporasyon cihazının elektrik akımı Calvin ve Hnawalt'ın 1988'de önerdikleri program üzerine modifiye edilmiştir.

E.coli ATCC 10536 hücrelerden istenilen miktar alınmıştır. Hücreler Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen fosfat buffer salin (PBS) ile yıkanmıştır. Hücre çökelekleri kitte bulunan resüspansiyon buffer R ile tekrar süspansiyon hale getirilmiş son yoğunluğu 2.0×10⁷ hücre/ml şeklinde hazırlanmıştır.

Protokol	Voltage	Width	Pulse
1	1400	20	3
2	1800	20	3

Seçici besiyeri olarak antibiyotik (Ampisilin (30 µg/ml)) içeren MHA besiyerine, elektroporasyon sonrası ekim yapılır. 37 C° derecede 1gün inkübasyondan sonra sonuçlar değerlendirilebilir.

3.2.9 Mayalarda transformasyon:

Maya hücrelerinin DNA alıcısı (kompetant) haline getirilmesi

Elde edilen DNA veya plazmid DNA uygun hücrelere aktarmak için, seçilen hücreler Frozen- EZ Yeast Transformation II™ (T2001) kiti ile kompetant alıcı hücreler haline getirilmiştir.

Kompetant hücrelerin hazırlaması:

Bir gece önce ekimi 30 C° derecede 10 ml YPD sıvı besiyerinde yapılmış olan maya hücrelerine (yaklaşık 5×10^6 - 2×10^7 hücre/ml) oda ısısında bu protokol uygulanmıştır:

1. Hücreler 500×g 4 dakika santrifüj edilir ve supernatant atılır.
2. Hücre peletini yıkamak için EZ1 solüsyondan 10 ml eklenir. Çökelek haline getirilen hücreler tekrar santrifüj edilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
3. EZ 2 solüsyondan 1 ml eklenir hücre pelleti tekrar karıştırılır.

Bu aşamada kompetant hücreler gen aktarımı için hemen kullanılabilir veya -70°C veya daha düşük ısıda saklanabilir.

Kitte önerilen transformasyon protokolü:

1. Kompetant hücrelerden 50 µl alınır, 0.2-1 µg (5 µl den az bir miktarda) DNA örneklerine ilave edilip; EZ 3 solüsyonundan 500 µl eklenir ve iyice karıştırılır.

2. 30°C'de 45 dk inkübe edilir. İnkübasyon süresinde 2-3 defa vortekslenir.

3. İnkübasyondan sonra 50-150 µl transformasyon karışımından uygun besiyerlerine dağıtılır.

Besiyerleri 30°C'de 2-4 gün inkübe edilir. *C.albicans* hücreleri kompetant hâle getirildiğinde hemen kullanılmalıdır.

Mayalarda LiAc/tek zincirli taşıyıcı DNA/ PEG transformasyon yöntemi

Seçilen maya suşlarına gen aktarımının bir yöntemi olan lityum asetat/ tek zincirli DNA/polietilen glikol protokolü ile uygulanmıştır. ¹⁰²

İlk gün:

1. YPAD besiyerinde 2 cm² miktarında maya suşundan inokule edilir, bir gece 30°C'de inkübe edilir.

İkinci gün:

2. Taşıyıcı DNA, kaynar suda 5 dakika kaynatılır sonra buzlu suda bekletilir.

3. YPAD besiyerinde üremiş maya hücrelerinden 50 µl miktarında kazıntı alınır ve 1.0 ml steril suda, 1.5 ml lik ependorfta süspanse edilir (Süspanسیون 5×10⁸ hücre içermektedir) .

4. Hücreler en yüksek hızda 30 saniye santrifüj edilir, süpernatant atılmıştır.

5. 360 µl transformasyon karışımından hücre çökeltisine eklenmiş ve vortekslenmiştir.

6. Ependorf 42°C ısıda olan su banyosunda 20-180 dakika inkübe edilmiştir.

7. Transformasyon ependorfu en yüksek hızda 30 saniye santrifüj edilmiştir.
8. 1.0 ml steril su transformasyon ependorfuna eklenmiştir. Vortekslenmiş ve tekrar karıştırılmıştır.
9. Karıştırılan hücrelerden 10 veya 100 µl alınmış ve uygun besiyerinde inoküle edilmiştir. 3-4 gün 30⁰C'de inkübe edilmiştir.

3.2.10. Mayalarda Transformasyon İçin Elektroporasyon Yöntemi

Elektroporasyonun protokolü

3 ml Elektrolytic Buffer içeren Neon tüpü Neon pipet istasyonuna yerleştirildikten sonra, kite özel aktarım karışımından 10 µl alınır ve tüpe yerleştirilir. Mayalar için aşağıdaki iki protokol kullanılmıştır; Elektroporasyon cihazının elektrik akımı Thompson ve arkadaşlarının 1998'de önerdikleri program üzerine modifiye edilmiştir.

Protokol	Voltaj	Genişlik	Pulse
1	2000	20	1
2	1800	25	1

Muhtemel kontaminasyonu kontrol etmek için yabancı DNA molekülleri eklenmeden elektroporasyonu uygulanmış olan alıcı hücreler Seçici besiyeri olan antifungal (flukonazol 128 µg/ml) içeren YPD besiyerine ekimi yapılmıştır.

3.2.11. Bakterilerde ve Mantarlarda Transformasyonun Doğrulanması için Agar Dilüsyon Yönteminin Uygulanması

Escherichia coli için çalışmada MHA besiyeri kullanılmıştır. Daha önceden hazırlanmış olan antibiyotikli besiyelerine duyarlı ve dirençli *E.coli* kökenleri ekilmiştir. Transformasyon deneylerden sonra elde edilen transformant *E.coli* kökenleri de aynı şekilde gen aktarımının doğrulanması için antibiyotikli ve antibiyotiksiz besiyelerine ekilmiştir.

Candida albicans kökenlerine plazmid aktarıldıktan sonra duyarlılığının incelenmesi için YPDA besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri homojen hale getirilmiş ve otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilmiştir. Agar dilüsyon testi için 45°C'ye kadar soğuması beklenen besiyelerine flukonazol (8-16-32-64-128 µg/ml konsantrasyonlarında) ilave edilmiştir. Ayrıca üremenin kontrolü olarak, her örnekten yine 10 µl alınarak flukonazol içermeyen YPD besiyerine inokülasyonlar yapılmıştır.

3.2.12. Direnç Aktarımın Moleküller Yöntemler ile Gösterilmesi

Antifungal direnç genlerinin çoğaltılması için PZR basamağı Konvensiyonel PZR:

Eşit miktarda alınan cDNA'lar ve TE tamponunda sulandırılan plazmid örnekleri ACT1, CDR2, MDR1 ve ERG11 hedeflerine yönelik primerlerle PZR işlemine alınmıştır.

Konvensiyonel PZR'da kullanılan primerler	Dizi, 5'-3'	Ürünün baz çifti
ACT1	ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC GTTTGGTCAATACCGCAGCTTCCAAA	515
Ala CDR2	ATGCTGATGCCCTAGT GCTTCCTTAGGGACATGG	364
MDR1	GAGTCGTAGCTACATTGCCATTAACA GGTGATTCTAATGGTCTCCATAATGT	590
ERG11	ATTGGTATTCTTATGGGTGGTCAACATAC CCCAATACATCTATGTCTACCACCACC	513

Isı Döngüleri:

ACT1 için, T_m=57°C

95°C'de 5 dakika ön denatürasyon

94°C'de 1 dakika denatürasyon

57°C'de 1 dakika birleşme

72°C'de dakika uzama

95°C'de dakika son uzama

25 döngü

CDR2 için, $T_m=58, 56$ ve 54°C lerde

95°C'de 5 dakika ön denatürasyon	}	5 döngü
94°C'de 1 dakika denatürasyon		
58°C'de 1 dakika birleşme		
72°C'de 1 dakika uzama		
94°C'de 1 dakika denatürasyon	}	10 döngü
56°C'de 1 dakika birleşme		
72°C'de 1 dakika uzama	}	10 döngü
94°C'de 1 dakika denatürasyon		
54°C'de 1 dakika birleşme		
72°C'de 1 dakika uzama		
72°C'de 5 dakika son uzama		

MDR1 için, $T_a= 52^\circ\text{C}$

95°C'de 5 dakika ön denatürasyon	}	25 döngü
94°C'de 1 dakika denatürasyon		
52°C'de 1 dakika birleşme		
72°C'de 1 dakika uzama		
72°C'de 5 dakika son uzama		

ERG11 için, $T_a= 65, 60$ ve 50°C 'lerde

95°C'de 5 dakika ön denatürasyon	}	5 döngü
94°C'de 1 dakika denatürasyon		
65°C'de 5 dakika birleşme		
72°C'de 1 dakika uzama	}	10 döngü
94°C'de 1 dakika denatürasyon		
60°C'de 1 dakika birleşme		
72°C'de 1 dakika uzama	}	10 döngü
94°C'de 1 dakika denatürasyon		
50°C'de 1 dakika birleşme		
72°C'de 1 dakika uzama		
72 °C'de 5 dakika son uzama		

Isı döngü cihazı için karışımın hazırlanması

Amplifikasyon karışımı: 1x için

Primer 1(100 pmol)	0.1 µl
Primer 2(100 pmol)	0.1 µl
10 x	2 µl
MgCl (25 mM)	2.5 µl
dNTP	0.1 µl
Taq DNA polimeraz (250 U)	0.2 µl
Su	17 µl
Toplam	22 µl
DNA	3 µl

3.2.13. Elektroforez Yöntemi

Yapılan PZR işlemi sonucunda, oluşan amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

Uygulama:

1. Jel ve yürütme tamponu hazırlamak için 100 ml 5x TBE depo solüsyonu 400 ml distile su içinde dilüe edilerek 1x TBE'ye çevirilmiştir.
2. Agaroz jel hazırlanmıştır. 2 g Agaroz üzerine 100 ml 1x eklenip mikrodalga fırında en düşük sıcaklıkta agaroz tamamen çözülünceye kadar ısıtılmıştır.
3. Agaroz jele, elektroforez tankının içindeki kalıba dökülmeden hemen önce renklendirici olarak 3 µl DNA boyası etidyum bromid eklenmiştir.
4. Kalıp içine taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan jel dökülmüştür. Jelde akım geçişini engelleyecek baloncuk oluşmasının önlenmesine dikkat edilmiştir.

5. Donduktan sonra taraklar çıkarılmıştır. Jel elektroforez tankı (SC Cleaver Scientific Inc. Warwickshire, England) içine yerleştirilmiştir.
6. Tankın içi jel yüzeyi kaplanana kadar 1x TBE tamponu ile doldurulmuştur.
7. Kuyucuklara örnek yükleme tampon olarak Orange G (Metis, Kanada) kullanılmıştır.
8. Düz bir zemin üzerinde her örnek için 3µl yükleme tamponu dağıtılıp, örneklerden 9 µl alınmıştır ve yükleme tamponu ile pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
9. Her agaroz jel kuyucuğa 9 µl alınarak (yükleme tamponu+DNA) dağıtılmıştır.
10. İlk kuyucuğa DNA molekülerin yüklerini tanımlamak için kullanılan marker örnek DNA molekülleri gibi yüklenmiştir.
11. Güç kaynağı olan (LABNET International Power Station 300, Edison, England) çalıştırarak 90 mA, 60 V'da 30 dk yürütülmüştür. Agaroz jel tanktan çıkarılarak jel görüntüleme sisteminde (UVITEC Cambridge, England) UV ışığı altında bantlar incelenmiştir.

3.2.13. Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR)

ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Taq Man)'da gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak direnç genlerinin ifadesi ölçülmüştür. Yöntemde floresan raportör boya aktivitesindeki artış, amplifiye edilen hedef ile doğrudan orantılıdır. Kontrol geni "House keeping gene" olarak aktin geni (ACT1) kullanılmıştır. PZR reaksiyonun son hacimi 20 µl şeklinde hazırlanmıştır. 4 µl DNA içeren 16 µl PZR karışım ROX (6-carboxy-X-rhodamine) boyalı hazırlanmıştır.

(1x)için:

DNA-RNA free su	6 µl
Enzim içeren buffer	4 µl
Primer 1 forward (20 pmol)	2 µl
Primer 2 reverse (20 pmol)	2 µl
Hidroliz prob	2 µl
Toplam	16 µl
DNA	4 µl

Taq platinum DNA polimeraz enzimin denatürasyonu 95°C'de 5 dk olarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon iki aşamada tamamlanmıştır. 40 siklüs (döngü); 30 s denatürasyon aşaması (95°C) ve 1 dk annealing/ uzama aşaması (60 °C).

4. BULGULAR

Çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* kökenleri arasından seçilen duyarlı kökenler ve referans kökenler kullanılmıştır. *Candida albicans* kökenlerinin MİK değerleri 24 ve 48 saatte belirlenmiştir. Flukonazol için, MİK değeri 64 ug/ml olan örnekler flukonazol'e dirençli, 16-32 ug/ml arasında olanlar ise doza bağımlı duyarlı olarak değerlendirilmiştir. MİK değerleri Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 2: Flukonazol'ün *Candida albicans* klinik ve referans suşları için MİK değerleri

Kökenler	MİK (µg/ml) Flukonazol
*296, dirençli	128
*289, dirençli	128
*735, dirençli	64
*284, dirençli	32
*2323, dirençli	32
*775, dirençli	128
*2321, duyarlı	0.25
*731, duyarlı	0.25
*10231 ATCC, duyarlı	0.25
1, duyarlı	0.5
2, duyarlı	1
3, duyarlı	0.5
4, duyarlı	0.25

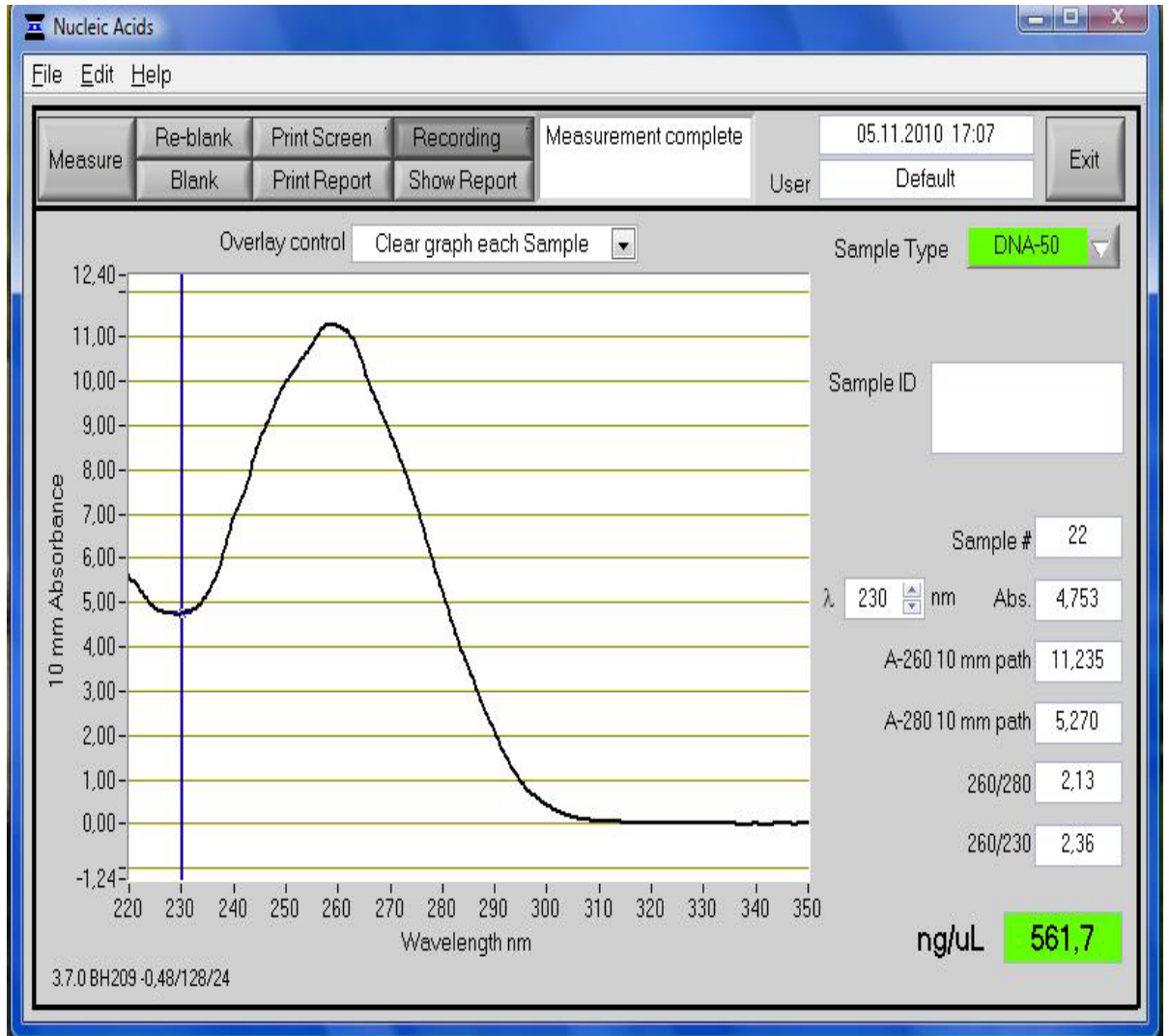
5, duyarlı	0.5
6, duyarlı	0.5
7, duyarlı	0.25
8, duyarlı	0.25
9, duyarlı	0.25
10, duyarlı	0.25
11, dirençli	64
12, duyarlı	1
13, dirençli	128

* *Candida albicans* atım pompası mutant kökenlerdir.

Tablo 3: Kökenlerden elde edilen DNA ve plazmid DNA miktarları:

kökenler	DNA (ng/µl)	Plazmid DNA (ng/µl)
*296, dirençli	400,3	5418,6
*289, dirençli	950,4	3698,8
*735, dirençli	815,7	2223,5
*284, dirençli	990,8	1410,9
*2323, dirençli	830,8	3071,8
*775, dirençli	791,4	3504,9
*2321, duyarlı	657,6	4547,4
*731, duyarlı	921,1	5380
*10231 ATCC, duyarlı	481,5	4200
1, duyarlı	437,0	331,9
2, duyarlı	823,6	421,5
3, duyarlı	144,7	157,7
4, duyarlı	675,8	5299,3
5, duyarlı	662,7	584,4
6, duyarlı	517,8	329,7
7, duyarlı	600,0	184,6
8, duyarlı	167,1	758
9, duyarlı	731,6	556,3
10, duyarlı	927,7	306,0
11, dirençli	829,4	4311,1
12, duyarlı	782,3	1505,4
13, dirençli	481,5	1171,6

* *Candida albicans* atım pompası mutant kökenlerdir.



Grafik 1. NanoDrop analiz ekranı örnek DNA ölçüm görüntüsü

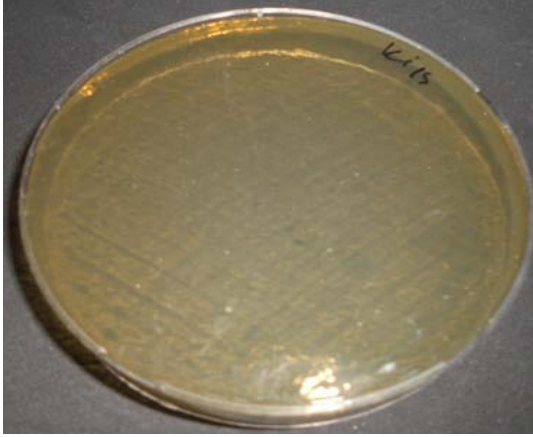
Antifungal direnç genlerinin gösterilmesi için hem DNA hem de plazmid örneklerinde direnç genlerinde mutasyon varlığı araştırılmıştır. ACT1, ERG11, MDR1, CDR2 primerleri kullanılarak konvesiyonal PZR yöntemiyle direnç genlerin varlığı gösterilmiştir.

Tablo 4: Konvesiyonal PZR yöntemiyle kökenlerde ERG11, MDR1, CDR2 direnç genlerin ve internal kontrol olarak kullanılan ACT1 genin, DNA ve Plazmid DNA örneklerinde gösterilmesi

kökenler	DNA				Plazmid DNA			
	ERG11	MDR1	CDR2	ACT1	ERG11	MDR1	CDR2	ACT1
*296, dirençli	-	+	+	+	-	-	-	-
*289, dirençli	+	-	+	+	+	+	+	+
*735, dirençli	+	+	+	+	-	-	-	-
*284, dirençli	+	-	+	-	+	+	+	+
*2323, dirençli	+	-	+	+	-	+	+	+
*775, dirençli	-	-	+	+	-	-	-	-
*2321, duyarlı	-	-	+	+	-	-	-	-
*731, duyarlı	+	-	+	-	-	-	-	-
*10231 ATCC, duyarlı	-	-	-	+	-	-	-	-
1, duyarlı	+	+	+	+	-	-	-	-
2, duyarlı	+	-	+	+	-	-	-	-
3, duyarlı	+	+	+	+	-	-	-	-
4, duyarlı	+	+	+	+	-	-	-	-
5, duyarlı	+	+	+	+	-	-	-	-
6, duyarlı	+	+	+	+	-	-	-	-
7, duyarlı	-	-	+	+	-	-	-	-
8, duyarlı	-	-	+	-	-	-	+	-
9, duyarlı	-	+	+	+	-	-	-	-
10, duyarlı	+	+	+	+	-	-	-	-
11, dirençli	+	+	+	+	+	-	+	+
12, duyarlı	+	-	-	-	-	-	-	-
13, dirençli	+	-	-	+	+	-	-	+

* *Candida albicans* atım pompası mutant kökenlerdir.

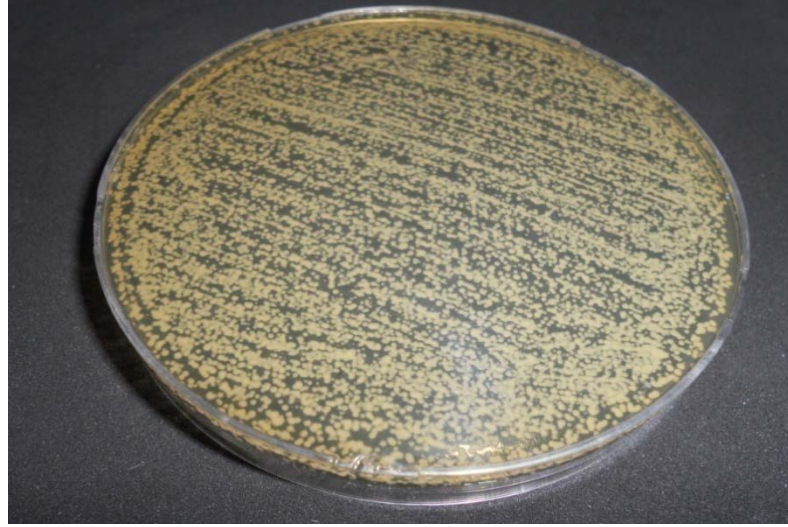
Gen aktarım deneylerine başlamadan önce kullanılacak olan kökenlerin fenotipik özelliğini göstermek için agar dilüsyon yöntemi ile kökenler dirençli ve duyarlı olarak ayrılmıştır. Ayrıca plazmid ile gen aktarımı için referans suşlardan 289 ve klinik kökenlerden 11 numaralı köken dirençli olarak seçilmiştir. Duyarlı olarak görünen örnekler olarak referans suşlardan ATCC10231 ve klinik örneklerden 12 numaralı köken seçilmiştir.



A: Duyarlı köken, Flukonazol içeren YPD besiyeri



B: Duyarlı köken, Flukonazol içermeyen YPD



C: Direnç aktarılan, transformant köken, Flukonazol içeren YPD besiyeri

Resim 3: A, B, C

Dirençli mutant köken olan 289 ve dirençli klinik köken olan 11 numaralı kökenden plazmid izole edilmiştir. Elde edilen ve direnç geni taşıdığı öngörülen plazmidler duyarlı olan ATCC 10231 referans köken ile duyarlı klinik kökenlerden 12 numaralı kökene aktarılmıştır. Aktarım sonucunda elde edilen toplam 8 transformant (aktarılmış) kökenden, DNA, plazmid DNA izole edilmiştir. Ayrıca transformant maya kolonilerinden ekstrakte edilen RNA'lar ticari kit kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. RNA gibi cDNA varlığı da NanoDrop cihazı (Thermo Scientific, ABD) ile ölçülerek tespit edilmiştir.

Tablo 5: Kullanılan kökenler ve elde edilen transformant kökenlerden izole edilen RNA ve RNA' dan RT-PZR ile elde edilen cDNA miktarları

Kökenler	RNA (ng/μl)	cDNA (ng/μl)
*289, dirençli	17.7	2884.7
11, dirençli	15.4	2804.5
*10231 ATCC, duyarlı	5.7	3221.7
12, duyarlı	13.7	4939.5
1-t (289, ATCC) lit.	114.6	3191,9
2-t (289, ATCC) elektro.	55.3	4321
3-t (289,12) lit.	10.9	2330.7
4-t (289,12) elektro.	2311	5800.9
5-t (11, ATCC) lit.	45.7	2366.2
6-t (11, ATCC) elektro.	78.8	335.9
7-t (11,12) lit.	209.7	2081
8-t (11,12) elektro.	76.8	342.1

* *Candida albicans* atım pompası mutant kökenlerdir.

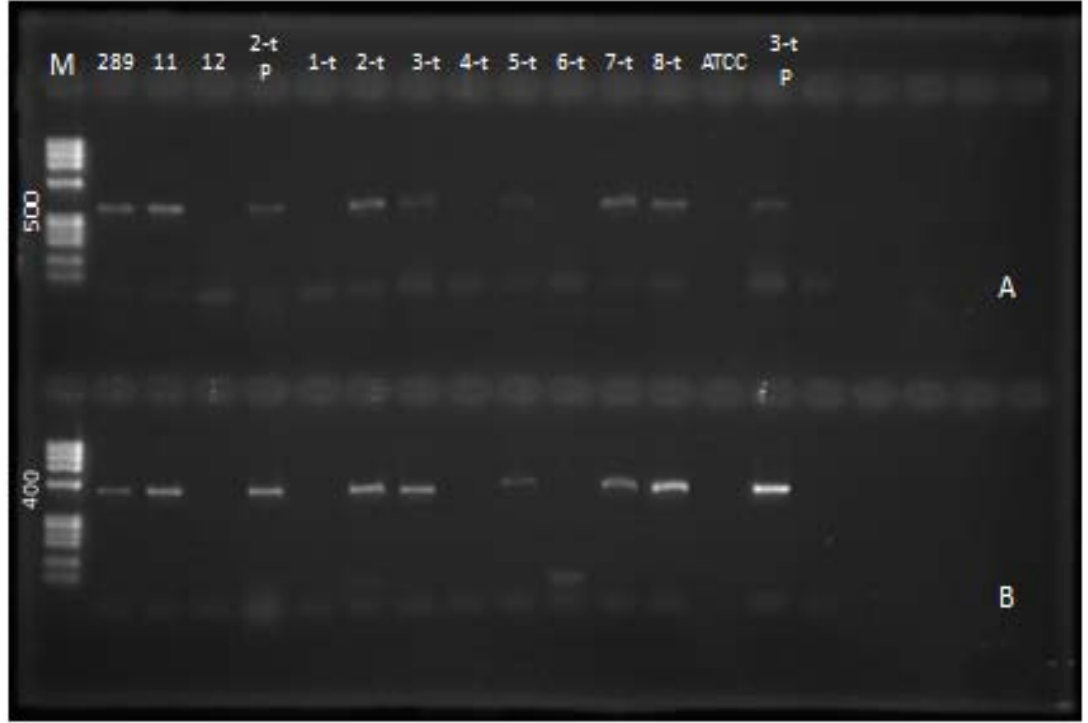
Tablo 6: Gen aktarımında kullanılan kökenler ve transformant olan kökenlerin konvansiyonel PZR ile DNA, plazmid DNA ve cDNA moleküllerin sonuçları:

KÖKENLER	DNA					PLAZMİD					cDNA				
	ACT1	CDR1	CDR2	MDR1	ERG 11	ACT1	CDR1	CDR2	MDR1	ERG 11	ACT1	CDR1	CDR2	MDR1	ERG 11
*289, dirençli	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+
11, dirençli	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
*10231 ATCC, duyarlı	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12, duyarlı	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-t (289, ATCC) lit.	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
2-t (289,ATCC)elektro.	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
3-t (289, 12) lit.	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
4-t (289,12) elektro.	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
5-t (11, ATCC) lit.	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
6-t (11,ATCC) elektro.	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
7-t (11, 12) lit.	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
8-t (11, 12) elektro.	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+



Resim 4: Duyarlı ve dirençli *C.albicans* DNA ve plazmid DNA Amplikonların jel elektroforezi ile görüntülenmesi, DNA ve Plazmid, CDR2 genin görüntüsü

(M size marker, 289* dirençli *C.albicans* kökene ait DNA, 289p dirnçli *C.albicans* kökene ait plazmid DNA, 3-t Transformant *C.albicans* kökeni, 12* duyarlı *C.albicans* kökene ait DNA, 12p duyarlı *C.albicans* kökene ait plazmid DNA).

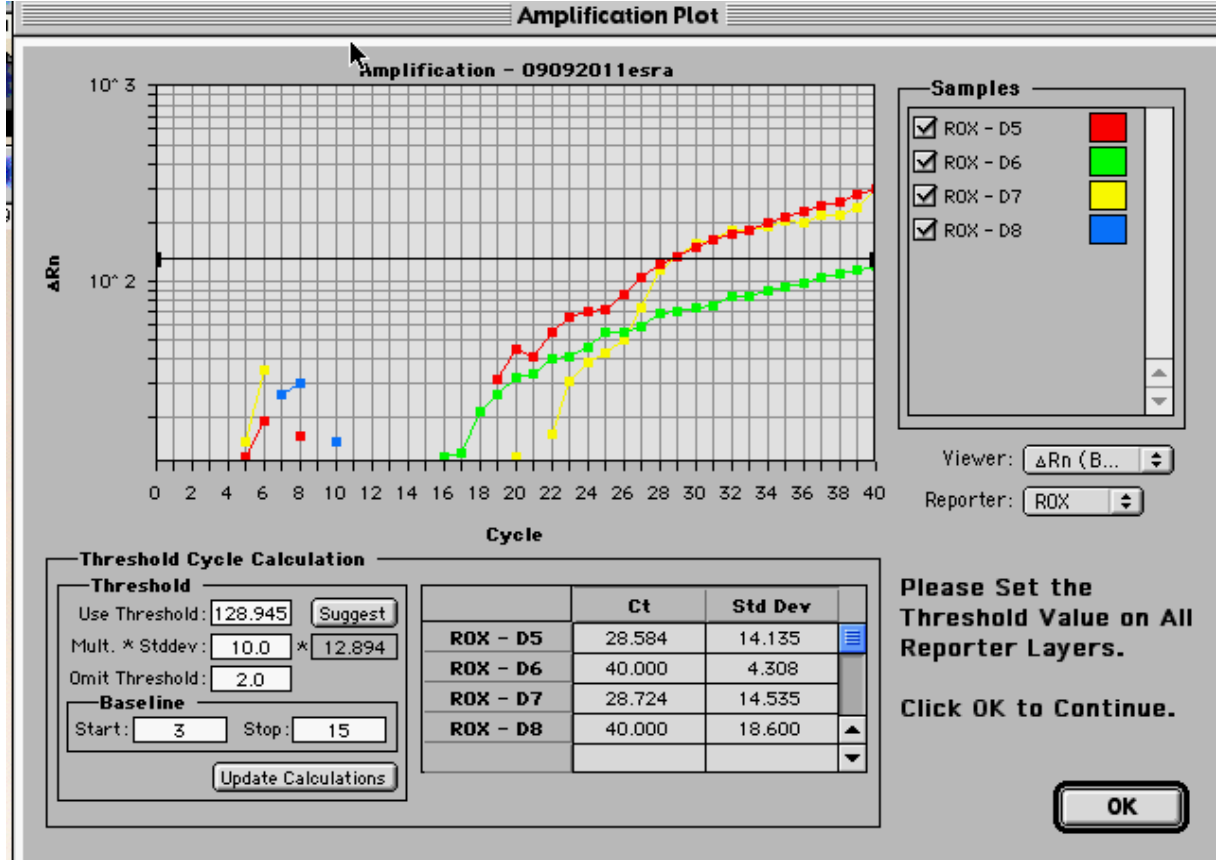


Resim 5: CDR 2 ve ACT PZR sonuçları: jel elektroforezi ile görüntülenmesi,
A: CDR2, B: ACT

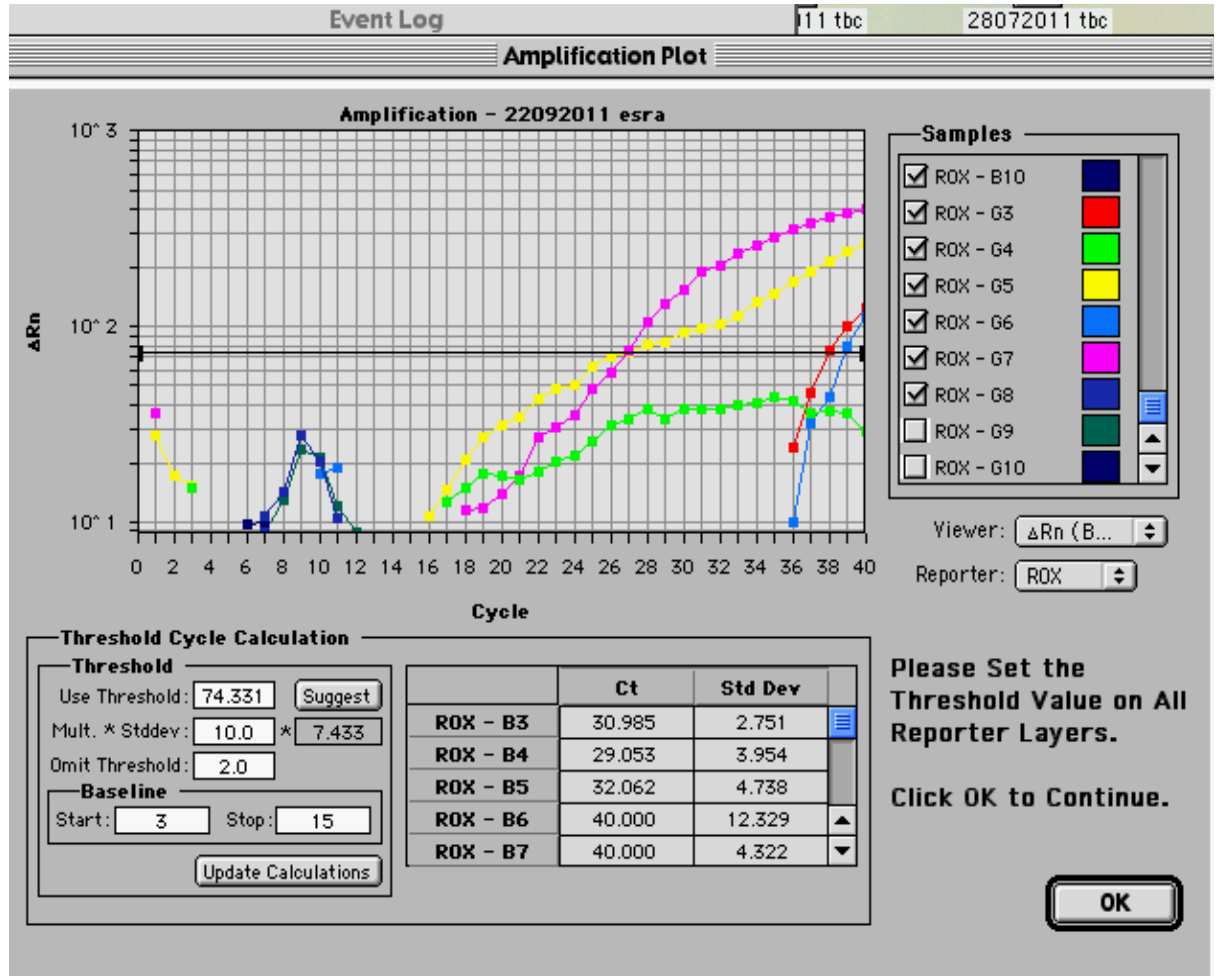
Tablo 7: TRANSFORMANT KÖKENLERİN 1 ve 2. ekimden plazmid ve cDNA direnç genlerinin sonuçları:

Transformant kökenler	1.ekim	2.pasaj
289, ATCC 10231 (Lit.)	Plazmid: CDR2, ERG11 cDNA: CDR1, CDR2,	ERG11 (-)
289, ATCC 10231 (Elektro.)	Plazmid: CDR1,CDR2 cDNA: CDR1,CDR2	CDR1,CDR2 CDR1,CDR2
289, 12 (Lit.)	Plazmid: CDR1,CDR2 cDNA : CDR1,CDR2	CDR1 CDR1,CDR2
289,12 (Elektro.)	Plazmid: CDR1 cDNA : (-)	CDR1 (-)
11, ATCC 10231 (Lit.)	Plazmid: (-) cDNA : CDR2	(-) CDR1,CDR2,ERG11
11, ATCC 10231 (Elektro.)	Plazmid: (-) cDNA : (-)	CDR1,ERG11 CDR1,ERG11
11,12 (Lit.)	Plazmid: CDR2,ERG11 cDNA: CDR1	ERG11 (-)
11,12 (Elektro.)	Plazmid: (-) cDNA : (-)	(-) (-)

Aktarılması en çok görülen CDR genleri RT-PZR ile gösterilmiştir. 2. ekimden transformant kökenlerden cDNA sonuçları bilgisayarda değerlendirilmiştir:



Grafik 2. Aktarımda kullanılan kökenlerin PZR belirlenmesi: D5: 289, D6: ATCC, D7: 11, D8: 12



Grafik 3. Transformant kökenlerde dirençten sorumlu CDR genlerinin gösterilmesi: 1-t, 2-t, 3-t, 4-t, negative CT altında, 5-t, 7-t, güçlü ve 6-t, 8-t zayıf pozitif.

5. TARTIŞMA

Candida albicans hücrelerinde genlerin fonksiyonel analizi, etkenin biyolojisi, patogenezi ve yaşamsal süreçlerin anlaşılması için önemli bir adımdır. ¹⁰ *C. albicans* maya hücrelerinin diploid olması ve tam bir eşeyli döngünün olmaması klasik genetik analizleri zorlaştırmaktadır. Ancak, transformasyon yöntemi ile tanımlanan mutasyonlar, insersiyonlar, ve füzyonlar gösterilebilir. ¹⁰⁴ Bu tez çalışmasında, transformasyon yöntemi kullanılarak flukonazole dirençli kökenlerde direncin plazmidler yolu ile aktarılıp aktarılamadığı incelenmiş ve atım pompalarını kodlayan genler hedeflenmiştir.

Antifungallere direnç gelişmesi sorunu mantar enfeksiyonlarının tedavisinde en önemli başarısızlık sebebidir. Direncin oluşum mekanizmaları arasında uzun süreli antifungal tedavisi yapılması, profilaksi uygulanması gibi klinik yaklaşımlar sayılmaktadır. Ancak direncin gelişim mekanizmaları arasında aktarılabilen genetik elemanlardan bahsedilmemektedir. Flukonazole dirençli izolatlarda atım pompalarını kodlayan ERG11, CDR1 ve MDR1 genlerinin farklı şekilde ifade edildiği saptanmıştır. ¹⁰⁵ Direnç mekanizması ne olursa olsun, klinik olarak izole edilen dirençli *C.albicans* kökenlerinde MDR1, CDR1 ve CDR2 genlerinin aşırı ifade edildiği gösterilmiştir. Flukonazole dirençli suşlar antifungal içermeyen ortamda yayılma sırasında dirençli fenotipik özelliklerini kaybeder. ^{25,39}

ERG11 genin ifade düzeyi ile flukonazol direnci arasında bir bağlantı saptanmamıştır. ¹⁰⁶ Dirençli suşlar, genellikle geniş spektrumlu

antifungal ilaçların uzun süre uygulaması arasında veya profilaktik tedaviden sonra gelişmektedir. ¹⁰⁷ MDR1 geninin in vitro olarak duyarlı *C.albicans* izolatlarında da ifade edildiği, fakat flukonazola karşı direnç gelişen kökenler güçlü bir şekilde aktive olduğu belirlenmiştir. ⁹⁴

Azollerin etki mekanizması, ERG11 geni tarafından kodlanan lanosterol 14- α demetilaz enziminin inhibe edilmesidir. Bu enzim ergosterol sentezinde lanosterolden ergosterole dönüşüm basamağını engelleyerek, hücrede ergosterol azalmasına ve lanosterol birikmesine neden olur. Membranın bütünlüğü bozulur ve membran ile bağlantılı bazı proteinlerin görevleri etkilenmektedir. ³⁶ ATP bağlı kaset taşıyıcıları (ABC) ailesinden atım pompalarını kodlayan CDR genleri (CDR1 ve CDR2) ve majör kolaylaştırıcı süper ailesi (MFS) üyesi atım pompalarından MDR genlerine ait mRNA seviyelerinin artışı gibi moleküler mekanizmalar flukonazola karşı direncin gelişmesine neden olmaktadır .Atım (efluks) pompa genlerinin mRNA seviyelerinin artışı azol direnciyle ilişkilidir. ¹⁰⁸ *C.albicans* kökenlerinde genomun esnekliği, antifungallara karşı direncin gelişmesine adaptasyonu sağlamaktadır. ¹⁰⁹ ABC taşıyıcı genlerin aşırı ifadesi, plazma membran proteinlerinden olan cdr1p ve cdr2p kodlayan CDR1 ve CDR2 genleri, flukonazole karşı dirençte önemli bir faktör olarak kabul edilmiştir. MDR1 geni ise flukonazol direncinde minör bir etkisi vardır. ⁶¹

CDR1/2 geniş spektrumlu azollere karşı direnç genleri olarak düşünülmüştür, MDR1 ise sadece flukonazole karşı aracılık yaptığı bildirilmiştir. ⁶⁴ CDR1 ve CDR2 gibi ABC taşıyıcıların aşırı ifadesi azollere karşı dirençte katkısı vardır. Oysa MDR1 geninin aşırı ifadesi flukonazole özel dirençten sorumlu olduğu görünmektedir. Ancak, iki efluks pompa arasındaki farka neden olan mekanizma belirlenememiştir. ¹¹⁰

Mantarlardaki direnç belirleyicilerinin aktarımı bakterilerdeki ilaç direncinin aktarımından biraz farklıdır. Bakterilerde, antibiyotik direnç genlerini içeren plazmid, profaj, integron ve gen adaları gibi hareketli elamanlar ile farklı taksonlar arasında yatay olarak aktarım gerçekleşebilmektedir. ⁹ Mantarlar için direnç gelişiminde bu ortak mekanizmalardan bahsedilmemektedir.

Bakteri hücrelerinin aksine, sağlam mantar hücreleri ekzojen DNA moleküllerini kolayca alamazlar. Mantarlarda, bakterilerdeki gibi bazı patojen türler antifungal ilaçlara doğal olarak dirençlidir. İlaçlara duyarlı mantar türlerindeki direnç özelliğinin kazanılması lokal mutasyondan kaynaklanabilir. Mantarlarda genlerin yatay olarak aktarımı yaygın değildir. ⁹ Sadece uzun yıllar süren evrimleşmeleri sırasında yatay ve dikey gen aktarımından söz edilmektedir. Mantarlar prensipte aktarılabilir genetik elemanları içerirler. Fakat bu aktarılabilir elemanların antifungallere dirençten sorumlu bölgeleri kodladıkları gösterilmemiştir. Üstelik sağlam mantar hücreleri hücre dışı DNA'yı kolayca alamazlar. ⁴Yapılan bir çalışmada *C.albicans* maya izolatlarından elde edilen CDR1 geni *S.cerevisiae* maya izolatlarına aktırılmıştır. Aktarım yapılan *S.cerevisiae* kökenlerinin antifungal

ilaçlara duyarlılıklarının azaldığı gösterilmiştir. ¹¹¹ CDR1 ve CDR2 genlerine ait mRNA seviyelerinin dirençli izolatlarda arttığı saptanmıştır. ¹¹²

Antifungal direnç genlerinin aktarıldığı çalışmalar kısıtlıdır. Virülans faktörlerini kodlayan genler ise transformasyon yöntemleri ile aktarılmıştır. ¹¹³ Duyarlı *S.cerevisiae* kökenlerine MDR1, FLU1 homolog genleri aktarıldıktan sonra transformant suşlar flukonazole karşı direnç kazanmışlardır. ²⁵ MFS üyesi proteinleri kodlayan genlerden olan FLU1 geni *C.albicans*'da tespit edilmiştir. FLU1 geninin direnç ile ilişkisi kesinleşmemiştir. Bir çalışmaya göre toplam 59 klinik *C.albicans* kökeni arasında sadece bir izolatta FLU1 geninin aşırı ifadesi saptanmıştır. Bu taşıyıcı genin klinik direnç ile ilişkili olup olmadığı belirlenememiştir. ¹¹⁴

Saccharomyces cerevisiae genomu *Candida* için doğru bir bilgi kaynağı olmayabilir. Çünkü bazı patojene özel genleri içermemektedir. ¹¹⁵ *C.albicans* mayaları diploid olduğundan organizmada gen fonksiyonlarının çalışması daha zordur. *S.cerevisiae*'lerde ilaç direncinin pozitif regülatörü olarak bilinen genler, *C.albicans*'larda direnç için negatif regülatör olarak belirlenmiştir. ¹¹⁶

Bu tez çalışmasında gen aktarımı için birden fazla transformasyon yöntemi kullanılmıştır. Lityum asetat, sferoblast ve elektroporasyon yöntemlerinin sonuçları birbiri ile karşılaştırılmıştır. Elektroporasyon yönteminin başarısı en yüksek bulunduğu için bu yöntem ile oluşturulan transformant hücrelerde ileri analizler yapılmıştır. Transformasyon

başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Transformasyon başarılı olduğuna göre antifungal dirençten sorumlu genler de aktarılmış olarak kabul edilmiştir. Zaten transformant hücrelerden elde edilen RNA, DNA ve plazmid örneklerinde direnç geni CDR varlığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar ile antifungal direncin transformasyon ile aktarılabileceği anlaşılmıştır. Bu çalışma in vitro koşullarda gerçekleştirilmiştir. Dolayısı ile gerçek canlıda veya doğal koşullarda aynı transformasyonun gerçekleşmesi beklenmemelidir. Bu deneysel çalışma bize direncin aktarılabileceğini göstermiştir. Çalışmanın başlangıç noktasını oluşturan hipotez cevabını bulmuştur.

Elektroporasyon deneyinde *C.albicans* için tanımlanmış bir protokol olmadığından *S.cerevisiae* için tanımlanmış protokoller değiştirilerek kullanılmıştır. Aktarım yapılan maya hücreleri elektroporasyon sonrasında katı besiyerinde inkübe edilmiş böylece aktarılan özelliğin test edilmesi sağlanmıştır. Zaten kaynaklarda transformasyonun katı besiyerlerinde kontrol edilmesi önerilmektedir.^{85, 94}

Transformasyon yöntemlerinden biri olan lityum asetat ile maya hücrelerinin plazmidleri alabilecek alıcılar haline gelmesi sağlanabilmiştir. LiAc yöntemi daha az zaman gerektirmesine rağmen, *C.albicans* mayaları için özellikle elektroporasyon yöntemine göre 10-100 kat daha düşük verimde olduğu belirlenmiştir. LiAc mayalarda hücre membranının geçirgenliğini arttırmakta fakat yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstermektedir.⁹⁴ Fakat bu tez çalışmasında LiAc yöntemi elektroporasyon yöntemine yakın düzeyde verimlilik göstermiştir. Bizim bu sonucumuz diğer çalışma sonuçları ile uyumlu değildir. LiAc yöntemi başarılı ile uygulanmış olmasına rağmen, bu

şekilde elde edilen transformantlar değil, elektroporasyon yöntemi ile elde edilen transformantlarda ileri analiz yöntemleri uygulanmıştır.

Çalışmamızda taşıyıcı DNA kullanılmıştır. Taşıyıcı DNA eklendiğinde transformasyon sıklığının arttığı belirtilmektedir.⁸¹ Gerçekten de taşıyıcı DNA eklenmesi transformasyon başarısını yükseltmiştir.

Candida albicans hücrelerinde kromozom içi rekombinasyon çok sık görülmektedir.¹⁰ Plazmid aktarılan transformantlar stabilite göstermektedir. Tüm transformantlar katı besiyerinde aktarılan özelliklerin gösterilmesinden öte, PZR yöntemi kullanılarak değerlendirilebilir. Çalışmamızda aktarılan direnç genlerinin varlığı gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kontrol edilmiştir. Atım pompalarından CDR hedef olarak seçilmiş ve bu genin plazmidler yolu ile aktarıldığını göstermek için transformant kökenden izole edilen plazmid, RNA ve DNA örneklerinde CDR geni PZR ile aranmıştır.

CDR1 ve CDR2 genlerini kodlayan mRNA, MDR1 genine ait mRNA'ya göre daha uzun yarılanma ömrüne sahiptir. Bu nedenle gen ifadesi ile ilgili çalışmalarda daha çok CDR genleri kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda da hedef olarak bu genler seçilmiştir. Gen ifadesi çalışmalarında gerçek zamanlı PZR yöntemleri ve özellikle RNA analizi yapan revers transkriptaz PZR (RT-PZR) yöntemleri en duyarlı ve doğru sonuçları vermektedir. Ancak doğru kantifikasyon ile ilgili sorunlar bulunmaktadır.¹¹⁷ RT-PZR yöntemi ile mantarlarda primer ve sekonder azol direncinden sorumlu olan CDR1, CDR2 ve MDR1 genlerinin ifadesini saptamak ve ölçmek mümkündür.^{118, 42, 107} Gerçek zamanlı olmayan RT-PZR yöntemlerinde geni ifadesi kantite edilemediği için sonuçlar yetersiz kalmaktadır.^{118, 119, 120}

Kantitatif gerçek zamanlı PZR (Real-Time PZR) gen ekspresyonunu değerlendirmek için tanımlanmış bir yöntemdir. PZR sonrası işlemlerin ve taşıma adımının ortadan kaldırılması zaman kazandırır ve kontaminasyon riskini azaltır. Bu nedenle PZR yöntemi MDR1/CDR mRNA miktarını ölçmek için güvenilir bir yöntem olarak belirlenmiştir. Kofla ve arkadaşların çalışmasına göre *C.albicans* kökenlerinde direnç genlerinin ifadesini ölçmek için TaqMan problemlerinin kullanıldığı PZR yöntemi kullanılabilir.^{64, 121, 122} Bizim çalışmamızda da önerilere uygun olarak TaqMan problemler kullanılmıştır. Elde edilen PZR sonuçlarının güvenilirliği bu çerçevede değerlendirilmiştir.

6.SONUÇ

Candida albicans kökenleri arasında antifungal direncin aktarılabileceğine dair teorik bilgilerimiz olmasına rağmen, bu aktarım tam olarak kanıtlanmış değildir. Bu tez çalışmasında antifungal dirençten sorumlu atım pompalarını kodlayan genlerden CDR1ve CDR2 genlerinin plazmidler yolu ile aktarılabilmesi araştırılmıştır. Bu amaçla dirençli *C.albicans* kökenlerinden DNA, RNA ve plazmid izole edilmiş, Lityum asetat ve elektroporasyon yöntemleri ile duyarlı *C.albicans* kökenlerine aktarım yapılmıştır. Antifungal direncin aktarılıp aktarılamadığı klasik antifungal içeren besiyerlerinde üreme özellikleri yanında gerçek zamanlı PZR yöntemi ile de kontrol edilmiştir.

Aktarım yapılan örneklerden bir kısmında CDR atım pompası geninin plazmidler ile aktarılabildiğine dair kanıtlar elde edilmiştir. Diploid bir kromozoma sahip olan *C.albicans* için genom çalışmalarının zorluğu göz önüne alındığında, elde edilen bu ilk veriler ileride yapılacak çalışmalara yön gösterecektir.

7.ÖZET

Candida albicans insan deri ve mukoza florasında bulunan bir organizmadır. Bu organizma invazif olmayan yüzeysel infeksiyonlardan başlayarak derin dokuları tutan infeksiyonlara kadar değişen bir hastalık spektrumuna sahiptir. Bu etkenin tedavisinde flukonazol gibi geniş spektrumlu antifungal ilaçların uzun süreyle veya profilaktik olarak kullanılması, dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Antifungal ilaçlara direnç gelişmesinin temelinde hücre içi hedeflerin değişmesi rol oynamaktadır.

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen klinik *Candida albicans* kökenlerine antifungal dirençten sorumlu atım pompası genlerinin aktarımı yapılmıştır. Dirençli kökenlerin DNA ve plazmid DNA moleküllerinde direnç genleri PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Direnç geni gösterilen örneklerden elde edilen ve direnç geni taşıdığı öngörülen plazmidler duyarlı olan kökenlere aktarılmıştır. Duyarlı kökenlerde de direnç genlerinin aktarıldığı PZR yöntemiyle gösterilmiştir.

Aktarılabilen genetik materyalin antifungal direnç genlerini taşıyabileceği böylece gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *C.albicans*, Direnç genleri, Plazmid, Mantarlarda transformasyon.

8.SUMMARY

Candida albicans is the normal flora member of skin and mucosal membranes of human. This organism has a changing spectrum of diseases which is ranging from non-invasive superficial infections to invasive deep tissues infections. The use of broad-spectrum antifungal drugs such as fluconazole both for the treatment and for the prophylaxis of the infections caused by this organism has led to the emergence of resistant strains. The development of antifungal drug resistance is the result of changing intracellular targets.

In this study, the transformation of efflux pump genes between the clinical isolates of *Candida albicans* was performed. Isolates were selected from the culture collection of Gazi University, School of Medicine, Department of Medical Microbiology. Efflux pump genes isolated from resistant strains were detected by PZR method. Plasmids predicted to be carrying resistance genes isolated from resistant strains and transferred into susceptible genomes. Resistance genes also detected in previously susceptible strains by PZR after transformation step.

It was concluded that antifungal resistance genes might be transferred on mobile genetic elements of fungi.

Key Words: *C.albicans*, Resistance genes, Plasmid, transformation of fungi.

9. Kaynaklar

1. Li-juan F, Zhe W, Xiao-hong W, Yu L, Wei L. Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in *ERG11* gene. Chin Med J 2010; 123: 544-8.
2. Haynes K. Virulence in *Candida* species. Trends Microbiol 2001; 12: 591-6.
3. Lee MK, Williams LE, Warnock DW, Arthington S. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. J Antimicrob Chemother 2004; 53: 217-4.
4. Thompson JR, Register E, Curotto J, Kurtz M, Kelly R. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. Yeast 1998; 14: 565-71.
5. Fincham JRS. Transformation in fungi. Microbiol Rev 1989; 53: 148-50.
6. Yoshida T, Jono K, Okonogik K. Modified agar dilution susceptibility testing method for determining in vitro activities of antifungal agents, including azole compounds. Antimicrob Agents and Chemother 1979; 41: 1349-51.
7. Sanglard D, Kuchler K, Pagani L, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother 1995; 11: 2378-86.

8. Hof H. Will resistance in fungi emerge on a scale similar to that seen in bacteria?. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 327-34.
9. Ricardo E, Costa-de-Oliveira S, Dias AS, Guerra J, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. Ibuprofen reverts antifungal resistance on *Candida albicans* showing overexpression of CDR genes. *FEMS Yeast Res* 2009; 9: 618–25.
10. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 1999; 283:1535–8.
11. Brzobohaty B, Kovac L. Factors Enhancing genetic transformation of intact yeast cells modify cell wall porosity. *J Gen Microbiol* 1986; 132: 3089-93.
12. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CH. High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 1988;16: 6127-35.
13. Casalnuovo IA, Francesco P, Garaci E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004; 8: 69-77.
14. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and

- other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2300-5.
15. Simon JR. Transformation of intact yeast cells by electroporation. *Methods Enzymol* 1993; 217: 478–83.
 16. Goshorn AK, Grindlea SM, Scherer S. Isolation by complementation in *Candida albicans* and applications to physical and genetic mapping. *Infect Immun* 1992; 60: 876-84.
 17. Fan-Havard P, Capano D, Smith SM, Mangia A, Eng HK. Development of resistance in *Candida* isolates from patients receiving prolonged antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 2302– 5.
 18. Gietz RD, Woods RA. Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* 2001; 30: 816-21.
 19. Lopez-ribot J, Mcatee RK, Lee LN, Kirkpatrick WR, White TH, Sanglard D et al. Distinct patterns of gene expression associated with development of fluconazole resistance in serial *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2932–7.
 20. Hitchcock, CA. Resistance of *Candida albicans* to azole antifungal agents. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 1039–47.
 21. Perlin DS. Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward? *Current Opinion in Infectious Diseases* 2009; 22: 568–73.

22. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azol antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 1997; 143: 405- 16.
23. Gottesman M, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 385–7.
24. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 6 th ed Canada: Mosby Elsever; 2009: s. 686 -713.
25. Morschhauser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587: 240-8.
26. Molero G, Diez-orgias R, Navarro-garcia F, Monteoliva L, Pla J, Gil C et al. *Candida albicans*: genetics, dimorphisim and pathogenicity. In *Microbiol* 1998; 1: 95-106.
27. Dan M, Leshem Y, Yeshaya A. Performance of rapid yeast test in detecting *Candida* species in the vagina. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 67: 52-55.
28. Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal Infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 2006; 55: 809-18.

29. Willke Topcu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Cilt 4. 3.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008: 2411-25.
30. Şahiner F, Ergünay K, Özyurt M, Ardıçlı N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması. Mikrobiyol Bul 2011; 45: 478-88.
31. Cowen LE. Predicting the emergence of resistance to antifungal drugs. FEMS Microbiol Lett 2001; 204: 1–7.
32. Lupetti A, Danesi R, Campa M, Tacca MD, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungal. Trends Mol Med 2002; 8: 76-81.
33. Alexander BD, Perfect JR. Antifungal resistance trends towards the year 2000: Implications for therapy and new approaches. Drugs 1997; 54: 657–78.
34. Orozco AS, Higginbotham LM. Mechanisms of fluconazol resistance in *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2648-9.
35. Eggimann Ph, Garbino J, Pitter D. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. Lancet Infect Dis 2003; 3: 772-85.
36. Chau AS, Mendrich CA, Sabatelli FJ, Loebenberg D, McNicholas PM. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida*

albicans strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. Antimicrob Agents Chemother 2004; 6: 2124-31.

37. Loeffler J, Hagemeyer L, Hebart H, Henke N, Schumacher U, Einsele H. Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* Species. Clin Chem 2000; 46: 631-5.
38. Balzi E, Goffeau A. Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. Biochim Biophys Acta 1994;1187:152–62.
39. Chen L, Xh Y, Zhou C, Zhao J, Wang R. Overexpression of CDR1 and CDR2 genes play an important role in fluconazole resistance in *Candida albicans* with G487T and T916C mutations. J Med Res 2010; 38: 536-45.
40. Hof H. Is there a serious risk of resistance development to azoles among fungi due to the widespread use and long-term application of azole antifungals in medicine?. Drug Resist Updat 2008; 11: 25–31.
41. Gonzealez GM, Portillo OJ, Uscanga GI, Andrads SE, Robledo M, Rodriguez C et al. Therapeutic efficacy of voriconazole against a fluconazole-resistant *Candida albicans* isolate in vaginal model. J Antimicrob Chemother 2009; 64: 571-3.
42. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2002; 1: 73-85.

43. Viscoli C. Recent advances in the management of invasive candidiasis: role of anidulafungin. *Drugs* 2009; 1:1-3.
44. Bart-Delabesse E, Boiron P, Carlotti A, Dupont B. *Candida albicans* genotyping in studies with AIDS developing resistance to fluconazole. *J Clin Microbiol* 1993; 35: 2933-7.
45. Richter S, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J Clin Microbiol* 2005; 5 : 2155-62.
46. Li RK, Elie CM, Clayton GE, Cibla K. Comparison of a new colorimetric assay with the NCCLS broth microdilution method (M-27A) for antifungal drug MIC determination. *J Clin Microbiol* 2000; 6: 2334-8.
47. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1-8.
48. Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, Francesco L, Caselli F, Giannini D et al. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 6: 1578-84.
49. Maebashi K, Kudoh M, Nishiyama Y. A novel mechanism of fluconazole resistance associated with fluconazole sequestration in *Candida albicans* isolates from a myelofibrosis patient. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 317 - 26.

50. Prasad R, Dewergifosse P, Goffeau A, Balzi E. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* 1995; 27: 320–9.
51. Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF. Multiple efflux mechanisms are involved in *Candida albicans* fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2835–41.
52. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 668-79.
53. Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin in Microbiol* 2002; 5: 379-85.
54. Persing DH. Moleküler Mikrobiyoloji. 1. Basım. Ankara: Palme Yayınevi; 2006: s.71
55. Ingroff AE. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25:101-6.
56. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1704–13.

57. Gygax SE, Vermitsky JP, Chadwick SG, Self MJ, Zimmerman JA, Mordechai E et al. Antifungal resistance of *Candida glabrata* vaginal isolates and development of a quantitative reverse transcription-PCR-based azole susceptibility assay. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 9: 3424-26.
58. Henry KW, Cruz MC, Katiyar SK, Edlind TD. Antagonism of azole activity against *Candida albicans* following induction of multidrug resistance genes by selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1968–74.
59. Harry JB, Oliver BG, Song JL, Silver MP, Little JT, Choiniere J et al. Drug-induced regulation of the *MDR1* promoter in *Candida albicans* *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2785–92.
60. Coste AT, Karababa M, Ischer FI. TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell* 2004; 3:1639–52.
61. Perea S, Lopez-Ribot JL, Wickes BL. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46, 1695–03.
62. Calabrese D, Bille J, Sanglard D. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (*FLU1*) conferring resistance to fluconazole. *Microbiology* 2000; 146: 2743–54.

63. Wirsching S, Michel S, Köhler G, Morschhauser J. Activation of the multiple resistance gene MDR1 in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. J Bacteriol 2000; 128: 400-4.
64. Kofla G, Ruhnke M. Development of a new real-time TaqMan PCR assay for quantitative analyses of *Candida albicans* resistance genes expression. J Microbiol Methods 2007; 68: 178-83.
65. Edlind TD, Henry KW, Vermitsky JP, Edlind MP, Raj S, Katiyar SK. Promoter-dependent disruption of genes: simple, rapid, and specific PCR-based method with application to three different yeast. Curr Genet 2005; 48: 117-25.
66. Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98: 1027-32.
67. Page BT, Shields CE, Merz WG, Kurtzman CP. Rapid identification of ascomycetous yeasts from clinical specimens by a molecular method based on flow cytometry and comparison with identifications from phenotypic assays. J Clin Microbiol 2006; 44: 3167-71.
68. White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infection. J Clin Microbiol 2005; 43: 2181-87.

69. Souza F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* 1996; 21: 280–5.
70. Wirsching S, Michel S, Morschhauser J. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the *MDR1* gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. *Mol Microbiol* 2000; 36: 856–65.
71. Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3260–5.
72. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 1999; 26: 112–5.
73. Okeke CN, Tsuboi R, Kawai M, Yamazaki M, Reangchainam S, Ogawa H. Reverse transcription-3 rapid amplification of cDNA ends nested PCR of *ACT1* and *SAP2* as a means of detecting viable *Candida albicans* in an in vitro cutaneous candidiasis model. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 95–100.
74. Vermitsky JP, Edlind TD. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3773–81.
75. Okeke CN, Tsuboi R, Ogawa H. Quantification of *Candida albicans* actin mRNA by the LightCycler system as a means of assessing viability in a model of cutaneous candidiasis. *J Clin Microbiol* 2001; (39) 10: 3491–4.

76. Huber DH, Rustchenko E. Large circular and liner rDNA plazmids in *Candida albicans*. *Yeast* 2001; 18: 261-72.
77. Veireira N, Pereira F, Casal M, JP, Brown A, Paiva S, Johansson B. Plazmid for in vivo construction of integrative *Candida albicans* vectrors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2010; 27: 933- 9.
78. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2004: s.101-120.
79. Hinnen A, Hicks JB, Fink GR. Transformation of yeast (gene exchange/ hybrid plazmid/ integeation). *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 4: 1929-33.
80. Moerschell RP, Tsunasawa S, Sherman F. Transformation of yeast with synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 10: 524-8.
81. Costanzo MC, Fox TD. Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics* 1988; 120: 667-70.
82. Kawai S, Hashimoto W, Murata K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi, methods and possible underlying mechanism. *Bioeng Bugs* 2010; 1: 395-403.
83. Brown JR, Slobodkin DH, Kumamoto IV. Stable transformation and regulated expression of an inducible reporter construct in *Candida albicans* using restriction enzyme-mediated integration. *Mol Gen Gene* 1996; 251: 75–80.

84. Gouka RJ, Gerk C, Hooykaas PJ, Bundock P, Musters W, Verrips CT et al. Transformation of *Aspergillus swamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 598-601.
85. Maes D, Vandoninck S, Logghe M, Contreras R, Luyten ML. Transformation of *Candida albicans* by electroporation. *Yeast* 1999; 15: 1609-18.
86. Kurtz MB, Cortelyou MW, Miller SM, Lai M, Kirsch DR. Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Mol Cell Bio* 1987; 7: 209-17.
87. White TC. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR* and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 14: 1482-7.
88. Mitchell TG, Freedman EZ, White TJ, Taylor JW. Unique oligonucleotide primers in PCR for identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 253-5.
89. Boynton J, Gillham N, Harris E, Hosler J, Johnson A, Jones A et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 1988; 240:1534–8.
90. Elbe R. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *BioTechniques* 1992; 13: 18–20.

91. Ito H, Fukud Y, Murata K, Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cation. *J Bacteriol* 1983; 153:163-8.
92. Orr-Weaver TL, Szostak JW, Rothstein RJ. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 10: 6354-58.
93. De Backer MD, Guarente L. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol* 1991; 194: 182–7.
94. Walther A, Wendland J. An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Curr Genet* 2003; 42: 339-43.
95. Meilhoc E, Masson J, Teissie J. High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Biotechnology* 1990; 8: 223–7.
96. Zemanova J, Nosek J, Tomaska L. High-efficiency transformation of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* 2004; 45: 183–6.
97. De Backer MD, Maes D, Vandoninck S, Logghe M, Contreras R, Luyten WH. Transformation of *Candida albicans* by electroporation. *Yeast* 1999; 15: 1609-18.
98. Calvin NM, Hanawalt PC. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol* 1988; 170: 2796-01.

99. Smith AW, Iglewski BH. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:10509.
100. Shen WJ, Forde BG. Efficient Transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 8385.
101. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombination plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513- 15.
102. Gietz D, Jean AS, Woods RA, Schiestl R. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acid Research* 1992; 20: 1425-26.
103. Relman DA, editors. *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar*. 1. baskı. Ankara: Palme Yayınevi; 2006: 570- 575.
104. Cihlar RL, Calderon RA. *Candida albicans*: methods and protocols. *Methods Mol Biol* 2009; 499:v.
105. Ener B. Fungal infeksiyonlarda tanı. *ANKEM Derg* 2011; 25:156-1.
106. White TC, Holleman S, Dy F. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1704-13.
107. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 382-92.

108. Lyons CH, White TH. Transcriptional analyses of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2296-303.
109. Coste A, Selmecki A, Forche A, Diogo D, Bougnoux ME, Enfert Ch, et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* 2007; 1: 1889-904.
110. Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 8998-02.
111. Fonzi WA, Irwin MY. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 1993; 3: 717-8.
112. Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Dib OP, Fothergill AW, Redding SW, Rinaldi MG, Patterson TF. Detection and significance of fluconazole resistance in oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1996; 174 : 821-7.
113. Park S, Perlin DS. Establishing surrogate markers for fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Microb Drug Resist* 2005; 11: 232-8.
114. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence Factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 7: 327-35.

115. Sanglard D. Integrated antifungal drug discovery in *Candida albicans*. Nat Biotechnol 2001; 3: 212-3.
116. Niimi M, Niimi K, Takano Y, Holmes AR, Fischer FJ, Uehara Y et al. Regulated overexpression of CDR1 in *Candida albicans* confers multidrug resistance. J Antimicrob Chemother 2004; 6: 999-1006.
117. Frade JP, Warnock DW, Arthington-skaggs BA. Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase light cycler PCR and fluorescent probe hybridization. J Clin Microbiol 2004; 5: 2085-93.
118. Selvarangan R, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by capillary-based amplification and fluorescent probe hybridization. J Clin Microbiol 2002; 11: 4308-12.
119. Godfrey TE, Kelly LA. Development of quantitative reverse transcriptase PCR assays for measuring gene expression. Methods Mol Biol 2005; 1: 423-5.
120. Beggs KT, Holmes AR, Cannon RD, Rich AM. Detection of *Candida albicans* mRNA in archival histopathology samples by reverse transcription-PCR. J Clin Microbiol 2004 ; 42: 2275-78.

121. Hennessey D, Drummond DR, Sparrow JC. Molecular Genetics of Actin Function. *Biochem J* 1993; 3: 657-61.

122. Reisler E. Actin molecular structures and functions. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 41-7.

EKLER

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve hazırlanmasında, bilgi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli tez danışmanı hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe KALKANCI 'ya, Eğitimim süresince destek ve ilgilerini esirgemeyen, değerli bilgilerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR'a, ve Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Başkanımız Sayın Prof. Dr. Nedim SULTAN'a, ayrıca Ankara Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Başkanı Sayın Prof.Dr. Aydın KARAARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca ilgi ve bilgileri ile bana yardımcı olan Tıbbi Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri, Prof. Dr. Turgut İMİR'e, Prof. Dr. Seyyal ROTA'ya, Prof. Dr. Meltem YALINAY ÇIRAK'a, Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR'a, Doç. Dr. Gülendamar BOZDAYI'ya, Doç. Dr. Funda DOĞRUMAN AL'a, Işıl FİDAN 'a, teşekkür ederim.

Manevi desteklerini eksik etmeyen, her aşamanın sonucunu benimle birlikte heyecanla bekleyen çok değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Merve AYDIN ve Yüksek Lisans Öğrencisi Bio. Gülcan ADIYAMAN' a teşekkür ederim. İkinci ailem gibi yanımda olan dayım (Hasan ZEYNEL) 'e ve yengem (Berna ZEYNEL)'e ayrıca doktora eğitimim süresince birlikte çalıştığım tüm doktora, yüksek lisans ve tıpta uzmanlık yapan arkadaşlarıma, laboratuvar çalışanlarına bana desteklerinden dolayı teşekkür ediyorum.

Bana her zaman güvenen ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen en değerli varlığım **canım ailem**'e çok teşekkür ediyorum.

ESRA

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Israa Ibrahim Khalil

Soyadı: JABBAN

Doğum Yeri ve Tarih: MUSUL/ IRAK- 1979

Eğitimi:

- 2007-2011 Gazi Üniversitesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Doktora, Ankara,
- 2003-2005 Musul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Yüksek Lisans, Musul,
- 1997-2001 Musul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Lisans Eğitimi, Musul,

Yabancı Dili: Arapça/ İngilizce.

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- Veteriner Hekimleri Birliği, Musul.
- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti.