



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİSYON MAYASI *Schizosaccharomyces pombe*'DE ANTİFUNGAL
İLAÇLARIN ETKİN KULLANIM İÇİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa KAÇMAZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

Mart, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, [3.03.2022] tarihinde aşağıdaki jüri tarafından [Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı], [Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programında] [Yüksek Lisans tezi] olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

[Prof. Dr.] [Bedia PALABIYIK] (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

[Prof. Dr.] [Gülrüh ALBAYRAK]
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

[Dr. Öğr. Üyesi] [Hızlan HINCAL AĞUŐ]
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 37589 numaralı projesi ile desteklenmiştir. |



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini hep arkamda hissettiğim, engin tecrübelerini ve bilgilerini benimle paylaşan danışman hocam Prof. Dr. Bedia PALABIYIK'a,

Tez çalışmam sürecinde her türlü desteği veren Arş. Gör. Burcu KARTAL'a ve sayısız konuda desteklerini esirgemeyen Neşe AKÇAY'a,

Her daim desteklerini hissettiğim ailem ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Mart 2022

[Mustafa KAÇMAZ]

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. MODEL ORGANİZMA OLARAK <i>S. pombe</i>	4
2.2. ANTİFUNGAL İLAÇLAR.....	6
2.3. AZOL ANTİFUNGALLER.....	7
2.3.1. Triazololler	8
2.3.1.1. <i>Flukonazol</i>	8
2.3.1.2. <i>Tettrakonazol</i>	9
2.2.2. İmidazololler.....	9
2.2.2.1. <i>Tiyabendazol</i>	9
2.4. İLAÇ DİRENCİ	10
2.4.1. Azollere karşı ilaç direnci.....	11
2.3.2. <i>S. pombe</i> 'de ilaç direnci	14
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	16
3.1. ORGANİZMA VE BESİYERİ	16
3.1.1. Organizma	16
3.1.2. Besiyeri.....	17
3.2. ORGANİZMANIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI.....	17
3.3. ANTİFUNGAL AJANLARIN <i>S. pombe</i> HÜCRELERİNİN ÜREMESİNİ İNİHİBE EDEN DOZLARININ BELİRLENMESİ	18
3.3.1. <i>Flukonazolün S. pombe</i> yabancı ırkı (<i>ED666</i>)'nın MİK için farklı derişimlerde kullanılması.....	19

3.3.2. Tiyabendazolün <i>S. pombe</i> yabancı ırkı (ED666)'nın MİK için farklı derişimlerde kullanılması.....	20
3.3.3. Tetrakonazolün <i>S. pombe</i> parental ırkı (ED666)'nın MİK için farklı derişimlerde kullanılması.....	20
3.3.4. Flukonazol ile Tetrakonazolün kombine kullanımının <i>S. pombe</i> canlılığı üzerine etkisi.....	21
3.4. RNA İZOLASYONU VE AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ.....	22
3.5. DNaz UYGULAMASI VE cDNA SENTEZİ.....	23
3.5.1. DNaz uygulaması	23
3.5.2. cDNA sentezi.....	24
3.8. PRİMER SENTEZİ VE RT-PZR.....	26
3.8.1. Primer sentezi	26
3.8.2. Primerler için bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi.....	28
3.8.3. RT-PZR	29
3.9. OKSİDATİF STRESİN FLUORESAN MİKROSKOBU İLE HÜCRESEL GÖSTERİMİ	30
4. BULGULAR.....	32
4.1. ANTİFUNGAL AJANLARIN <i>S. POMBE</i> HÜCRELERİNİN CANLILIĞINA ETKİLERİ	32
4.1.1. Flukonazolün hücre canlılığı üzerine etkisi.....	32
4.1.2. Tetrakonaolün hücre canlılığı üzerine etkisi	33
4.1.3. Tiyabendazolün hücre canlılığı üzerine etkisi.....	34
4.1.4. Flukonazol ile Tetrakonazolün kombine uygulamanın hücre canlılığı üzerine etkisi.....	35
4.5. TOTAL RNA İZOLASYONU VE CDNA SENTEZİ.....	37
4.5. RT-PZR SONUÇLARI	39
4.6. HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN (ROT) FLORESAN MİKROSKOPİSİ İLE GÖSTERİMİ.....	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>S. pombe</i> hücrelerinin, (A) haploid hücre yapısı, (B) diploid hücre yapısı, (C)zigotik aski, (D) zigotik olmayan aski yapısı (Hoffman ve diğ., 2015).....	6
Şekil 2.2: Antifungal ilaçların etki mekanizması, a) azollerin etki mekanizması, b) amfoterisin B'nin etki mekanizması, c) ekinokandinlerin etki mekanizması (Revie ve diğ., 2018).....	7
Şekil 2.3: Çeşitli ilaç direnci mekanizmaları ve birbirleriyle olan ilişkileri (Revie ve diğ.,)	11
Şekil 2.4: Ergosterol biyosentez yolağı.....	14
Şekil 2.5: Kullanılan ajanların Minimum İnhibe edici Konsantrasyonlarının belirlenmesi için kullanılan şablon.....	19
Şekil 3.1: Gene Ruler 1kb “DNA Ladder”.	23
Şekil 4.1: Flukonazolün hücre canlılığı üzerine etkisi	33
Şekil 4.2: Tetrakonazolün hücre canlılığı üzerine etkisi.	34
Şekil 4.3: Flukonazol ve Tetrakonazol etken maddelerinin kombine kullanımının hücre canlılığı üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.4: <i>S. pombe</i> ED666 yabani ırkının kontrol ve deney gruplarından izole edilen total RNA'ların elektroforetik görüntüsü .M: 1kb Marker, 1 ve 3: Kontrol grubu, 4: 700 µg/mL, 2 ve 5: 1400 µg/mL flukonazol uygulanmış örnek.....	37
Şekil 4.5: <i>S. pombe</i> ED666 yabani ırkından izole edilen RNA örneklerinin kalıp olarak kullanılan yapılan PZR'nın agaroz jel görüntüsü. M: 1 kb Marker, 1: Pozitif kontrol ve 2:RNA.....	38
Şekil 4.6: cDNA sentez ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü. M: 1kb Marker, 3:Kontrol grubu, 1 ve 4: 700 µg/mL flukonazol uygulanmış örnek, 2 ve 5: 1400 µg/mL flukonazol uygulanmış örnek.....	39
Şekil 4.7: Çalışma kapsamında kullanılan genlerin göreceli anlatımı. a) 700 µg/mL flukonazol uygulanmış örneklerde ifadesi artıp 1400 µg/mL dozunda azalanları, b) her iki dozda da ifadeleri azalanları ve c) her iki dozda da ifadeleri artan genleri göstermektedir.....	40

Şekil 4.8: (a)Parental ve 20mM ve 40mM H ₂ O ₂ uygulanmış parental hücresinin DCFH-DA floresan ve ışık görüntüsü (b) bu grupların ROT yüzdesi.....	42
Şekil 4.9: Flukonazolün IC ₅ ve IC ₁₀ dozlarının uygulandığı hücre suşlarının DCFH-DA floresan ve ışık görüntüleri.....	43
Şekil 4.10: Flukonazolün IC ₅ (700 µg/mL) ve IC ₁₀ (1400 µg/mL) dozlarının uygulandığı hücre suşlarına ait ROT yüzdesi.....	46



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.5: Mutant genlerin listesi ve hücresel süreçteki rolleri.....	15
Tablo 3.1: Çalışma kapsamında kullanılan suşlar ve özellikleri.	16
Tablo 3.2: YES besiyeri içeriği ve konsantrasyonu.	17
Tablo 3.3: : Kullanılan ajanların Minimum İnhibe edici Konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi için kullanılan şablon.....	19
Tablo 3.4: RNA izolasyonunda kullanılan parçalama tamponu ve konsantrasyonu.....	22
Tablo3.5: 1X TAE bileşenleri ve konsantrasyonları.....	23
Tablo 3.6: DNaz uygulaması için kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.....	24
Tablo 3.7: Kontrol PZR’de kullanılan reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları.....	25
Tablo 3.8: Kontrol PZR koşulları.....	25
Tablo 3.9: cDNA sentez için kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.....	25
Tablo 3.10: cDNA sentez koşulları.....	26
Tablo 3.11: Çalışmada kullanılan primerler.....	27
Tablo 3.12: Primerlerin uygun bağlanma sıcaklığı için PZR’de kullanılan reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları.....	29
Tablo 3.13: PZR koşulları.....	29
Tablo 3.14: RT-PZR için kullanılan bileşenleri ve konsantrasyonları.....	30
Tablo 3.15: RT-PZR koşulları.....	30

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

μ	: mikro
~	: yaklaşık değer
$^{\circ}\text{C}$: derece
-	: eksi
+	: artı
%	: yüzde
&	: ve
α	: alfa
β	: beta
Δ	: delta
∞	: sonsuzluk
=	: eşittir

Kısaltmalar Açıklama

$^{\circ}\text{C}$: Santigrat
Ct	: “Crossing threshold”
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
ABC	: ATP bağlayıcı kaset
ATP	: Adenozintrifosfat
cDNA	: Komplementer DNA
DCFH-DA	: Dikloroflororeskin diasetat
DEPC	: Dietil pirokarbonat
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DNaz	: Deoksiribo nükleaz
dNTP	: Deoksiribonükleotid
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit

F	: “Forward”
g	: Gram
GC	: Guanin-Sitozin
HMG Co-A	: “Haemoglobin coenzym-A”
KanMX4	: Kanamisin direnç
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MFS	:Majör kolaylaştırıcı süper ailesi
NADH	: Nikotinamin dinükleotid
ns	: Anlamsız
OD	: Optik yoğunluk
P	: P değeri
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: “Potential of hydrogen”
PZR	: Gerçek zamanlı PZR
R	: “Reverse”
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
RNAi	: RNA interferans
rpm	: “revolutions per minute”
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
sn	: Saniye
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
VEGF	: Vasküler Endotelyal Gelişme Faktörü
YES	: “Yeast Extract with Supplements”

ÖZET

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[FİSYON MAYASI *Schizosaccharomyces pombe*'de ANTİFUNGAL İLAÇLARIN ETKİN KULLANIM İÇİN ARAŞTIRILMASI]

[Mustafa KAÇMAZ]

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

[Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı]

Danışman : [Prof. Dr.] [Bedia PALABIYIK]

Fırsatçı mantar patojenlerinin neden olduğu fungal enfeksiyonlar insan ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir. Patojenik mantarlardan *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* ve *Pneumocystis* türlerinin neden olduğu invaziv fungal enfeksiyonların dünya çapında yol açtığı morbidite ve mortalite oranı ciddi bir tehlike oluşturmaktadır. Sistemik mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için başlıca üç sınıf antifungal ilaç kullanılmaktadır. Bunlar ergosterol biyosentezini hedefleyen azoller, mantar hücre duvarı biyosentezini engelleyen ekinokandinler ve mantar hücre zarında hücre parçalanmasına yol açan ve ergosterole bağlanan polienlerdir. Son yıllarda bu ilaçların düzensiz, uzun süreli ve dikkatsiz kullanımı, söz konusu patojenlerin zaman içinde direnç kazanmasına yol açmıştır. Antifungal ilaç direncinin altında yatan nedenler olarak, ilaç hedef değişikliği veya aşırı ekspresyonu, çoklu

ilaç taşıyıcılarının yukarı regülasyonu ve stres tepkilerinin aktivasyonu gibi çok sayıda adaptif mekanizma bulunmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında 19 yeni aday gen ve literatür taramasından flukonazol hedefi *erg11* geni dahil flukonazole direnç ile ilişkili 5 genin antifungal ilaç direncindeki rolleri araştırıldı. Bu amaçla, patojenik funguslarla çok fazla ortak özellik paylaşan fisyon mayasının (*Schizosaccharomyces pombe*) ED666 yabancı suşu ve ele alınan genler bakımından delesyonlu 21 suş (*SPAC22H10.09*, *bun107*, *mug166*, *nnt1*, *nas2*, *yih1*, *hrk1*, *SPAC4H3.06*, *msh1*, *rpb9*, *qcr8*, *rsv2*, *srp14*, *clp1*, *bgs4* ve *plh1*, *rhp18*, *SPCC338.06c*, *SPBC27B12.05* *phb2* ve *erg31*) çalışma materyali olarak kullanıldı. Bu kapsamda, *S. pombe* ED666 ırkında, üç farklı antifungal ajanın (flukonazol, tetrakonazol ve tiyabendazol) ayrı ayrı ve flukonazol ve tetrakonazol kombine şekilde kullanılarak minimum inhibe edici konsantrasyonları (MİK) hesaplandı. Hücrelerin bu ajanlar arasında flukonazole karşı MİK'in üzerindeki değerlerde hücre duvarı içeriğini değiştirerek üremeye devam ettiği paradoksiyal etki gözlemlendi. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen ileri analizlerde sadece flukonazolün üremenin seyrinin değişime başladığı konsantrasyonlar olan IC₅ ve IC₁₀ değerleri *S. pombe* yabancı suşunda kullanıldı. Buna göre, bazı genlerin (*SPAC22H10.09*, *bun107*, *mug166*, *nnt1*, *nas2*, *yih1*, *SPAC4H3.06*, *msh1*, *rpb9*, *qcr8*, *rsv2*, *erg6* ve *erg9*) transkripsiyon seviyeleri IC₅ dozunda artarken, IC₁₀ dozunda azaldığı gözlemlendi. Buna karşın, diğerlerinin her iki dozda azalan (*srp14*, *clp1*, *bgs4* ve *phb2*) ve artan (*plh1*, *erg11* ve *erg31*) seviyeleri tespit edildi. Parental ve mutant suşlarda kayda değer bir ROT artışı gözlemlenmedi. Bu sonuç, dirençli suşlarda ROT seviyesinin düşük olmasıyla uyumludur. Sonuç olarak, *SPAC22H10.09*, *bun107*, *mug166*, *nnt1*, *nas2*, *yih1*, *SPAC4H3.06*, *msh1*, *rpb9*, *qcr8*, *rsv2*, *srp14*, *clp1*, *bgs4*, *plh1* ve *phb2* genlerinin ilk defa bu tez çalışmasında ilaç direnci ile ilişkisi ortaya konurken, dirençte bu genlerin aşağı düzenlenmiş olmalarının da rolü olduğu önerilmektedir.

Mart 2022, 74 sayfa.

Anahtar kelimeler: Fungal enfeksiyon, antifungal direnç, azoller, *Schizosaccharomyces pombe*.

SUMMARY

[]

[M.Sc. THESIS]

INVESTIGATION OF ANTIFUNGAL DRUGS FOR EFFECTIVE USE IN FISSION YEAST *Schizosaccharomyces pombe*

[Mustafa KAÇMAZ]

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

[Department of Molecular Biology and Genetics]

Supervisor : [Prof. Dr.] [Bedia PALABIYIK]

[Fungal diseases caused by opportunistic fungal species, it is one of the leading causes of deaths, especially in individuals suffering from certain health problems or immunosuppressive therapy. The worldwide morbidity and mortality rate caused by invasive fungal infections from pathogenic fungal species such as *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* and *Pneumocystis* poses a serious threat. There are three main classes of antifungal drugs used in the treatment of systemic fungal infections. These are azoles that target ergosterol biosynthesis, echinocandins that inhibit fungal cell wall biosynthesis, and polyenes that bind to ergosterol in the fungal cell membrane and cause cell lysis. Recently, the irregular, long-term and careless use of these drugs has led to the resistance of pathogens over time. There are many underlying causes of antifungal drug resistance, including adaptive mechanisms

such as drug target change or overexpression, upregulation of multiple drug transporters, and activation of stress responses. Within the scope of this thesis study, the roles of 19 new candidate genes and 5 fluconazole resistance-related gene from literature review, including fluconazole target *erg11* gene, in antifungal drug resistance were investigated. In this context, *ED666* parental strain of fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*), which shares much in common with pathogenic fungi, and 21 strains with deletions in various genes (*SPAC22H10.09*, *bun107*, *mug166*, *nnt1*, *nas2*, *yih1*, *hrk1*, *SPAC4H1*, *rpb9sh*), *qcr8*, *rsv2*, *srp14*, *clp1*, *bgs4* and *plh1* *rhp18*, *SPCC338.06c*, *SPBC27B12.05*, *phb2* and *erg31*) were considered as study material. In this context, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of three different antifungal agents (fluconazole, tetraconazole and thiabendazole) in *S. pombe ED666* strain were calculated separately and in combination with fluconazole and tetraconazole. A paradoxical effect was observed in which the cells continued to reproduce by changing the cell wall content at values above the MIC against fluconazole among these agents. In the further analyzes performed within the scope of this thesis, only the IC₅ and IC₁₀ values, which are the concentrations at which the growth rate of fluconazole begins to change, were used in *S. pombe ED666* wild type. Accordingly, while the transcription levels of some genes (*SPAC22H10.09*, *bun107*, *mug166*, *nnt1*, *nas2*, *yih1*, *SPAC4H3.06*, *msh1*, *rpb9*, *qcr8*, *rsv2*, *erg6* ve *erg9*) were upregulated on IC₅ dose, downregulated on IC₁₀. In contrast, downregulated (*srp14*, *clp1*, *bgs4* and *phb2*) and upregulated (*plh1*, *erg11* and *erg31*) levels of the other genes were detected at both doses. No significant increase in ROT was observed in parental and mutant strains. This result is compatible with the low level of ROT in resistant strains. In conclusion, the relationship of *SPAC22H10.09*, *bun107*, *mug166*, *nnt1*, *nas2*, *yih1*, *SPAC4H3.06*, *msh1*, *rpb9*, *qcr8*, *rsv2*, *srp14*, *clp1*, *bgs4*, *plh1* ve *phb2* genes with drug resistance was revealed for the first time in this thesis study. It is suggested that down-regulation of these genes also plays a role in resistance. |

March 2022, |74| pages.

Keywords: | Fungal infection, antifungal resistance, azoles, *Schizosaccharomyces pombe*. |

1. GİRİŞ

Modern tıptaki gelişmelere paralel olarak, çeşitli insan hastalıklarının tedavisinin yanı sıra, bulaşıcı hastalık salgınlarının da sınırlanmasına karşın bir tarftan insan ömrü uzarken diğer tarftan da fırsatçı mantar patojenleri, özellikle altta yatan sağlık sorunları olan veya immünosupresif tedavi gören bireylerde, insan ölümlerinin önde gelen nedenlerini oluşturmaktadır (Brown ve diğ., 2012). Patojenik funguslardan *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* ve *Pneumocystis* türlerinden kaynaklanan invaziv fungal enfeksiyonların dünya çapında neden olduğu yüksek morbidite (hastalık) ve mortalite (ölüm) oranı ciddi bir tehlike oluşturmaktadır (Revie ve diğ., 2018) Mantar patojenleri sadece insanları doğrudan etkilemekle kalmaz, aynı zamanda insanları besleyen ekinlerin kitlesel yıkımı ve ayrıca gıda kaynaklarını kirleten ve kanser gelişimine yol açan toksinleri üreterek gıda güvenliğini de tehlikeye atmaktadır (Fisher ve diğ., 2012).

İnsan patojenlerinin neden olduğu sistemik mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için başlıca üç sınıf antifungal ilaç kullanılmaktadır. Bunlar ergosterol biyosentezini hedefleyen azoller, mantar hücre duvarı biyosentezini engelleyen ekinokandinler ve mantar hücre zarında hücre lizisine yol açan ve ergosterole bağlanan polienlerdir (Perfect, 2017; Robbins ve diğ., 2017). Son yıllarda bu ilaçların düzensiz, uzun süreli ve dikkatsiz kullanımı, söz konusu patojenlerin zaman içinde direnç kazanmasına yol açmıştır. Antifungal ilaç direncin altında yatan nedenler olarak, ilaç hedef değişikliği veya aşırı ekspresyonu, çoklu ilaç taşıyıcılarının yukarı regülasyonu ve stres tepkilerinin aktivasyonu gibi çok sayıda adaptif mekanizma bulunmaktadır (Shapiro ve diğ., 2011). Sınırlı sayıdaki antifungal ajan, çoklu ilaca dirençli mantar türlerinin ortaya çıkmasıyla daha da tehdit altındadır.

Bu tez çalışmasında 3 farklı antifungal ajan kullanıldı. Bunlardan ikisi triazol antifungal ilaç sınıfına ait flukonazol ve tetrakonazol'dür diğeri ise benziimidazol türevi tiyabendazol'dür. Triazol, Erg11 gen ürünü ve ergosterol biyosentezinden sorumlu enzim olan sitokrom P-450 lanosterol C-14 alfa-demetilaz'ın heme yapısındaki demire bağlanarak inhibe eder ve böylelikle hücre duvarı ana bileşenlerinden olan ergosterolün biyosentezini bloke eder. Bu durum toksik olan 14 alfa-metil sterollerinin birikmesine, membran geçirgenliğinin azalmasına, normal mantar sterollerinin kaybına ve fungistatik veya fungisidal aktiviteye

neden olur. Tiyabendazol ise, mikrotübül polimerizasyonunun inhibisyonuna neden olur ve spesifik mitokondriyal fumarat redüktaz enzimini inhibe ederek, sitrik asit döngüsünü, mitokondriyal solunumu ve ardından ATP üretimini inhibe eder.

Bu çalışmada, Palabıyık ve diğ., (2020)'nin "İnsan hastalıklarının moleküler mekanizmalarının araştırılmasında *Schizosaccharomyces pombe*'nin model organizma olarak kullanılmasının optimizasyonu" başlıklı ve 51649 kodlu BAP projesinden elde edilen bulgular ışığında çeşitli mekanizmalardan (ergosterol biyosentezi, membran, ubikitinasyon, sinyal iletimi, transkripsiyon ve tranlasyonun düzenlenişi, hücre duvarı biyogenezi ve organizasyonu, mitokondriyal fonksiyon, kinaz, fosfataz, DNA onarımı ve lipid metabolizması,) sorumlu 16 gen ve literatür taramasından flukonazol hedefi *erg11* geni ve flukonazolle ilişkili 4 genin antifungal ilaç direncindeki rolleri araştırıldı. Bu amaçla, patojenik funguslarla birçok ortak özellik paylaşan ve model organizma olarak kullanılan fisyon mayası (*Schizosaccharomyces pombe*) çalışma materyali olarak kullanıldı. Üç farklı antifungal ajanın (flukonazol, tetrakonazol ve tiyabendazol) ayrı ayrı ve flukonazol ile tetrakonazol kombine olarak bu organizma üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu kapsamda, öncelikle, her üç ajanın minimum inhibe edici konsantrasyonları (MİK) hesaplandı. Çalışmaya sadece flukonazol ile devam edildi. Yeni aday ve bilinen hedef genlerinin anlatım profilleri, *S. pombe* yabani ırkında iki farklı flukonazol dozunda ($IC_5=700$ ve $IC_{10}=1400$ $\mu\text{g/mL}$) çıkarıldı. Daha sonra, ele alınan genlerin *S. pombe* mutantlarında hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) DCFH-DA boyama yöntemi ile belirlendi.

Flukonazol uygulanmış örneklerde, hücrelerin üreme yeteneğinde doza bağlı bir azalma gözlenmiş olsa da, hücreler flukonazole karşı MİK'in üzerindeki dozlarda aktivite gösterdikleri paradoksiyal etki gözlemlendi. Tetrakonazol uygulanmış hücrelerde doz artışına bağlı üreme yeteneğinde azalma gözlemlendi. Tetrakonazolün IC_5 , IC_{10} ve IC_{20} dozları flukonazolün, IC_5 dozuyla üremeyi önleyici etki sergilerken IC_{10} dozunda üremeyi baskılamadı. Sonraki adımlara flukonazol'ün IC_5 (700 $\mu\text{g/mL}$) ve IC_{10} (1400 $\mu\text{g/mL}$) dozları ile devam edildi. Genlerin anlatım profili, *S. pombe* yabani ırkına (*ED666*) flukonazol'ün IC_5 ve IC_{10} dozları 2 saat uygulanarak elde edildi. Bazı genlerin (*SPAC22H10.09*, *bun107*, *mug166*, *nnt1*, *nas2*, *yih1*, *SPAC4H3.06*, *msh1*, *rpb9*, *qcr8*, *rsv2*, *erg6* ve *erg9*) IC_5 dozunda artarken IC_{10} dozunda azaldığı gözlemlendi. Buna karşın diğerlerinin her iki dozda azalan (*srp14*, *clp1*, *bgs4* ve *phb2*) ve artan (*plh*, *erg11* ve *erg31*) seviyeleri tespit edildi. Parental ve mutant

suşlarda kayda değer bir ROT artışı gözlemlenmedi. Bu sonuçlar dirençli suşlarda ROT seviyesinin düşük olmasıyla uyumludur. |



2. GENEL KISIMLAR

2.1. MODEL ORGANİZMA OLARAK *S. pombe*

Fisyon mayası olarak da bilinen *Schizosaccharomyces pombe*, mantarlar aleminin iki ana grubundan biri olan Ascomycetes sınıfından tek hücreli ökaryotik bir mikroorganizmadır. Swahili dilinde “bira” anlamına gelen bu maya (Lindner, 1893) haploid ve diploid formlarında bulunur. Çubuk şekilli ~7-14 µm uzunluğunda ve ~4µm genişliğindedir. Ortadan ikiye bölünerek çoğaldığından “fisyon mayası” olarak adlandırılmıştır (Mitchinson, 1970; Wilhelm, 2008). Hızlı bir yaşam döngüsü vardır, minimal ve kompleks besiyerinde bölünme süresi yaklaşık 2-4 saat arasında vejetatif olarak ve ortalama 25°C-36°C arasında büyür.

İlk defa 1890'ların başlarında, onu ayrıntılı olarak tanımlayan ilk kişi olan Paul Lindner'in gözetiminde Ziedler tarafından Afrika darı birasından izole edildi. Lindner, onu tomurcuklanan mayadan (*Sacharomyces cerevisiae*) ayırmak için *Schizosaccharomyces* adını verdi (çünkü fisyon yoluyla vejetatif olarak çoğalır). Genetik çalışmalarda ilk defa Leupold tarafından kullanıldı. Leupold, iki homotallik suşu (h^{90} (968) ve h^{40} (o zamandan beri kayıp)) ve iki heterotallik suşu (h^- ve h^+) izole etti ve böylece *S. pombe* için klasik genetik prosedürler geliştirilmeye başlandı (Leupold, 1950). Eşey tipi olarak, lokusta farklı genomik konfigürasyonlara sahip birkaç heterotallik suş vardır ancak genel olarak laboratuvarında kullanılan iki suş vardır: h^{+N} (975) ve h^{-S} (972). 1970'lerin ortalarında ise Nurse *S. pombe*'de Lee Hartwell ise Mitchinson'un laboratuvarında *S.cerevisiae*'da *cdc* (hücre bölünmesi döngüleri) mutantlarında genetik ve hücre döngüsü çalışmalarına başlamıştır. Model organizma olarak da ilk defa Mitchinson (1990) tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Uzun bir süre *S.pombe* ile ilgili çalışmalar Leupold ve Mitchinson tarafından yapılmış olsa da, asıl büyük ivme Richard Egel'in mayoza gitme yeteneği olmayan mutant suşu elde etmesiyle başlamıştır (Hoffman ve diğ., 2015).

Uygun koşullarda *S. pombe* eşleşme için feromonlar üretir; h^- M faktörü h^+ ise P faktörü sentezler. Nitrojen seviyelerindeki düşüş hücreleri G1 seviyesinde tutuklar ve eşleşme için zıt eşeyler feromonlar üreterek hücrelerin diploid forma geçmesini sağlar. Bu zigot premayotik S fazına ilerleyerek dört hücreli askus yapıları oluşturmak için iki ardışık mayoz geçirir. Glukoz

açlığında ise hücreler G2 fazında tutuklanır. Ortama besin ilavesi yapıldığında hücreler normal bölünme durumlarına geçer (Hayles ve Nurse, 2018).

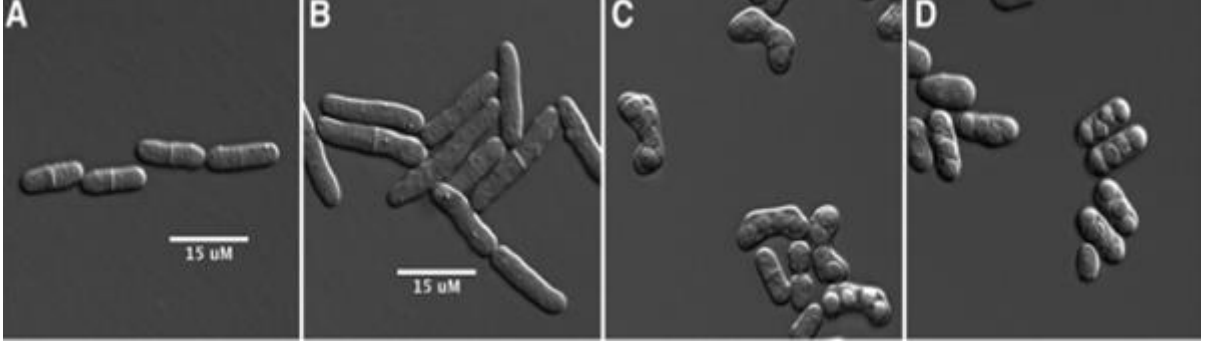
S. pombe'nin genetik dizilimi "Sanger enstitüsü" tarafından 2002'de tamamlanmış olup genomu sekanslanan 6. ökaryotik model organizmadır (Wood ve diğ., 2002). 13.8 Mb baz çifti uzunluğunda olan genomunda 3 kromozomda (sırasıyla herbiri 5.7, 4.6 ve 3.5 Mb) ve 5054 protein kodlayan gen vardır (*S. cerevisiae* 5821). 5054 bilinen fisyon mayası proteinlerinden şu anda 2154'ü yayınlanmış bir biyolojik işleve sahiptir, 2050'si deneysel olarak karakterize edilmiş bir ortologdan (genellikle tomurcuklanan mayadan) çıkarılan biyolojik bir role sahiptir ve 850 tanesinin bilinen biyolojik bir rolü yoktur ve *S. pombe* genlerinin %67'si insanda korunmuştur.¹ (Wood ve diğ., 2002). Bunlardan 338 tanesi *S. cerevisiae*'de kaybolmuş olup insanlarla *S. pombe* arasında korunmuştur.

S. pombe, *S. cerevisiae*'den yaklaşık 350 milyon yıl önce ayrılmasının karşın *S. pombe* antik maya atasının daha fazla özelliğini korumuştur ve böylece metazoa ile daha fazla ortak özelliği paylaşır (Hoffman ve diğ., 2015). Hatta, HMG-CoA redüktaz protein dizisinin filogenetik analizi bu ayrılmanın daha da eskiye dayandığını gösteriyor (Lum ve diğ., 1996). *S. cerevisiae*'de yüksek organizmalarda retrotranspozon ifadesini düzenleyen RNAi (RNA interferans)'nın yokluğu intron kaybına yol açan ters transkriptaz aktivitesindeki artışla ilişkili olduğu düşünülüyor (Tabara ve diğ., 1999). Bu, hem intron varlığı hem de RNAi varlığı bakımından *S. pombe*'nin neden metazoolara *S. cerevisiae*'den daha yakın olduğunu açıklıyor (Hoffman ve diğ., 2015).

Kısaca, tek hücreli bir ökaryot olması, gen-işlev analizine ortam sağlayan mutasyonların kolaylıkla eldesi ve takibinin yapılabilmesi, haploid (Şekil 2.1.A), diploid (Şekil 2.1.B), aski (Şekil 2.1.C) ve zigotik olmayan aski (Şekil 2.1.D) yaşam formları ile genetik çalışmaların güvenli bir şekilde gerçekleştirilmesi ve homolog rekombinasyon sırasında DNA tamiri ile yeni allel kombinasyonlarının yönlendirilmeye açık olması, *S. pombe*'yi başta temel bilimler, özellikle moleküler ve hücresel biyoloji olmak üzere sağlık, gıda, çevre ve biyoteknoloji gibi önemli bilimsel alanlarda kullanılabilen önemli bir model organizma haline getirmiştir. Bazı çevreler, *S. pombe*'nin memeli hücrelere olan yakın ilişkisinden dolayı, onu mikro-memeli olarak tanımlamıştır (Forsburg ve Rhind, 2006). Ayrıca *S. pombe* oldukça aktif homolog

¹ www.Pombase.org/[Ziyaret tarihi:20/04/2021]

rekombinasyon mekanizmalarına sahip olması araştırmacılara, rekombinasyon sırasında DNA tamiri ve yeni allel kombinasyonları hakkında bilgi sağlar.

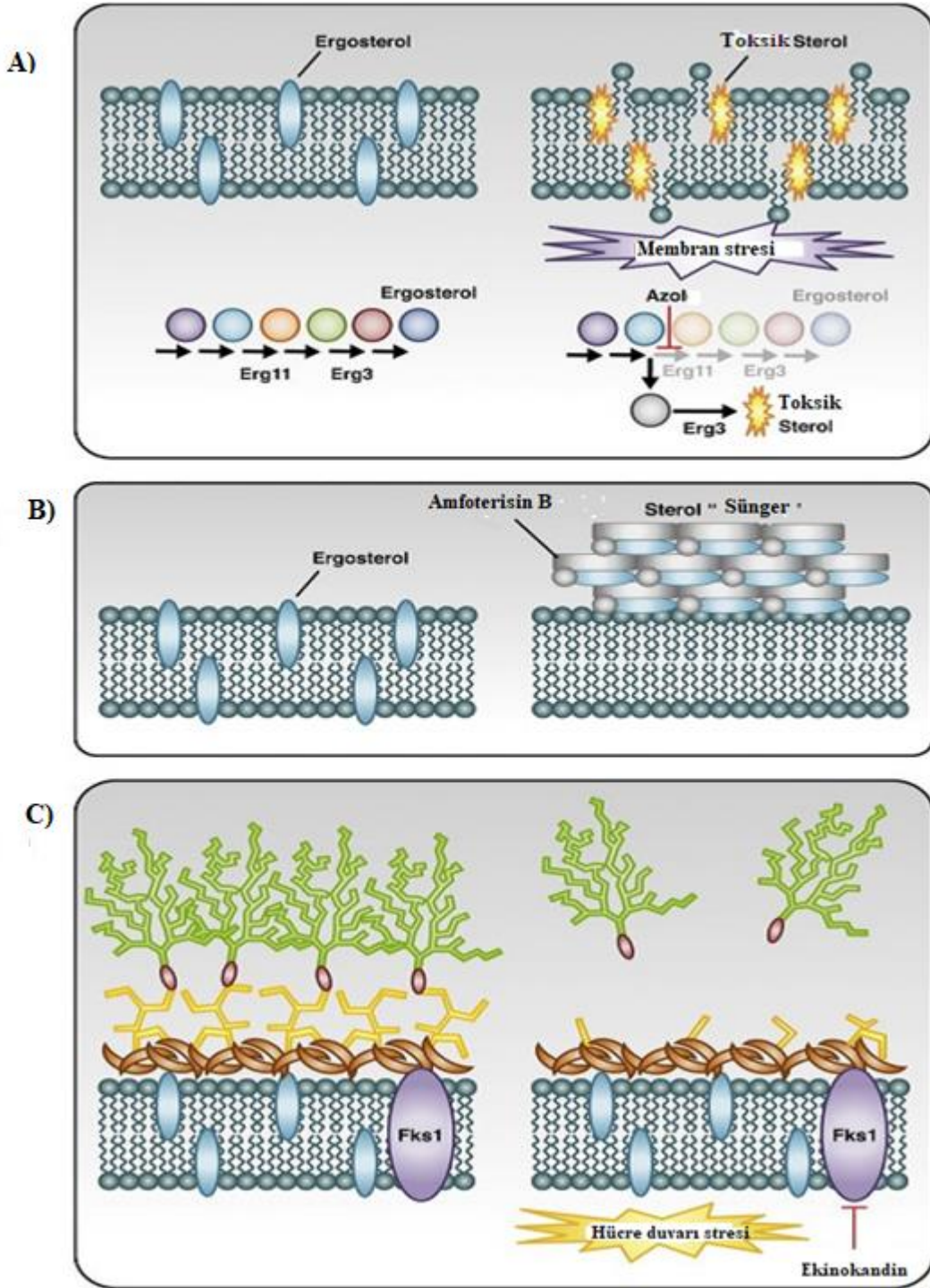


Şekil 2.1: *S. pombe* hücrelerinin, (A) haploid hücre yapısı, (B) diploid hücre yapısı, (C)zigotik aski, (D) zigotik olmayan aski yapısı (Hoffman ve diğ., 2015).

2.2. ANTİFUNGAL İLAÇLAR

Fırsatçı ve patojenik mantarlardan, başlıca *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Pneumocystis* türlerinin neden olduğu fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bu ilaçlar ilk olarak 1953'te geliştirilmiştir (Amfoterisin B) (Dutcher, 1968). Bu ilaçlar fungisidal (öldürücü) veya fungistatik (üremeyi durdurucu) etkiye sahip olabilirler.

Antifungal ilaç sınıfları şunları içerir: Başlıca polienler, azoller ve ekinokandinlerdir. Ayrıca, allilaminler ve flusitozin de kullanılan diğer antifungal ilaç sınıflarıdır. Azoller, (örn., Flukonazol, vorikonazol ve posakonazol) ergosterol biyosentez yolağındaki Erg11 gen ürünü olan P450 lanosterol demetilaz enzimini inhibe edip yerine toksik sterollerin geçmesine neden olarak hücre duvarı geçirgenliğine neden olarak fungistatik veya fungisidal aktiviteye neden olurlar (Şekil 2.2.A). Polienler, (örn., Amfoterisin B) hücre duvarındaki ergosterolü hedefleyerek hücre duvarının fonksiyonunu bozan geniş gözenekler oluştururlar (Şekil 2.2.B). Son olarak, Ekinokandinler (kaspofungin, anidulafungin ve mikafungin), mantar hücre duvarının önemli bir yapısal bileşeni olan ve Fks1 tarafından kodlanan β -1,3-D glukanın biyosentezini inhibe eden hücre duvarı aktif ajanlardır (Şekil 2.2.C).



Şekil 2.2: Antifungal ilaçların etki mekanizması, a) azollerin etki mekanizması, b) amfoterisin B'nin etki mekanizması, c) ekinokandinlerin etki mekanizması (Revie ve diğ., 2018).

2.3. AZOL ANTİFUNGALLER

Azoller, ana hedefleri hemoprotein olan ve ergosterolün sentezinden sorumlu enzim olan lanosterol 14- α demetilaz enziminin yapısındaki demire azol halkasının N-heterosiklik

nitrojenini bağlayarak O₂ fiksasyonunun inhibitörü olarak davranırlar (Podust ve diğ., 2001). Bu antifungal ilaçlar enzimin aktif bölgesindeki heme kofaktörüne bağlanarak lanosterolün demetilasyonunu önlerler. Bu durum, hücre zarında hayati rolü olan ergosterolün bozulmasına ve hücre fizyolojisindeki bozukluklara ve sonuç olarak hücrenin dış etkenlere ve tehditlere açık hale gelmesine neden olur. Klinikte; fırsatçı enfeksiyonlar, kandidiyaz ve mikoz gibi fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ve antifungal ilaçların en büyük grubu olan bu ilaçlar 1960'larda geliştirilmeye başlandı. Genel etki mekanizmaları, ergosterol biyosentezinde rol alan 14 α - lanosterol demetilaz enziminin inhibisyonu sağlar böylece duyarlı maya hücrelerinin membranında ergosterol yerine toksik 14 α - metillenmiş steroller birikir.

Ayrıca azoller, stresle aktive edilen MAP kinaz olan Styl'in fosforilasyonunu uyarır bu da Atf1 yoluyla CRE (cAMP tepki elementi) aracılı transkripsiyonu aktive eder. Atf1 ve MAP kinaz yolağı, azollerin antifungal aktiviteleri için gereklidir (Lingling ve diğ., 2015). Ergosterol, hücre için birçok hayati işleve sahiptir; Membran akışkanlığı ve bütünlüğü, besin taşınması ve kitin senteziyle ilişkili zara bağlı enzimlerin uygun işlevi görmesinde birçok hücrenel süreçte rol alır. Ergosterol sentezinin inhibisyonu, Sre1 tarafından düzenlenen ve lipid homeostazisinde rol alan birçok genin ifadesindeki değişimle ilişkilidir (Hughes ve diğ 2005; Porter ve diğ., 2010). Ayrıca *S. cerevisiae*'de salgı vesiküllerin majör bileşeni ve mitokondriyel solunumda önemli rol oynar (Lupetti ve diğ., 2002).

2.3.1. Triazoller

Triazoller, ana hedefleri olan ve Erg11 geni tarafından kodlanan ayrıca ergosterolün yapımından sorumlu enzim olan lanosterol 14- α demetilazı hedefler. Hedefleri olan ergosterol biyosentezi engellendiğinde, hücreler dış tehditlere karşı savunmasız hale gelir. Triazoller, vorikonazol hariç fungistatik aktivite gösterir (Martins ve diğ., 2019). Fakat doza bağlı olarak bu değişebilir. Diğer azollerin çoğu da fungistatik eğilimde olsalar da bazıları doza ve suşa bağlı olarak fungisidal veya fungistatik olabilir (Belenky ve diğ., 2013).

2.3.1.1. Flukonazol

Flukonazol² (2-(2,4-difluorfenil)-1,3-bis(1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol), antifungal aktiviteye sahip sentetik bir triazoldür. Flukonazol, Erg11 geni tarafından sentezlenen ve mantar

² www. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [Ziyaret tarihi:20/04/2021]

sitokrom P-450 sterol C-14 alfa-demetilaz'ın heme yapısındaki demire bağlanarak inhibe eder böylece mantar toksik 14 alfa-metil sterollerinin birikmesine, normal mantar sterollerinin kaybına, hücre zarı geçirgenliğinin artmasına ve fungistatik aktiviteye neden olur. Flukonazolün, *Candida albicans*, *Candida glabrata* *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* ve *Cryptococcus neoformansa* karşı fungistatik aktivite gösterdiği, mantar enfeksiyonlarını iyileştirdiği gösterilmiştir. Mantar hücrelerinde steroidal inhibisyon, hücre duvarı sentezi ve büyümesinin yanı sıra hücre adezyonunu etkileyerek mantar enfeksiyonlarını ve semptomlarının tedavisinde kullanılan önemli ve hayati bir ilaç olması klinikte en çok kullanılan etken maddelerden biri olmasını sağlamıştır.

2.3.1.2. Tetrakonazol

Triazol grubundan (1-[2-(2,4-diklorofenil)-3-(1,1,2,2-tetrafluroetoksi) propil]-1,2,4-triazole) olan bu ilaç, daha çok tarımda fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir fungisid ilacıdır. Tarımsal uygulamalarda, ahşap, plastik veya diğer malzemeler üzerinde, yüzme havuzlarında vb. mantarların büyümesini engelleyen veya onları öldüren bir kimyasaldır.

Triazol, öncelikle hücre büyümesine, özellikle de hücre duvarları sentezine müdahale ederek işlev görür. Bu mantar öldürücüler, hücre zarlarında ergosterol biyosentezini durdurur.

2.2.2. İmidazoller

İmidazoller heterosiklik bileşikler sınıfından çeşitli fiziksel ve kimyasal işlevlere sahip ajanlardır. Geniş spektrumlu aktiviteleri ve son yapılan çalışmalarla etkinliği umut verici olan bu ajanlar, biyoyararlanım, dokulara iyi penetrasyon ve düşük miktardaki yan etkileri nedeniyle birçok mantar hastalığının tedavisinde kullanılan önemli antifungal ajan grubunu içerir (Rani ve diğ., 2013). Başlıca bu gruptaki antifungal ajanlar; tiyabendazol, klotrimazol, izokonazol, oksikonazol, sulkonazol, ekonazol, ketokonazol, mikonazol ve tiokonazol vd.

2.2.2.1. Tiyabendazol

Tiyabendazol (TBZ; 4- (1 H-1,3-benzodiazol-2-il) -1,3-tiazol), bir mantar önleyici ve anti-helmintik bir ilaçtır. Tiyabendazol, helmint spesifik mitokondriyal enzim fumarat redüktazı inhibe ederek sitrik asit döngüsünü, mitokondriyal solunumu ve ardından ATP üretimini inhibe ederek sonuçta helmintin ölümüne yol açar. Ek olarak, tiyabendazol, beta-tübüline bağlanarak mikrotübül polimerizasyonunun inhibisyonuna yol açar. Ayrıca, Vasküler

Endotelial Gelişme Faktörü (VEGF) geninin transkripsiyon ve tranlasyonunu inhibe ederek anjiyogenez inhibisyonu, metastatik melanoma proliferasyonun önlenmesi ve kanser tedavilerinde kullanılır. Membran polarite ve bütünlüğünü bozarak hem apoptoz hem de nekrozu uyarır

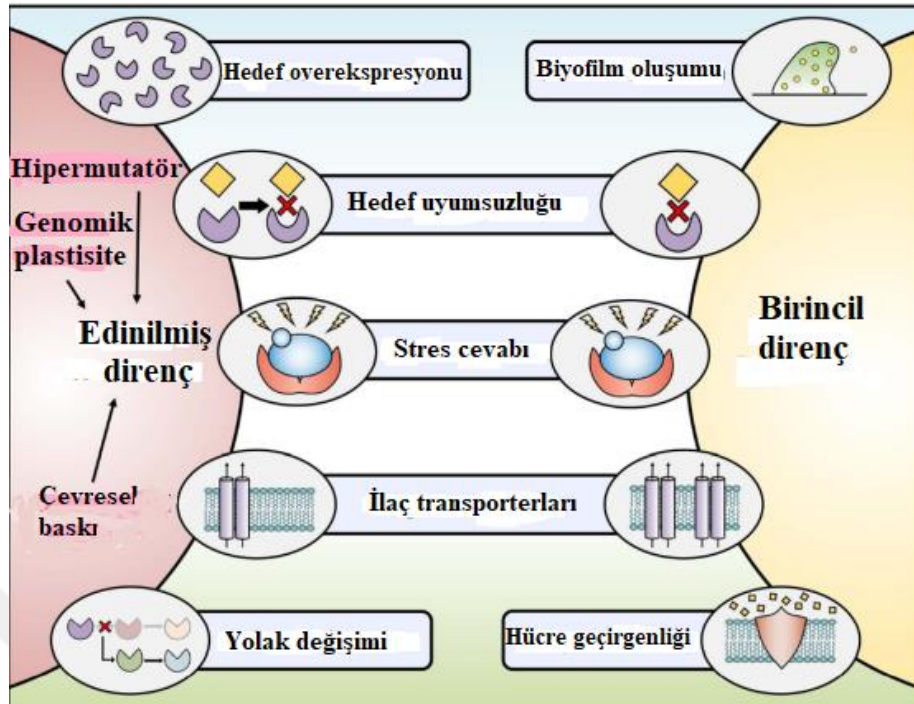
2.4. İLAÇ DİRENCİ

Çeşitli mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların düzensiz, uzun süreli ve dikkatsiz kullanımı, mikroorganizmaların bu ilaçlara zaman içinde direnç kazanmasına yol açmış ve bunların tedavisi için farklı ilaçlara ya da ilaç hedeflerine gereksinim duyulmuştur. Antifungal direnç, mikrobiyolojik veya klinik olarak tanımlanabilir. Mikrobiyolojik direncin, bir antimikrobiyal ajanın patojenin büyümesini yalnızca yabani tip suşlar için gözlemlenen aralıktan daha yüksek konsantrasyonlarda engellediği zaman meydana geldiği söylenmektedir. Klinik direnç, enfekte eden organizmanın yalnızca daha yüksek bir terapötik başarısızlık olasılığı ile bağlantılı bir antimikrobiyal ajan konsantrasyonu tarafından inhibe edildiği durum tarafından belirlenir (Pfaller, 2012).

Bu direncin altında yatan temel nedenlerin başında, ilacı hücre dışına pompalayan ABC ve MFS adlı dışarı akış pompalayan genlerin aşırı ifadesi gelmektedir. Diğerleri, ilacın hedefi tanıyamamasını ve inhibe edecek düzeyin altında kalmasını sağlayan gen ifadesindeki değişimler, metabolizma modifikasyonları, yeni işlev kazanımı ya da bu duruma tepki olarak ifade edilen genlerin ekspresyonundaki artış, bu durumdan sorumlu genin kopya sayısının artması, fenotipik değişimler, biyofilm oluşumu (Şekil 2.3), ilaca erişimin kolaylaşması ve uluslararası seyahatin yaygınlaşması gibi durumlar ilaç direncinin gelişmesi ve yaygınlaşmasına yol açan birkaç nedenden bazıları olarak sıralanabilir,

İlgili ilaca karşı kazanılan direncin üstesinden gelebilmek için, aynı veya farklı mekanizmaya etki eden farklı ilaçların kullanımını içeren kombine ilaç kullanımı, birçok çalışmada etkinliği kanıtlanmış bir yöntemdir. Antifungal duyarlılık testleri çoğunlukla CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü) ve EUCAST (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi) gibi uluslararası kabul edilen standart yöntemlerle belirlenir.

Antifungal direnç mekanizmaları, ilgili ilacın antifungal mekanizmasına müdahale eden veya hedef ilaç seviyelerini düşüren mantar patojeninin içsel veya edinilmiş özellikleri ile ilgilidir.



Şekil 2.3: Çeşitli ilaç direnci mekanizmaları ve birbirleriyle olan ilişkileri (Revie ve diğ., 2018).

2.4.1. Azollere karşı ilaç direnci

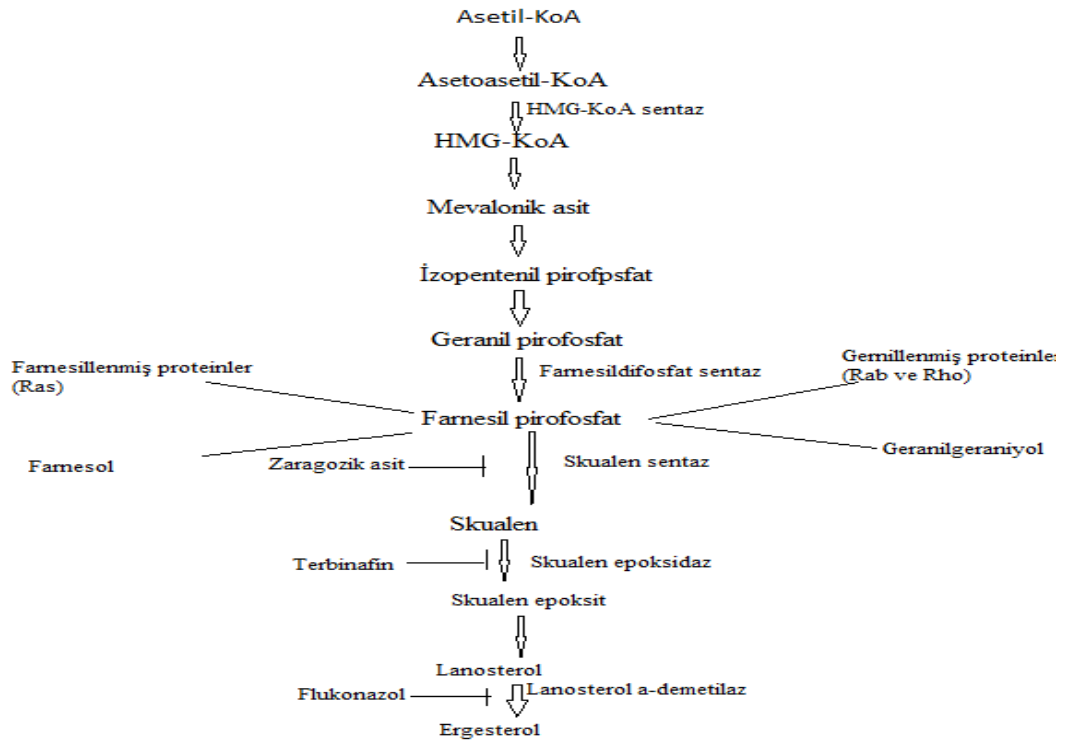
Azol direncinin ortaya çıkması, genellikle dirençte zamanla kademeli artışlarla ve büyük oranda hücre zarındaki akış pompalarını kodlayan genlerin yukarı regülasyonu ile ilişkilidir. Bu akış pompaları, *Candida* ilaç direnci (CDR) ve çoklu ilaç direnci (MDR) (*S. pombe* ortoloğu *gyp2*)³ genleri tarafından kodlanan ABC (ATP bağlayıcı kaset) taşıyıcı ve MFS (majör kolaylaştırıcı süperailisi) taşıyıcı proteinleridir (Higgins, 2009; Sá-Correia ve diğ., 2009). Dizi analiz çalışmaları ile fisyon mayasında 11 ABC ve 49 MFS taşıyıcı protein ailesinin olduğunu göstermiştir. Bu genlerin ifadesi, ekstrasellüler ve intrasellüler alandaki maddenin konsantrasyonuna göre düzenlenir. Bu proteinler, bileşenleri hücre zarı boyunca taşır. Bazıları, Erg11 geninin aşırı ifadesi veya mutasyona uğraması yoluyla ilaçları hücre dışına pompalayarak konsantrasyonlarını ve hücre üzerindeki etkilerini azaltan veya membran potansiyelini değiştirerek maddenin girişi-çıkışı kontrol ederek hücre içindeki fazlalığı dışarı atar ve bir çeşit stres yanıtı gösterirler (Hirata ve diğ., 1994; Balzi ve diğ., 1994; Cowen, 2008).

³ www.Pombase.org/[Ziyaret tarihi:26/05/2021]

Akış pompaları, bileşenleri hücre zarı boyunca taşıyan proteinlerdir. Bazıları ilaçları hücre dışına pompalayarak konsantrasyonlarını ve hücre üzerindeki etkilerini azaltan transporterlardır. Antifungal dirençle ilişkili iki majör akış pompası protein ailesi var: ABC (ATP bağlayıcı kaset, CDR1 tarafından kodlanır (*C.albicans*) ve MFS (Majör kolaylaştırıcı süperailisi) protein ailesi. İlaç direnci genellikle dışarı akış pompalarını kodlayan genlerin yukarı regülasyonu ile ilişkilidir. *Candida* ilaç direnci, gen ailesinin (CDR) ve MDR1'in artmış mRNA seviyeleri, flukonazol'un yanı sıra başka azollere de direnç ile ilişkilendirilmiştir (Schuetzer-Muehlbauer ve diğ., 2003; Morschhäuser, 2007). Hücrelerin antifungal strese verilen başlıca tepkilerinden biri olan ve üzerinde çalışılan her mantarda, ABC taşıyıcılarının azol direncini etkileyebildiği gözlenmiştir. Bu durum, mantar enfeksiyonlarını tedavi etmede önemli bir sorun haline gelir. Bu taşıyıcı proteinler, azol ilaçlarını hücreden dışarı atmak için hareket eder ve böylece toksik seviyelerin birikmesini önler. ABC taşıyıcı proteinin aşırı üretimi, memeli hücrelerinde de ilaç direncinin iyi bilinen bir nedenidir (Holohan ve diğ., 2013). CDR1 mRNA'sının yarı ömrü dirençli izolatlarda diğer duyarlı suşlar ile karşılaştırıldığında üç kat daha yüksek olmasının yanı sıra CDR1 mRNA'sının polyA kuyruğunun da dirençli izolatlarda %35-50 hiperadenile olduğu gösterilmiştir (Manoharlal ve diğ., 2008).

ABC pompalarına ek olarak, proton bağımlı akış pompalarını kodlayan çoklu ilaca dirençli (MDR) geninin artan ekspresyonu, spesifik flukonazol ve diğer azollere karşı direnç ile ilişkilidir. Bu gen transkripsiyon faktörü Mrr1p (çoklu ilaca dirençli düzenleyici) tarafından kontrol edilir ve dirençli klinik suşlarda aşırı ekspresyonu yapılır. Bu genin ürünü olan ve ikinci majör taşıyıcı protein ailesinden MFS proteini azol direncinde önemli bir role sahiptir (Saier ve diğ., 1999). *S.cerevisiae*'de yapılan çalışmalarda bu proteini kodlayan birçok genden sadece Mdr1 geninin azol direncinde rol aldığı gösterilmiştir (Gaur ve diğ., 2008). MFS taşıyıcıları, 12-14 TMS (Trans membran segment)'ye sahiptir ve ilaç akışına güç sağlamak için elektrokimyasal proton hareket gücünü kullanır. Hücre içine ilaç giriş-çıkışını kontrol ederek ilacın hücre içinde birikmesini önleyerek direnç kazandırır. İki gruba ayrılır: DHA1 ve DHA2. MDR1 tarafından kodlanan DHA1'in aşırı ifadesi azol ilaçlarının akışında ve direncinde artışa yol açar. MDR1'in *S.cerevisiae*'deki heterolog ifadesi, flukonazole dirençle ilişkili olduğu ancak diğer azollerle ilişkili olmadığı rapor edilmiştir (Sanglard ve diğ., 1995).

Direnç mekanizmalarından özellikle ERG11 genindeki mutasyonlar ve aşırı ifadesinin yanı sıra ergosterol biyosentez yolağındaki diğer sterollerin seviyesi de dirençte önemli rol alır. Ergosterol, mantar hücre duvarının ana bileşenlerinden biri olup membranla ilişkili proteinlerin akışkanlığı, geçirgenliği ve aktivitelerini yerine getirmede ve membran bölümlendirmesi, endositoz vakuol füzyonu ve feromon sinyalizasyonu gibi süreçlerde aktif olarak rol alır. Birçok genin devreye girdiği kademeli bir süreçle biyosentezi yapılır (Şekil 2.4). Ergosterol sentezi yolağındaki herhangi bir sorun pleiotropik etkilere neden olarak hücre bölünmesi ve stres yanıtında sorunlara ve ölüme sürükleyebilecek durumlara neden olabilir (Noël, 2012, Jord ve Puig 2020). Bu nedenle antifungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak amacıyla geliştirilen antifungal ilaçların önemli bir kısmı ergosterol biyosentez yolağını hedefler. ERG11 genindeki mutasyon, azollerin hedefi tanıyamaması ve bağlanamamasına yol açarken, bunun aşırı ifadesi ise ilaç hedefinin Konsantrasyonundaki artışa yol açarak ilacın etkisini minimize eder. Direnç mekanizmasındaki diğer süreçler, düşük afiniteli ergosterol biyosentezi, Erg3 (*S. pombe erg31* ortoloğu) ve Erg6 genindeki mutasyon, artan katalaz ve SOD (Süper Oksit Dismutaz)aktivitesi (ilacın oluşturduğu oksidatif hasarı önler), mitokondriyal aktivite, biyofilm oluşumu, izokromozom oluşumu (dirençte rol alan genlerin kopyasını içerir) ve epigenetik değişimler gibi mekanizmalar antifungal ilaç direncinin bilinen diğer nedenlerinden bazılarıdır (Bhattacharya ve diğ., 2018; Bhattacharya ve diğ., 2020; Henry ve diğ., 2000; Cowen ve diğ., 2015).



Şekil 2.4 Ergosterol biyosentez yolağı.

2.3.2. *S. pombe*'de ilaç direnci

S. pombe, omurgalılarla olan yakınlığından dolayı model organizma olarak çeşitli çalışmalarda kullanılmasının yanı sıra, patojen ve fırsatçı mantarlara olan benzerliği dolayısı ile model organizma olarak kullanımı tercih edilir. Ayrıca, herhangi bir sağlık sorununa yol açmamaları yani güvenli suş olmaları nedeniyle de ilaç direnci gibi çalışmalarda kullanılmak için ideal bir mikroorganizmadır. Ek olarak *S. pombe*'nin güçlü çoklu ilaç direnci mekanizması vardır (Arita ve diğ., 2011; Wolfger ve diğ., 2001).

Fang ve arkadaşlarının (2011) 3004 mutant suş ile yaptığı antifungal ilaçların kullanıldığı çalışmada, 109 tane hiper-duyarlı suş ve 11 dirençli suş belirlediler. *S. pombe*'de direncin veya duyarlılığın gözlendiği ve ilgili genler bakımından delesyonlu olan bu mutant suşların çoğu çeşitli fonksiyonel kategorilere ayrılabilir. Bunlar, ergosterol biyosentezi, membran trafiği, histon asetilasyon ve deasetilasyonu, ubiquitinasyon, sinyal iletimi, ribozom biyosentezi ve düzenlenişi, transkripsiyon ve tranlasyonun düzenlenişi, hücre duvarı biyogenezi ve organizasyonu, mitokondriyal fonksiyon, amino asit, nükleik asit ve lipid metabolizması, mayoz, hücre polaritesi ve kromatin düzenlenişi ile ilgili süreçler olarak sıralanmaktadır.

Bu grubun bir diğ er ç alışmasında (Hu ve diğ ., 2015) Sty1 MAP kinaz yolağı tarafından aktive edilen Atf1 ve Pmk1 geninin de azollere karşı dirençte önemli bir rolü olduğu gösterildi. Bir diğ er ç alışma olan Liu ve arkadaşlarının (2018), *phb1-2* ve Ap-1 benzeri transkripsiyon faktörü olan *pap1* mutant hücrelerinde yaptığı ç alışmada bu genlerin ilaç direnci veya duyarlığında önemli roller aldığını gösterdi. Diğ er mayalarda dirence neden olan ilaç akış pompası proteinleri olan ABC taşıyıcı protein ve kesin olmamakla birlikte MFS protein ailesinin aynı şekilde *S. pombe*'de de direncin ana bileşenlerindedir (Arita ve diğ ., 2011; Iwaki ve diğ ., 2006.). Bu akış pompalarının ifadesinin çinko parmak ve AP-1 benzeri transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlendiği düşünölmektedir (Moye ve Rowley, 2003; Kawashima ve diğ ., 2012). *S. pombe*'de ise Bfr1 ve Pmd1'in ana ABC ailesi taşıyıcıları olduğu gösterilmiştir (Arita ve diğ ., 2011; Iwaki ve diğ ., 2006). Kawashima ve arkadaşları (2012) yaptıkları bir ç alışmada Mfs1'in bir MFS taşıyıcısı ve tomurcuklanan mayada Pdr'in homoloğu olan Prt1'in fisyon mayasında çinko parmak transkripsiyon faktörü olduğunu belirlediler.

Palabıyık ve diğ ., (2020)'nin "İnsan hastalıklarının moleküler mekanizmalarının araştırılmasında *Schizosaccharomyces pombe*'nin model organizma olarak kullanılmasının optimizasyonu" başlıklı ve 51649 kodlu BAP projesinden elde edilen bulgular ışığıında çeşitli mekanizmalardan sorumlu 19 genin delesyonlu durumda flukonazole karşı direnç geliştirdiği gösterildi. Bu genlerin rol aldığı süreçler Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.5: Mutant genlerin listesi ve hücrenel süreçteki rolleri.

Rol alınan süreçler	Gen
Translasyon ve Transkripsiyon	<i>SPAC22H10.09, srp14 ve rsv2</i>
Bağlayıcı (DNA, protein, aktin vs.) ve kinaz aktivitesi.	<i>bun107, hrk1 ve yih1</i>
Transferaz ve fosfataz	<i>nnt1, plh1, hrk1, clp1 ve srp14</i>
DNA onarımı	<i>msh1 ve SPAC4H3.06</i>
Mitokondriyal aktivite	<i>msh1, ve qcr8</i>
Sterol sentezi ve hücre duvarı biyogenezi	<i>plh1 ve bgs4</i>
Diğ er	<i>mug166, nas2 ve rpb9</i>

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ORGANİZMA VE BESİYERİ

3.1.1. Organizma

Bu çalışmada mantarlar aleminin ascomycetes sınıfından *S. pombe* ED666 yabancı suşu ve belirli genler bakımından delesyonlu mutant suşlar Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Bu suşlar İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Maya Biyoteknolojisi laboratuvarındaki kültür koleksiyonundan temin edildi.

Tablo 3.1: Çalışma kapsamında kullanılan suşlar ve özellikleri.

Kullanılan Suş	Özelliği
<i>ED666</i>	Haploid/h ⁺ , ade6-M210, ura4-D18, leu1-32
<i>SPAC22H10.09</i>	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>SPAC22H10.09</i> Δ ::KanMX4
<i>bun107</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>bun107</i> Δ::KanMX4
<i>mug166</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>mug166</i> Δ::KanMX4
<i>nnt1</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>nnt1</i> Δ::KanMX4
<i>plh1</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>plh1</i> Δ::KanMX4
<i>nas2</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>nas2</i> Δ::KanMX4
<i>srp14</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>srp14</i> Δ::KanMX4
<i>rhp18</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>rhp18</i> Δ::KanMX4
<i>SPCC338.06c</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>SPCC338.06c</i> ::KanMX4
<i>hrk1</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>hrk1</i> Δ::KanMX4
<i>clp1</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>clp1</i> Δ::KanMX4
<i>SPAC4H3.06</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>SPAC4H3.06</i> Δ::KanMX4
<i>yih1</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>yih1</i> Δ::KanMX4
<i>msh1</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>msh1</i> Δ::KanMX4
<i>rpb9</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>rpb9</i> Δ::KanMX4
<i>qcr8</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>qcr8</i> Δ::KanMX4
<i>rsv2</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>rsv2</i> Δ::KanMX4
<i>bgs4</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>bgs4</i> Δ::KanMX4
<i>SPBC27B12.05</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>SPBC27B12.05</i> ::KanMX4
<i>phb2</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>phb2</i> Δ::KanMX4
<i>erg31</i> Δ	Haploid/h ⁺ ,ade6-M210,ura4-D18,leu1-32- <i>erg31</i> Δ::KanMX4

3.1.2. Besiyeri

Bu çalışma kapsamında *S. pombe* ED666 ve diğer mutant suşların üretiminde YES (Yeast Extract with Supplemets) besiyeri kullanıldı (Gutz ve diğ., 1974). Ayrıca mutant suşlar üretildiğinde ortamda sadece onların üremesini sağlamak için ortama genetisin antibiyotiği eklendi. Besiyeri içeriği Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: YES besiyeri içeriği ve konsantrasyonu.

Besiyeri	İçerik	Konsantrasyon
YES	Maya özütü	5 g/L
	Glukoz	30 g/L
	Agar*	20 g/L
	Distile su	1000 mL
	Adenin	10 mg/mL
	Urasil	
	Lösin	
	Lizin	
	Histidin	
Genetisin**	200 mg/mL	

* Katı besiyeri için kullanıldı.

**Mutant suşların seçici besiyerinde kullanılan bir antibiyotik.

Besiyeri, Tablo 3.2’de verilen bileşenler ve konsantrasyonlar kullanılarak distile su ile çözdürüldü ve 121 °C’de 15 dakika 1.2 atmosfer basınçta sterilizasyonu sağlandı. Otoklavdan sonra besiyeri ~50°C’ye kadar soğuduktan sonra içerisine adenin, lösin, urasil, histidin ve lizin metabolitlerinden her biri 10 mg/mL olacak şekilde eklendi. Mutant suşlar üretilmek istendiği zaman ise metabolitlerin yanı sıra besiyeri içine genetisin antibiyotiğinden 200 mg/L olacak şekilde eklendi. Katı besiyeri hazırlandığında otoklavdan alınan besiyeri, bir miktar soğuduktan sonra yukarıda verilen metabolitler eklendikten sonra petri kaplarına döküldü.

3.2. ORGANİZMANIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI

Yabani tip *S. pombe* ED666 suşu +4°C’da katı besiyerinde saklanan stoklardan alınarak katı YES besiyeri içeren petri kaplarına ekildi ve 30°C’de 3 gün boyunca üretildi. Mutant *S. pombe* suşları ise -80°C’da saklanan gliserol stoktan alınarak katı YES+genetisin besiyeri içeren petri kaplarına ekildi ve inkübasyon sonrasında alt kültürleme yapıldı. Alt kültürleme için üreyen hücrelerden azaltma ekimi yapılarak bir koloni alındı. Yabani ırk katı YES

besiyerine, mutant ırk ise YES+genetisin besiyerine ekildi ve 30°C'de 2 gün boyunca üretildi. Suşlar ileriki aşamalarda kullanılmak amacıyla +4°C'de katı besiyerlerinde saklandılar.

3.3. ANTİFUNGAL AJANLARIN *S. pombe* HÜCRELERİNİN ÜREMESİNİ İNHİBE EDEN DOZLARININ BELİRLENMESİ

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), bir mikroorganizmanın inkübasyonundan sonra büyümeyi engellemek için ilacın kullanılan en düşük konsantrasyonunu ifade eden duyarlılık testi olup hücre bazlı bir analiz yöntemidir. IC (inhibe edici konsantrasyon) değeri *in vitro* şartlarda ilacın maksimum etkisinin, inhibisyonun belli bir yüzdeden sorumlu olduğu ilaç konsantrasyonudur.

İlk olarak, çalışma kapsamında kullanılan, flukonazol, tetrakonazol ve tiyabendazol antifungal ajanlarının *S. pombe* ED666 yabani suşunda MİK değerleri belirlendi. Belirlenen MİK değerleri baz alınarak, ajanların kombine kullanılması sonucunda hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelendi. Kullanılan ajanların Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarını belirlemek için Şekil 3.1'de verilen Şablon kullanıldı. Deneyler 3 tekrar ve 2 replika olacak şekilde 96'lık düz tabanlı plakalarda yapıldı.

Tablo 3.3: : Kullanılan ajanların Minimum İnhibe edici Konsantrasyonlarının belirlenmesi için kullanılan şablon.

Flukonazol	YES+DMSO Blank	YES+DMSO ED666	43.25 µg/mL ED666	87.5 µg/mL ED666	175 µg/mL ED666	350 µg/mL ED666	700 µg/mL ED666	1400 µg/mL ED666	2800 µg/mL ED666	5600 µg/mL ED666
	YES ED666	1 µg/mL ED666	2 µg/mL ED666	3 µg/mL ED666	4 µg/mL ED666	8 µg/mL ED666	16 µg/mL ED666	32 µg/mL ED666	64 µg/mL ED666	128 µg/mL ED666
Tiyabendazol	YES+DMSO+ HCl Blank	0.0115 µg/mL ED666	0.023 µg/mL ED666	0.046 µg/mL ED666	0.093 µg/mL ED666	0.1875 µg/mL ED666	0.375 µg/mL ED666	0.75 µg/mL ED666	1.5 µg/mL ED666	ED666
	YES ED666	YES+ DMSO Blank ED666	700 µg/mL FLC+ 2 µg/mL TRC ED666	700 µg/mL FLC+ 4 µg/mL TRC ED666	700 µg/mL FLC+ 8 µg/mL TRC ED666	1400 µg/mL FLC+ 2 µg/mL TRC ED666	1400 µg/mL FLC+ 4 µg/mL TRC ED666	700 µg/mL FLC+ 8 µg/mL TRC ED666	ED666	ED666

3.3.1. Flukonazolün *S. pombe* yabani ırkı (ED666)'nın MİK için farklı derişimlerde kullanılması

3 gece boyunca 30 °C'de katı besiyerinde üretilen hücreler malassez lamı (0.025 mm², Superior, Marienfeld) kullanılarak sayıldı ve mililitre başına karşılık gelen hücre sayısı Denklem 3.1'e göre hesaplandı. Hücre yoğunluğu 10⁶ hücre/mL olacak şekilde sıvı kültüre ekim yapıldı. 1 gece boyunca (15-16 saat) sıvı besiyerinde çalkalamalı inkübatörde (180 rpm) (Sartoriusstedim, Certomat®, IS) üretilen hücrelerin 600 nm'deki optik yoğunlukları (OD₆₀₀) spektrofotometre cihazı (EON, Biotek Instruments Inc.) ile ölçüldü.

28 mg flukonazol (Santa Cruz Biotechnology Dallas TX 75220) tartılıp DMSO (Dimetil sülfoksit)'da çözdürüldü ve filtreden geçirilip (Millipore, Millex-GS, por açıklığı: 0.22 µm) stok solüsyon hazırlandı. MİK değerini belirlemek için 5600, 2800, 1400, 700, 350, 175, 87.5 ve 43.75 µg/mL son konsantrasyonlarında flukonazol Tablo 3.1'de verilen şablona göre kullanıldı. Kontrol grubuna aynı oranda DMSO eklendi. Hücreler, 200 µl total hacimde OD₆₀₀: 0.2 (10⁷ hücre/ml) olacak şekilde 96 kuyucuklu düz tabanlı plakalara ekildi. Başlangıçtaki (0. saatteki) hücre yoğunluğu ölçülüp 30 °C ve 180 rpm'de 24 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakıldı. 24. saatin sonunda hücre yoğunlukları 600 nm dalga boyunda ölçüldü. 24. saat değerlerinden başlangıç değerleri çıkartılarak üremedeki

değişim oranı belirlendi. Elde edilen değerler kullanılarak flukonazol ajanına ait MİK grafiği çizildi. Deneyle 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

$$\frac{\text{Hücre}}{\text{ml}} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times \text{Sulandırma katsayısı} \times 10^5 \quad (3.1)$$

3.3.2. Tiyabendazolün *S. pombe* yabancı ırkı (ED666)'nın MİK için farklı derişimlerde kullanılması

Deney için 3 gece boyunca 30 °C'de katı besiyerinde üretilen hücreler seyreltilerek Malassez lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra mililitre başına karşılık gelen hücre sayısı Denklem 3.1'e göre hesaplandı ve hücre yoğunluğu 10^6 olacak şekilde sıvı kültüre ekildi. 1 gece boyunca (15-16 saat) sıvı besiyerinde çalkalamalı inkübatörde (30 °C, 180 rpm) üretilen hücrelerin OD (optik yoğunluk, OD₆₀₀)'leri spektrofotometre cihazı ile ölçüldü.

1.5 mg Tiyabendazol (Santa Cruz Biotechnology, INC SC-204S13A) DMSO'da çözdürülüp filtreden geçirilip stok hazırlandı. MİK değerini belirlemek için 1.5, 0.75, 0.375, 0.187.5, 0.93, 0.46, 0.23 ve 0.11 mg/mL son konsantrasyonlarında tiyabendazol Tablo 3.1'de verilen şablona göre kullanıldı. Kontrol grubuna DMSO eklendi. Hücreler, 200 µl total hacimde OD:0.2 (10^7 hücre/ml) olacak şekilde 96 kuyucuklu düz tabanlı plakalara ekildi. Başlangıçtaki (0. saatteki) hücre yoğunluğu ölçülüp 30 C çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca üremeye bırakıldı. 24. saatin sonunda hücre yoğunlukları 600 nm dalga boyunda ölçüldü. 24. saat değerlerinden başlangıç değerleri çıkartılarak üremedeki değişim oranı belirlendi. Elde edilen değerler kullanılarak tiyabendazol ajanına ait MİK grafiği çizildi. Deneyle 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

3.3.3. Tetrakonazolün *S. pombe* parental ırkı (ED666)'nın MİK için farklı derişimlerde kullanılması

Deney için 3 gece boyunca 30 °C'de katı besiyerinde üretilen hücreler seyreltilerek Malassez lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra mililitre başına denk gelen hücre sayısı Denklem 3.1'e göre hesaplandı ve hücre yoğunluğu 10^6 olacak şekilde sıvı kültüre ekildi. 1 gece

boyunca (15-16 saat) sıvı besiyerinde çalkalamalı inkübatörde üretilen hücrelerin OD (optik yoğunluk, OD₆₀₀)'leri Spektrofotometre cihazı ile ölçüldü.

Tetrakonazol (TANCAN, Domark 10 EC G1,3) saf suda çözdürülerek ana stok hazırlandı. MİK değerini belirlemek için 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 ve 128 mg/mL son konsantrasyonlarında tetrakonazol kullanıldı. Hücreler, 200 µl total hacimde OD₆₀₀:0.2 (10⁷ hücre/ml) olacak şekilde 96 kuyucuklu düz tabanlı plakalara ekildi. Başlangıçtaki (0. saatteki) hücre yoğunluğu ölçülüp 30 °C çalkalamalı inkübatörde (30 °C, 180 rpm) 24 saat boyunca üremeye bırakıldı. 24. saatin sonunda hücre yoğunlukları 600 nm dalga boyunda ölçüldü. 24. saat değerlerinden başlangıç değerleri çıkartılarak üremedeki değişim oranı belirlendi. Elde edilen değerler kullanılarak tetrakonazol ajanına ait MİK grafiği çizildi. Deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

3.3.4. Flukonazol ile Tetrakonazolün kombine kullanımının *S. pombe* canlılığı üzerine etkisi

Deney için 3 gece boyunca 30 °C'de katı besiyerinde üretilen hücreler seyreltilerek Malassez lamında hücre sayımı yapıldıktan sonra mililitre başına denk gelen hücre sayısı Denklem 3.1'e göre hesaplandı ve hücre yoğunluğu 10⁶ olacak şekilde sıvı kültüre ekildi. 1 gece boyunca (15-16 saat) sıvı besiyerinde çalkalamalı inkübatörde (30 °C, 180 rpm) üretilen hücrelerin OD (optik yoğunluk, OD₆₀₀)'leri Spektrofotometre cihazı ile ölçüldü

Bu aşamada önceki denemelerde belirlenen flukonazolün IC₁₀ değeri olan;1400 µg/mL ve IC₅ değeri olan 700 µg/mL değerleri ile tetrakonazolün IC₅=2, IC₁₀=4 ve IC₂₀=8 mg/mL değerlerinin sırasıyla 6 kombine olacak şekilde kullanıldı. Bu dozların kullanılma amacı, düşük dozların kombine kullanımının ilaç etkinliğini artırıp artırmadığını gözlemlemek. Deney 96'lık düz tabanlı plakalarda gerçekleştirildi ve hücre yoğunluğu, OD₆₀₀= 0.2 olacak şekilde başlatıldı. 0.saat ölçümleri alındıktan sonra inkübatörde üremeye bırakıldı ve 24. saat ölçümleri de alındıktan sonra üremedeki değişim grafiği çizildi.

Elde edilen değerlerinin analizi 3 deney tekrarı olacak şekilde Graphpad Prism 9.3.1 yazılımının lineer olmayan regresyon (Non-linear Regretion) testi kullanılarak yapıldı

3.4. RNA İZOLASYONU VE AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Bu çalışma kapsamında kullanılan kontrol ve deney gruplarından RNA izolasyonu, Hanna ve Xiao (2006)'nın hazırladıkları protokol optimize edilerek kullanıldı. Bu aşamada kullanılan parçalama tamponunun içeriği Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.4: RNA izolasyonunda kullanılan parçalama tamponu ve konsantrasyonu.

İçerik	Son konsantrasyon
Tris-HCl	0.2M
SDS	%1
EDTA	10 mM
NaCl	0.5M
dH ₂ O (DEPC)	30 mL'ye tamamlandı

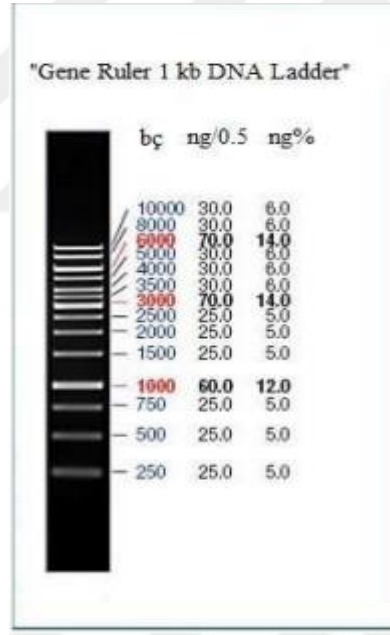
10 mL (OD₆₀₀= 0.5-08) hücre 5 dk 5000 rpm'de çöktürüldü, üst faz döküldü, 1 mL DEPC'li su ile süspanse edilip tekrar 5000 rpm'de 5 dk boyunca çöktürülüp üst faz döküldü. 0.5 gr cam boncuk tartıldı. Pellet 350 µl parçalama tamponuyla süspanse edilip 1.5 mL eppendorfa alındı, üzerlerine aynı miktarda soğuk fenol kloroform izoamil alkol karışımı (25:24:1) eklendi. 1 dk vortex, 1 dk buz ve 1 dk su banyosunda (30°C) bekletildi aynı işlem 2 defa tekrarlandı. Tüpler delinerek sıvı faz yeni tüpe alındı. 14000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj yapıldı. Üstteki sıvı fazın yaklaşık yarısı alındı. Mevcut hacim oranında %100 alkol eklenip alt üst edildi ve 5 dk -20°C'de bekletildi. 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant atıldı. Üzerine ~300 µL %70'lik alkol eklenip alt üst edilerek 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet kurumaya bırakıldı sonrasında üzerine pellet konsantrasyonuna göre DEPC'li su ile süspanse edildi.

RNA örneklerin elektroforetik analizi için örnekler agaroz jel elektroforezinde 1X TAE (Tris Asetik asit EDTA) (Tablo 3.5) ile %1.2 olacak şekilde agaroz (Sigma-Aldrich Agarose Type2) karıştırılıp mikrodalga fırında çözüldü. Ardından ~50°C'ye kadar soğuduktan sonra 40 mL içine 3 µl etidyum bromür (1mg/mL) eklenerek tank içine döküldü ve oda sıcaklığında polimerizasyon için bekletildi. Tankın içi 1X TAE ile dolduruldu. Örnekler ve yükleme boyasından son konsantrasyonları 1X ve marker olarak da 1kb DNA markerdan (Gene Ruler 1kb DNA Ladder) 3 µL yüklendikten. Örnekler 30 dk, 65 V ve 110 mA'de 30 dk boyunca yürütüldü.

Örneklerin elektroforetik analizi yapıldıktan sonra spektrofotometre cihazında (“Nanodrop 2000 Spectrophotometer”, Thermo Scientific) örneklerin 260 nm dalgaboyundaki absorbanları ölçüldü. Kör olarak RNA örneklerinin içerisinde çözündürüldüğü DEPC’li sudan 1 μ L okutuldu ardından örneklerden de 1’er μ L yüklenip miktar tayini yapıldı.

Tablo 3.5: 1X TAE bileşenleri ve konsantrasyonları.

İçerik	Konsantrasyon
Tris Baz	40 mM
Asetik asit	20 mM
EDTA	1 mM
Distile su	1 L’ye tamamlandı



Şekil 3.1: Gene Ruler 1kb “DNA Ladder”.

3.5. DNaz UYGULAMASI VE cDNA SENTEZİ

3.5.1. DNaz uygulaması

Miktar tayini yapıldıktan sonra, ortamda kalan DNA’yı uzaklaştırmak amacıyla örneklere DNaz uygulaması yapıldı. Tablo 3.6’da verilen değerler kullanılarak son hacim 30 μ L olacak şekilde hazırlandıktan sonra 15dk boyunca 37°C’de bekletildi. Enzim aktivitesini durdurmak

için üzerine 4 µL EDTA (50 mM, moleküler ağırlığı: 372.24 g/mol) eklendi ve örnekler 65 °C’de 5dk bekletildi. DNaz uygulanmış RNA örnekleri Bölüm 3.4’te anlatıldığı gibi analiz edildi.

Tablo 3.6: DNaz uygulaması için kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.

İçerik	Konsantrasyon
RNA örneği	2000 ng/mL
DNaz*	4 U
Buffer (10X)	1X
Su	30 µL’ye tamamlandı

*Thermo Fischer Scientific(EN0521) DNase I

3.5.2. cDNA sentezi

Elde edilen RNA örneklerinin saflığını kontrol etmek amacıyla cDNA (Komplementer DNA) sentezi öncesinde ortamda DNA kalıntılarının kalmadığını kanıtlamak amacıyla PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gerçekleştirildi, deneyde kontrol primeri olarak *gapdh3* geninin primeleri kullanıldı. Deney sonucunda ilgili örnekler %1’lik agaroz jel elektroforezinde örneklerden 10 µL ve 6X derişimindeki yükleme boyasından 2 µL ve Markerdan 3 µL oranlarında yüklendikten sonra 110 mA, 75 V ve 30 dk boyunca yürütme gerçekleştirildi ve son olarak UV ışığı altında görüntülenip ortamda DNA kalıntılarının olmadığı kanıtlandı.

RNA örneklerinin saflık kontrolü yapıldıktan sonra (Şekil 4.4)µl’de 2000 ng olacak şekilde cDNA sentezi gerçekleştirildi (High-Capacity cDNA Reverse Transcritase Kits). cDNA sentezini gerçekleştirmek amacıyla Tablo 3.8 ve 3.9’da gösterilen değerler ve ticari kitin içinde bulunan random primerler kullanılarak işlem gerçekleştirildi. Sentezden sonra örnekler tekrar agaroz jel elektroforezinde örneklerden 3 µL ve 6X yükleme boyasından 1 µL ve markerdan 3 µL oranlarında yüklendikten sonra 120 mA, 75 V ve 35 dk boyunca yürütme gerçekleştirildi ve son olarak UV ışığı altında görüntülenip cDNA sentezinin gerçekleştiği gözlemlendi. Örnekler ileriki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

RNA örneklerinin saflığını kontrol etmek amacıyla gerçekleştirilen PZR’de kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları Tablo 3.6’da gösterilmiştir.

Tablo 3.7: Kontrol PZR’de kullanılan reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları.

İçerik	Final konsantrasyon
Primer F	10 μ M
Primer R	10 μ M
10X Buffer	1X
dNTP	2mM
MgCl ₂	50 mM
Kalıp	100 ng
Enzim	1 U
dH ₂ O	20 μ L’ye tamamlandı

RNA örneklerinin saflığını kontrol etmek amacıyla gerçekleştirilen PZR’nin çalışma koşulları Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

Tablo 3.8: Kontrol PZR koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	3 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Primer bağlanması	53°C	30 sn	35
Uzama	72°C	1 dk	
Son uzama	72°C	10 dk	1

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen cDNA sentezi için kullanılan bileşenler Tablo 3.9’da gösterilmiştir.

Tablo 3.9: cDNA sentez için kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları.

Bileşikler	Konsantrasyon
10X RT Buffer	1 X
25X dNTP mix (100mM)	4 mM
10X Random primerler	1 X
Reverse Transcriptase enzim	1 U
RNA kalıp	2 μ g/mL
dH ₂ O	20 μ L’ye tamamlandı

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen cDNA sentezi için çalışma koşulları Tablo 3.10’da gösterilmiştir.

Tablo 3.10: cDNA sentez için çalışma koşulları.

Adımlar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Adım1	25°C	10 dk	1
Adım2	37°C	120 dk	1
Adım3	85°C	5 dk	1
Adım4	4°C	∞	1

3.8. PRİMER SENTEZİ VE RT-PZR

3.8.1. Primer sentezi

Bu çalışma kapsamında kullanılan primerler “Primer3plus”⁴ web sayfasında ilgili genlerin FASTA formatındaki sekans bilgileri alınarak, bağlanma sıcaklığı 40-60 °C, dizi uzunluğu 100-120 baz uzunluğunda ve GC (Guanin-Sitozin) yüzdesi 40-60 arası olacak şekilde belirlenen parametreler girilerek Tablo 3.10’da verilen primer çiftleri tasarlandı. Sonrasında bu primerlerin uygun çalışmasını sağlamak amacıyla belirli kontroller “Integrated DNA Technologies”⁵ arayüzü kullanılarak yapıldı.

⁴ www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi [Ziyaret tarihi:15/04/2021]

⁵ www.idtdna.com/pages[Ziyaret tarihi:[17/04/2021]

Tablo 3.11: Çalışma kapsamında kullanılan primerler.

Gen ismi	Primer dizisi (5'-3')	Bağlanma sıcaklığı (°C)
<i>gapdh F</i>	GGTGACAACCACTCCTCCCAT	52
<i>gapdh R</i>	TCAACAAGACGGTGGGAGTA	
<i>SPAC22H10.09 F</i>	TAGTGCTGCTTCCAATCTAC	52
<i>SPAC22H10.09 R</i>	GCTGCATACCTCGTAAAGTA	
<i>bun107 F</i>	CTTCTAAAAGTCCCCCTACT	52
<i>bun107 R</i>	AGCACTAGCACTTAAACGAG	
<i>mug166 F</i>	CTTTACTGCTGTTCCCTTACG	52
<i>mug166 R</i>	TTGGTTCCTCATACTTTGTG	
<i>nnt1 F</i>	CTAATCACACTTTTCGGTGT	52
<i>nnt1 R</i>	GCCAACTTCCATAGTATCTG	
<i>plh1 F</i>	ATCTTGAGGAGTTGAAAGGT	52
<i>plh1 R</i>	GATATTGCGGTCATTGATAC	
<i>nas2 F</i>	GGTCTCTGTATTGGTGATGA	52
<i>nas2 R</i>	CATCCAGCGTTTTATTGAC	
<i>srp14 F</i>	ACCCATCAAAGTAAAGGAAC	52
<i>srp14 R</i>	CTTAGCACGGATTAAAAGT	
<i>rhp18 F</i>	CAGGTTGTTTGGAGACTTC	52
<i>rhp18 R</i>	CCTTTTGTAGAGGAAGCAA	
<i>hrk1 F</i>	TAGGCTTATTGACCCTGTTA	52
<i>hrk1 R</i>	CCCAATTGAGGAGAGAAG	
<i>SPCC338.06c F</i>	TCAAGTATCAGGCTTATTGC	52
<i>SPCC338.06c R</i>	CCCATTTTCAGATAGAAGG	
<i>clp1 F</i>	TGGTCTAGTGGTCTAGTCA	52
<i>clp1 R</i>	GAAGGCTTAGGTTTAGCAAC	
<i>SPAC4H3.06 F</i>	GCAAACGTATTCCTATGTTG	52
<i>SPAC4H3.06 R</i>	AAAAGTCTTCCGTATCTCG	
<i>yih1 F</i>	TCTCGTATGAGTCATTTGCT	52
<i>yih1 R</i>	ATGTTTGAATCTGTCTGGTC	
<i>msh1 F</i>	GATCACACTTTCAGTTTCG	52
<i>msh1 R</i>	CTGCCAGTAGGACATTTTT	
<i>rpb9 F</i>	TTACCAGCCTCTCAATCAT	52
<i>rpb9 R</i>	AGAAGGTACACCGAATGTG	
<i>qcr8 F</i>	GGTGGAGGAATAATGATGA	52
<i>qcr8 R</i>	AAGCATAATGAGAGGAGAGAG	

Tablo 3.11: (Devamı).

<i>rsv2 F</i>	TTCGGTGTACTCTTCAGAAC	52
<i>rsv2 R</i>	GGTCGTGTCTTAGCATGTAT	
<i>bgs4 F</i>	TCGTTATTCAGCCTTGTACT	52
<i>bgs4 R</i>	AGCCTCAGAAGCAGTTAATC	
<i>SPBC27B12.05 F</i>	CCTTTATTGGGAATGAGTG-3'	52
<i>SPBC27B12.05 R</i>	CGAGAGCTGAACTTCTACAG	
<i>phb2 F</i>	TGCTTGATGATGTCTCACT	52
<i>phb2 R</i>	CGATCGACATAGAAAGTAGC	
<i>erg6 F</i>	GCCAAAGGAACTAGTAAGGT	52
<i>erg6 R</i>	TCTTAGCAATCATGAGGAAC	
<i>erg9 F</i>	ACACTCCTAAAGATCCCAAC	52
<i>erg9 R</i>	ATAGGCCTTTTCGTACATCT	
<i>erg11 F</i>	CTTCCTTATCCTCGCACTA	52
<i>erg11 R</i>	CCTACATGAAAACGAAAGAG	
<i>erg31 F</i>	TTATTTACCCGCTCTACCTT	52
<i>erg31 R</i>	TGCTAAAGAGACTCGAAATG	

3.8.2. Primerler için bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi

Mevcut bütün primerler için bağlanma sıcaklığını belirleyebilmek amacıyla RT-PZR öncesinde “termal cyler” cihazında sentezlenen cDNA örneklerinden biri kullanılarak 55 °C ve 52 °C olmak üzere iki farklı sıcaklık değeri kullanılarak PZR kuruldu. Örneklerin elektroforetik analizi için % 1'lik agaroz jelde yürütülerek primerler için uygun bağlanma sıcaklığı belirlendi. Kullanılan bileşenlerin değerleri ve yürütme koşulları Tablo 3.12 ve 3.13'de verildiği şekilde yapıldı.

Tablo 3.12: Primerlerin uygun bağlanma sıcaklığı için PZR’de kullanılan reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları.

Bileşenler	Konsantrasyon
10X buffer	1 X
dNTP (2mM)	0.2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	1.25 mM
Primer F	0.5 µM
Primer R	0.5 µM
Kalıp	100 ng/µL
Enzim	1U
dH ₂ O	10 µL’ye tamamlandı

Tablo 3.13: Primerler için uygun sıcaklık PZR koşulları.

Aşamalar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95°C	3 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	35
Primer bağlanması	52°C	30 sn	
Uzama	72°C	45 sn	
Son uzama	72°C	5 dk	1
Soğuma	+4°C		∞

3.8.3. RT-PZR

RT-PZR (Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu), Tablo 3.13 ve Tablo 3.14’te verilen bileşenler ve koşullarda gerçekleştirildi. Öncelikle RT-PZR’ın çalışma etkinliğini göstermek amacıyla cDNA örnekleri sırasıyla; 100, 20, 4, ve 0.8 ng/µL derişimlerinde hazırlandı. Ardından bu seriler kullanılarak primerlerin standart grafiği çıkarıldı. Genlerin ifadelerindeki değişim; kontrol ve deney gruplarına ait örnekler Tablo 3.4’te verilen primer çiftleri kullanılarak 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Referans gen olarak da *gapdh3* (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) primerleri kullanılarak gen ifadelerindeki değişim Denklem 3.2’de (Livak ve Schmittgen 2001) gösterildiği şekilde yapıldı.

$$\text{Göreceli kat artışı/azalışı: } 2^{-\left(\text{hedef gen-referans gen}\right)_{\text{deney grubu}} - \left(\text{hedef gen-referans gen}\right)_{\text{kontrol grubu}}}$$

(3.2)

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen RT-PZR için kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları Tablo 3.14’de gösterilmiştir.

Tablo 3.14: qRT-PZR için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları.

Bileşenler	Konsantrasyon
2X Master mix	1 X
F Primer	0.5 µM
R Primer	0.5 µM
cDNA	100 ng/µL
dH ₂ O	20 µL’ye tamamlandı

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen RT-PZR için kullanılan sıcaklık değerleri ve süresi Tablo 3.14’te gösterilmiştir.

Tablo 3.15: RT-PZR koşulları.

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	15 sn	
Primer bağlanması	52	30 sn	40
Uzama	74	20 sn	
Erime eğrisi basamakları	60	1 dk	1
	95	30 sn	

Elde edilen Ct (“Crossing threhold”-Eşikdeğeri geçimi) değerlerinin analizi 3 deney tekrarı olacak şekilde Graphpad Prism 9.3.1 yazılımının tek yönlü varyans analizinin (one-way anova) Tukey testi kullanılarak yapıldı.

3.9. OKSİDATİF STRESİN FLUORESAN MİKROSKOBU İLE HÜCRESEL GÖSTERİMİ

Hücrelerde reaktif oksijen türlerinin düzeyi, DCFH-DA (2’-7’ dichlorofluorescein diacetat) boyasının ROT’larla tepkimeye girerek indirgenmesi sonucunda meydana gelen floresan ışımının ölçülmesi temeline dayanan yöntem kullanılarak belirlendi (Uy ve diğ., 2011). Bu

amaçla, 16 saat boyunca üretilen hücrelere 12'lik düz tabanlı plakalarda Tablo 3.1'de verilen *S.pombe* suşları kullanılarak hücre yoğunluğu 10^6 (hücre/mL) ve son konsantrasyonları 1 mL olacak şekilde 700 ve 1400 $\mu\text{g/mL}$ flukonazol 2 saat boyunca uygulandı. Bazı delesyonlu suşlarda (*rhp18 Δ* , *SPCC338.06c Δ* , ve *SPBC27B12.05 Δ*) önceki çalışmalarda anlamlı sonuçlar elde edilmediğinden çalışma kapsamından çıkarıldılar. Ayrıca, bazı genler açısından delesyonlu suşlar (*erg6* ve *erg11*), bu genlerin yokluğunda canlılık yeteneğini kaybettiği için kullanılmadı. Ayrıca, pozitif kontrol olarak 20 ve 40 mM dozlarında H_2O_2 uygulandı. 2 saatin sonunda hücre kültürlerine son konsantrasyonu 10 μM olacak şekilde DCFH-DA boyası eklendi. 30 °C'de 1 saat ve karanlık ortamda çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Hücreler çöktürülüp soğuk 1X PBS (Phosphate Buffer Saline) ile yıkandı. 1:1 oranında soğuk 1X PBS ve 100 mM glukoz ile çözdürüldü. Örneklerin 495-529 nm (FITC filtre) görüntüleri floresan mikroskopta (OLYMPUS BX53) alındı.

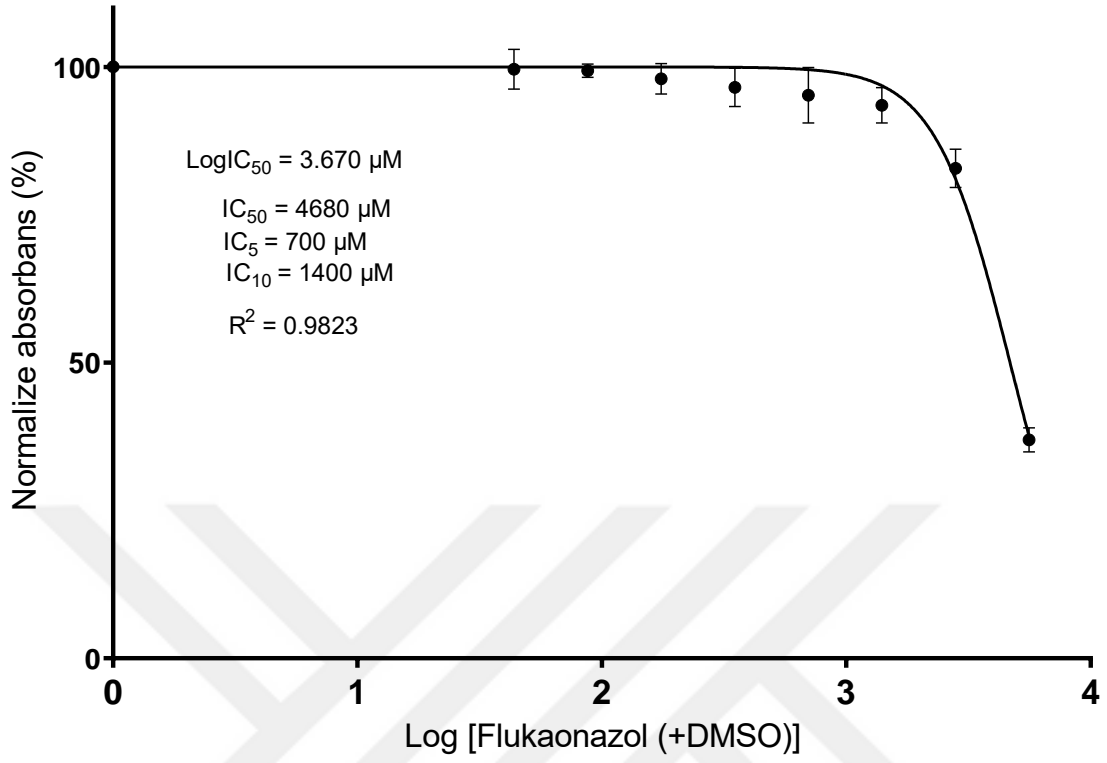
4. BULGULAR

4.1. ANTİFUNGAL AJANLARIN *S. pombe* HÜCRELERİNİN CANLILIĞINA ETKİLERİ

Tez çalışması sırasında kullanılan antifungal ajanların *S. pombe* ED666 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla MİK belirlendi. Bunun için herhangi bir antifungal ajan içermeyen besiyerinde üretilen kontrol grubu %100 canlı kabul edildi. Kültüre uygulanan antifungal ajanların 24. saatteki OD₆₀₀ değerleri ölçüldü. Flukonazolün IC₅₀ (yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu) Graphpad Prism 9.3.1 yazılımında lineer olmayan regresyon analizi ile belirlendi.

4.1.1. Flukonazolün hücre canlılığı üzerine etkisi

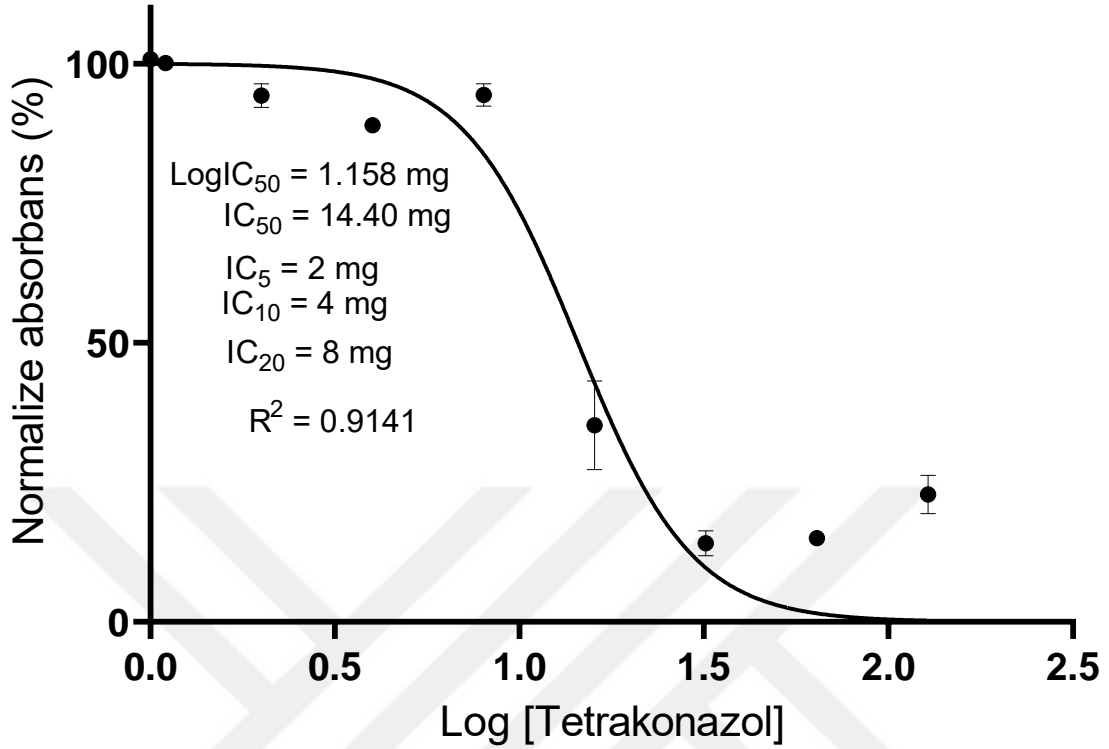
Bölüm 3.3.1’de verildiği gibi uygulanan deneyler sonucunda Şekil 4.1’de verilen grafik ve IC değerleri ile 1’e yakın bir R² değeri hesaplanmıştır. Buna göre flukonazolün IC₅₀ değerinin 4680 µg olduğu belirlendi. Çeşitli dozlardaki 24 saatlik flukonazol uygulaması *S. pombe* ED666 hücrelerinde üreme yeteneğini baskılayan fungistatik ve MİK’in üzerindeki dozlarda üreme yeteneğinin devam ettiği paradoksiyal etki gözlemlendi. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen ileri analizlerde sadece flukonazolün üremenin seyirinin değişime başladığı konsantrasyonlar olan IC₅ (700 µg/mL) ve IC₁₀ (1400 µg/mL) değerleri *S. pombe* yabani suşunda kullanıldı.



Şekil 4.1: Flukonazolün hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.1.2. Tetrakonaolün hücre canlılığı üzerine etkisi

Bölüm 3.3.3’de verildiği gibi uygulanan deneyler sonucunda Şekil 4.2’de verilen grafik ve IC değerleri ile 1’e yakın bir R² değeri hesaplanmıştır. Burada, tetrakonazol uygulamasının *S. pombe* ED666 hücrelerinde doza bağlı olarak üreme yeteneğini önemli ölçüde engellediği görüldü. IC₅₀ değeri 14.40 mg olarak belirlenirken IC₅=2, IC₁₀=4 ve IC₂₀=8 mg olarak belirlendi.



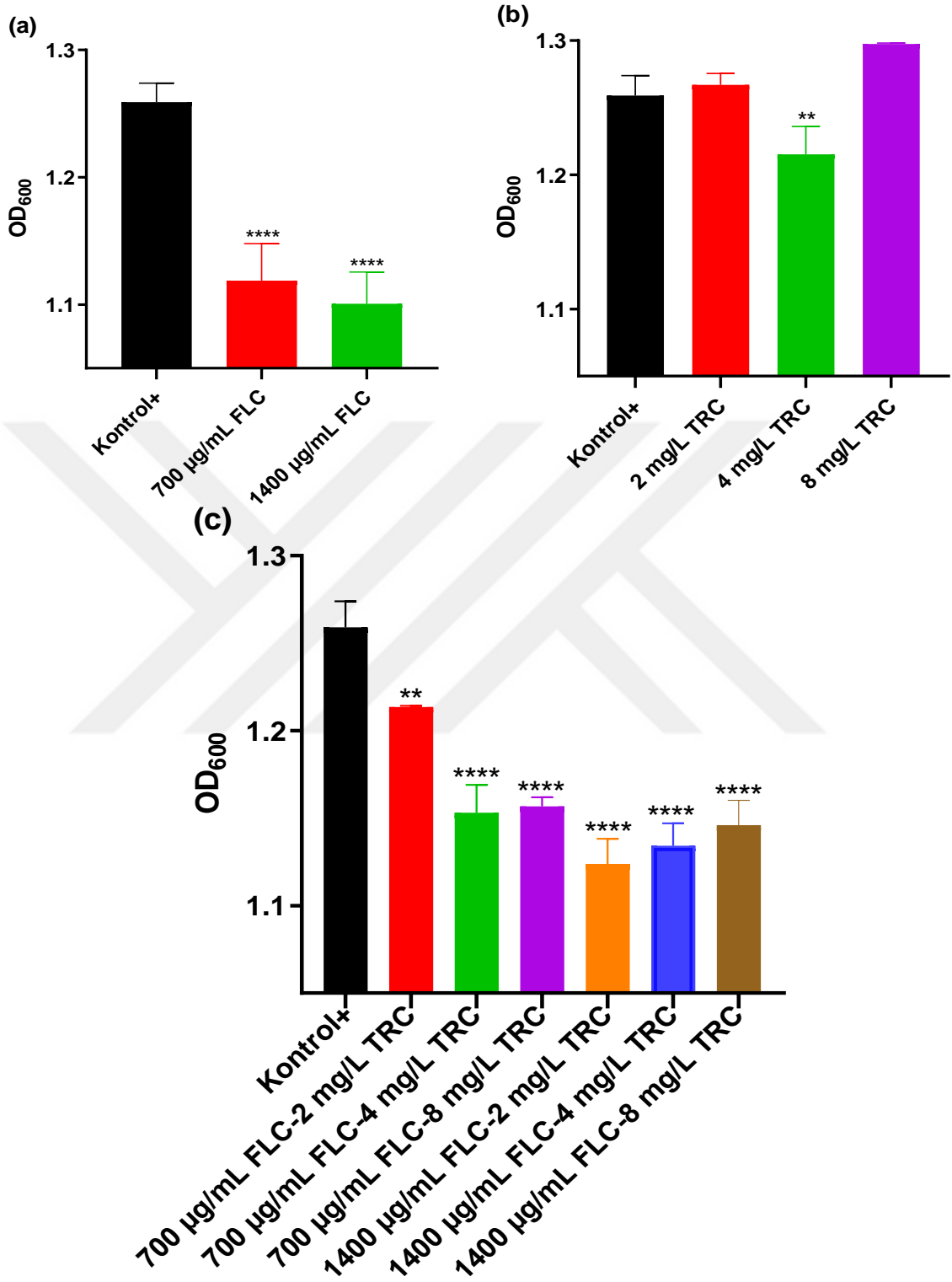
Şekil 4.2: Tetrakonazolün hücre canlılığı üzerine etkisi.

4.1.3. Tiyabendazolün hücre canlılığı üzerine etkisi

Bölüm 3.3.2’de açıklandığı gibi uygulanan deneyler sonucunda elde edilen değerlerin tiyabendazolü YES besiyeri içerisinde çözmek için ortama eklenen HCl’den kaynaklandığının anlaşılması üzerine ileriki adımlar için çakışma kapsamında çıkarıldı. *S. pombe* için fungisidal veya fungistatik olabilecek dozlarının çözünürlüğü organizmanın besiyerinin pH değerinin çok altında olmasından dolayı ortama 2M HCl eklendiği için 24.saat ölçümleri sonucunda üremedeki değişimin nedeninin etken madde olmadığı değişime neden olanın pH’ı düşürmek için kullanılan HCl’in olduğu gözlemlendi.

4.1.4. Flukonazol ile Tetrakonazolün kombine uygulamanın hücre canlılığı üzerine etkisi

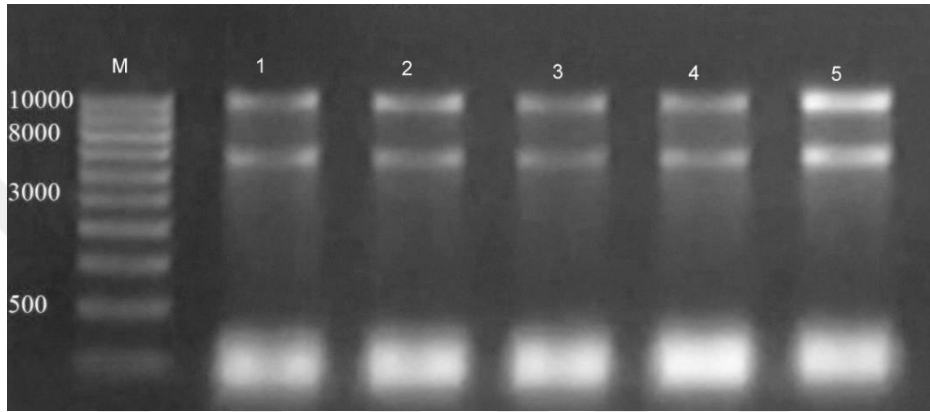
Düşük dozların kombine kullanımının ilacın etkinliğini artırıp arttırmadığını gözlemlemek için Bölüm 3.3.4'te anlatıldığı biçimde altı farklı kombinasyonda flukonazol (IC_5 700 μ g/mL ve IC_{10} =1400 μ g/ml) ve tetrakonazol (IC_5 =2, IC_{10} =4 ve IC_{20} =8 mg/mL) kombine uygulaması gerçekleştirildi. Şekil 4.3 tek başına kullanılan flukonazolün her iki dozunun da hücre canlılığında istatistiki olarak anlamlı bir inhibisyona yol açarken (Şekil 4.3.a) tetrakonazolün sadece IC_{10} inhibisyona yol açtığı (Şekil 4.3.b) gözlemlendi. Kombine kullanımda (Şekil 4.3.c) ise flukonazol'ün düşük dozunda tetrakonazol ile hücrenin üreme yeteneğini düşürürken daha yüksek doz kombine kullanımda ise hücrenin üreme yeteneğini baskılamadığı aksine üremede artış gözlemlendi.



Şekil 4.3: Flukonazol ve Tetrakonazol'ün kombine kullanımının hücre canlılığı üzerine etkisi. Spektrofotometrede OD₆₀₀ 'de alınan ölçümler 24. saatte alınmıştır. (*P<0.05, ** P<0.001, ****P<0.001).

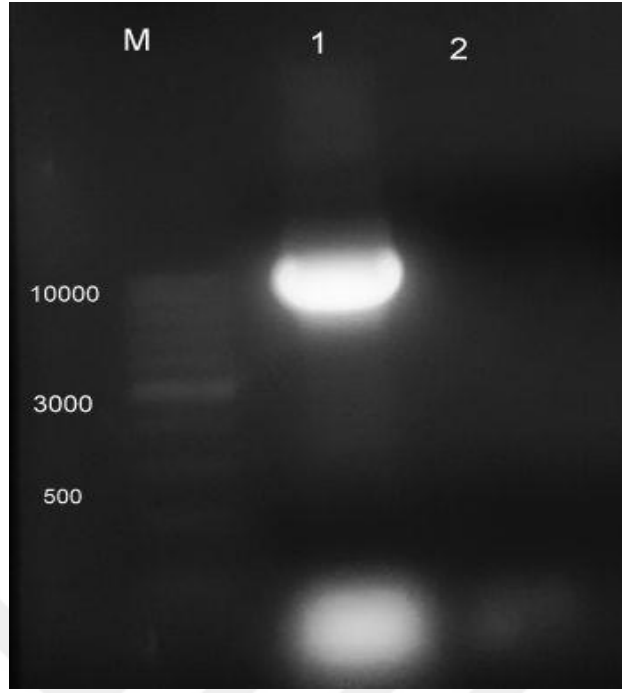
4.5. TOTAL RNA İZOLASYONU VE cDNA SENTEZİ

Elektroforetik analiz sonucunda, kontrol, 700 µg/mL ve 1400 µg/mL flukonazol uygulanmış izolasyonu yapılan örneklerin RNA'larının kırılmamış ve 3 bant (5.8S, 18S ve 28S rRNA) şeklinde olduğu gözlemlendi (Şekil4.4).



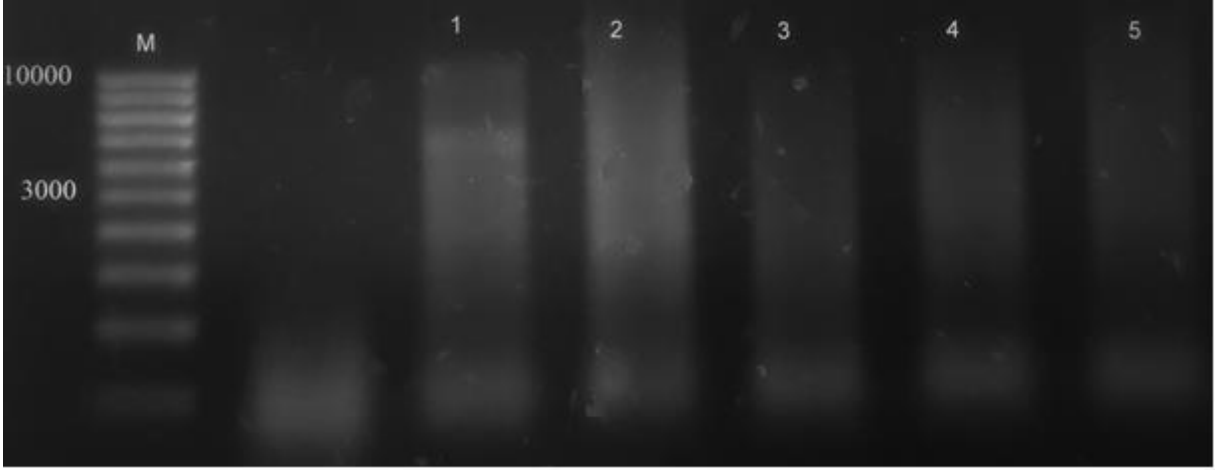
Şekil 4.4: *S. pombe* ED666 yabancı ırkının kontrol ve deney gruplarından izole edilen total RNA'ların elektroforetik görüntüsü .M: 1kb Marker, 1 ve 3: Kontrol grubu, 4: 700 µg/mL, 2 ve 5: 1400 µg/mL flukonazol uygulanmış örnek.

Elde edilen RNA örneklerinin DNA kontaminasyonu içermediğini göstermek amacıyla Tablo3.7 ve 3.8'de verilen değerler ve koşullarda PZR yapıldı. Pozitif kontrolde kalıp olarak DNA kullanıldı. Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, *gapdh3* primerlerinin beklenen ~120 baz çifti uzunluğundaki ürününün pozitif kontrolde gözlenmesine karşın, RNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı PZR'de gözlenmemesi, ortamda DNA kontaminasyonunun olmadığını teyid etmiştir.



Şekil 4.5: RNA örneklerinin DNA kontamisasyonu içermediğini göstermek amacıyla yapılan PZR'ın jel görüntüsü. M: Marker, 1: Pozitif kontrol ve 2:RNA örneği.

RNA örneklerinin cDNA sentezi için uygun olduğu kanıtlandıktan sonra ortamda 2000 ng/µl olacak şekilde cDNA sentezi yapıldı ve RT-PZR'da kullanılmak üzere 100 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı. Elde edilen 3 farklı deney grubunun cDNA'ları ve Tablo 3.4'teki primer çiftleri kullanılarak RT-PZR Tablo 3.13 ve 3.14'teki koşullarında gerçekleştirildi. Şekil 4.6'da gösterildiği üzere sentez gerçekleştirildikten sonra ileriki aşamalarda RT-PZR'de kullanıldı.



Şekil 4.6: cDNA sentez ürünlerinin %1'lik agaroz jel görüntüsü. M: 1kb Marker, 3:Kontrol grubu, 1&4: 700 µg/mL flukonazol uygulanmış örnek, 2&5: 1400 µg/mL flukonazol uygulanmış örnek.

4.5. RT-PZR SONUÇLARI

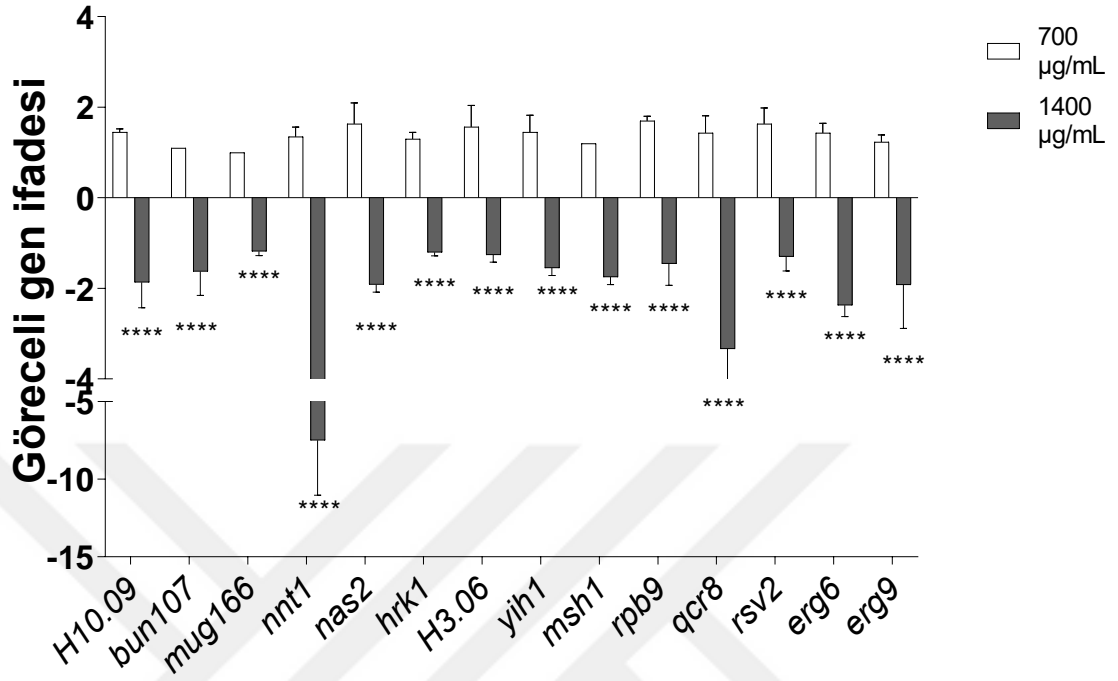
Öncelikle RT-PZR'in çalışma etkinliğini göstermek amacıyla Kontrol grubunun cDNA'sı sırasıyla; 100, 20, 4, ve 0.8 ng/µL derişimlerinde hazırlandı. Ardından bu seriler kullanılarak primerlerin standart grafiği çıkarıldı.

Proje kapsamında flukonazole dirençle ilişkili olduğu belirlenen 19 genden; *rhp18*, *SPCC338.06c*, ve *SPBC27B12.05* primerleri için anlamlı sonuçlar elde edilmediği için çalışma kapsamından çıkarıldılar.

Çalışma sonucunda *SPAC22H10.09*, *bun107*, *mug166*, *nnt1*, *nas2*, *yih1*, *SPAC4H3.06*, *msh1*, *rpb9*, *qcr8*, *rsv2*, *erg6* ve *erg9* genlerinin ifadesinin 700 µg/ml dozunda artarken (Şekil 4.7.A) 1400 µg/ml dozunda düştüğü, buna karşın *srp14*, *clp1*, *bgs4* ve *phb2* gen gruplarında ise her iki dozda azalırken (Şekil 4.7.B) *plh1*, *erg11* ve *erg31*'de arttığı (Şekil 4.7.C) gözlemlendi.

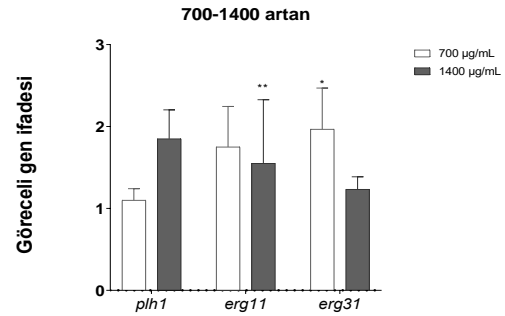
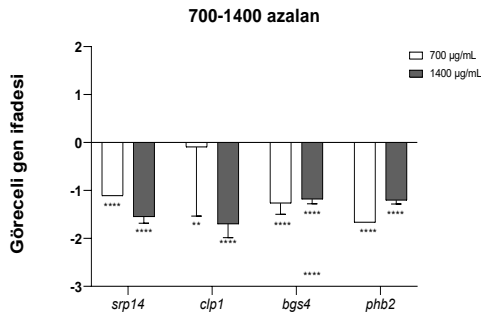
A)

700 artan-1400 azalan



B)

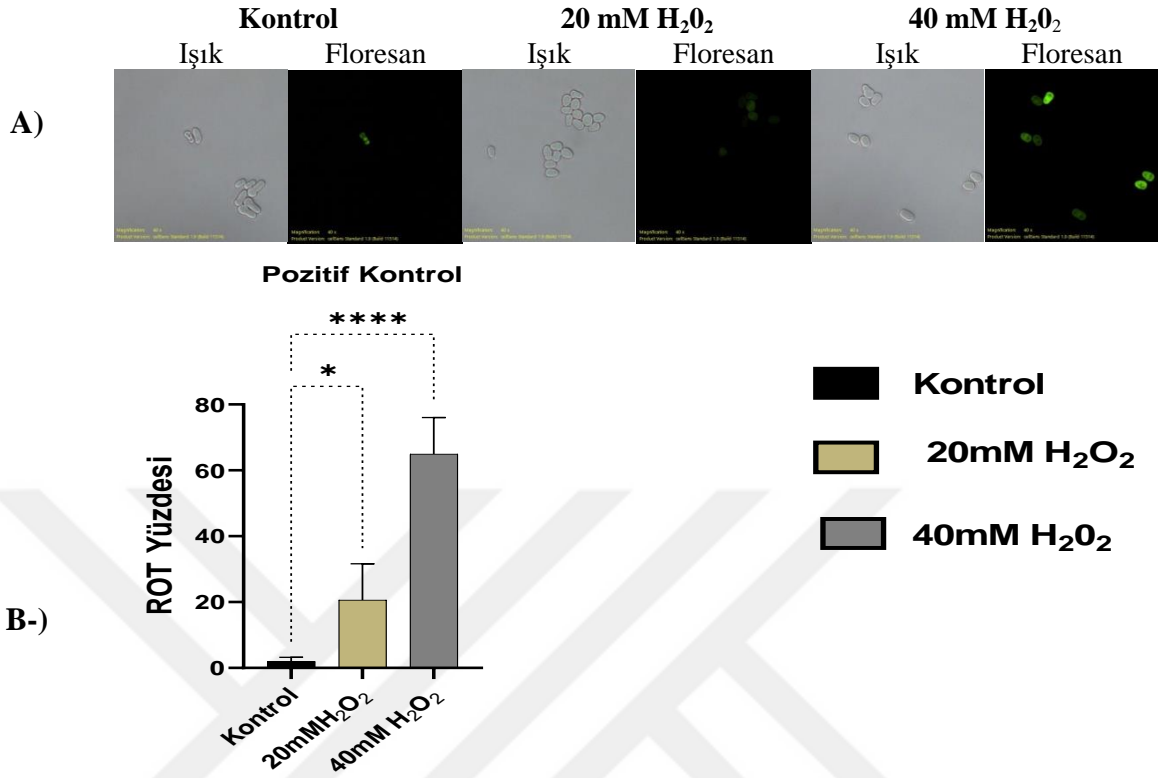
C)



Şekil 4.7: Çalışma kapsamında kullanılan genlerin göreceli anlatımı. (a) 700 µg/mL (IC_5) flukonazol uygulanmış örneklerde ifadeleri artıp 1400 µg/mL (IC_{10}) dozunda azalanları (b) her iki dozda da ifadeleri azalanları ve (c) her iki doz da ifadeleri artan genleri göstermektedir.

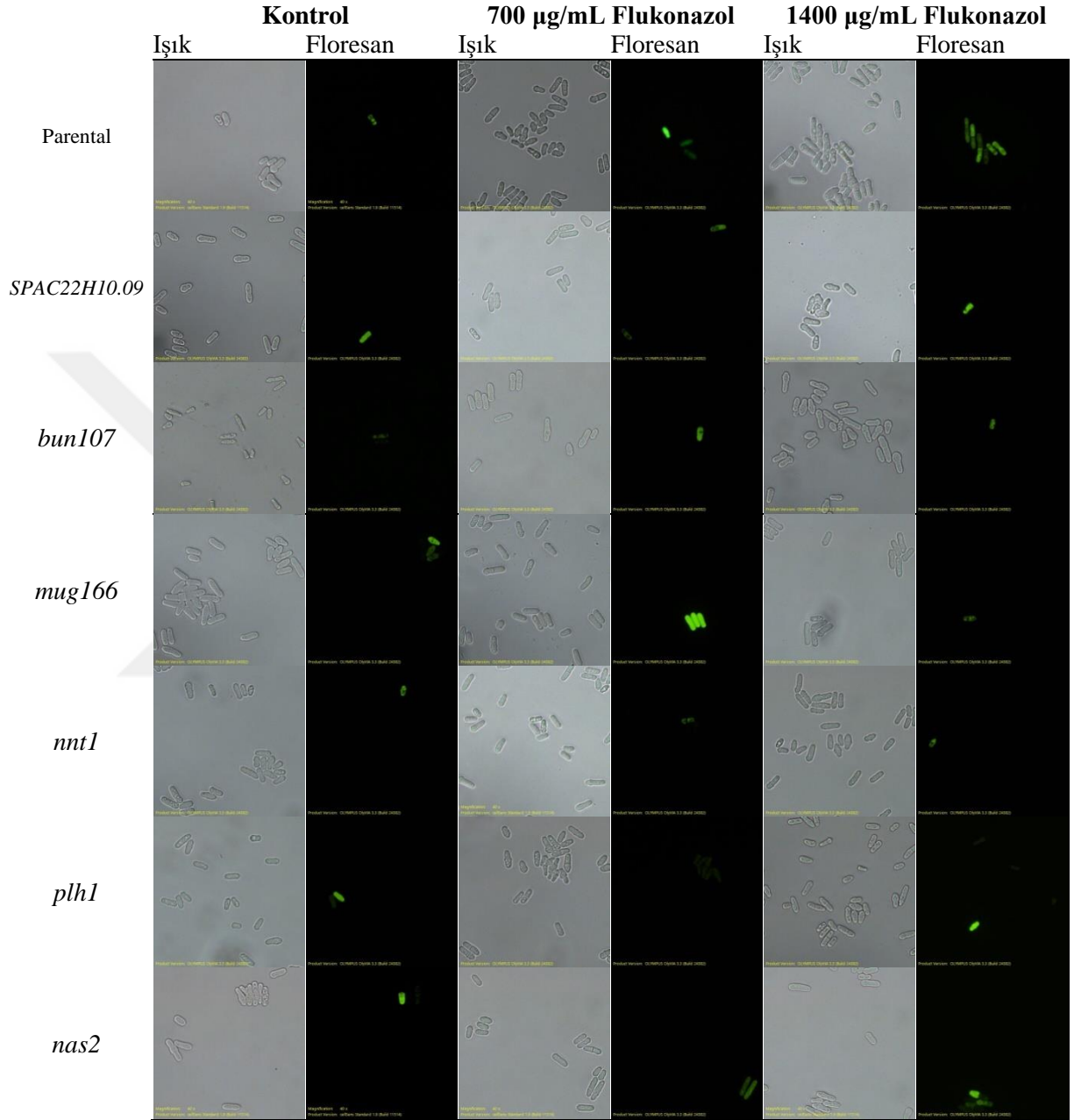
4.6. HÜCRE İÇİ REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN (ROT) FLORESAN MİKROSKOPİSİ İLE GÖSTERİMİ

Bu çalışmada başlangıçta ele alınan 19 genden RT-PZR denemeleri esnasında çıkarılan 3 gen (*rhp18*, *SPCC338.06c*, ve *SPBC27B12.05*) sonucunda kalan 16 genin (*SPAC22H10.09*, *bun107*, *mug166*, *nnt1*, *nas2*, *yih1*, *hrk1*, *SPAC4H3.06*, *msh1*, *rpb9*, *qcr8*, *rsv2*, *srp14*, *clp1*, *bgs4* ve *plh1*) delesyonunu taşıyan ırklarında ve literatür taramasından elde edilen diğer iki delesyonlu ırkta (*phb2* ve *erg31*) flukonazolün IC₅ ve IC₁₀ dozlarının hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) üzerine etkileri olup olmadığını anlamak için DCFH-DA yöntemi kullanıldı. Öncelikle, uygulanan yöntemin işlerliği, ROT tetikleyicisi olduğu bilinen H₂O₂ (20 mM ve 40 mM H₂O₂) uygulaması ile test edildi. Pozitif kontrol olarak kullanılan 20 mM ve 40 mM H₂O₂ uygulanmış *S. pombe* ED666 ırkında kontrole göre doz bağımlı bir şekilde giderek artan şiddette yeşil ışımaya yapan hücre sayısının olduğu mikroskopik görüntülerinde tespit edildi (Şekil 4.8.A). Ek olarak, 20 mM H₂O₂ uygulaması ile %20, 40 mM H₂O₂ uygulaması ile de % 60 ROT (Şekil 4.8.B) çıkışı tespit edildi.

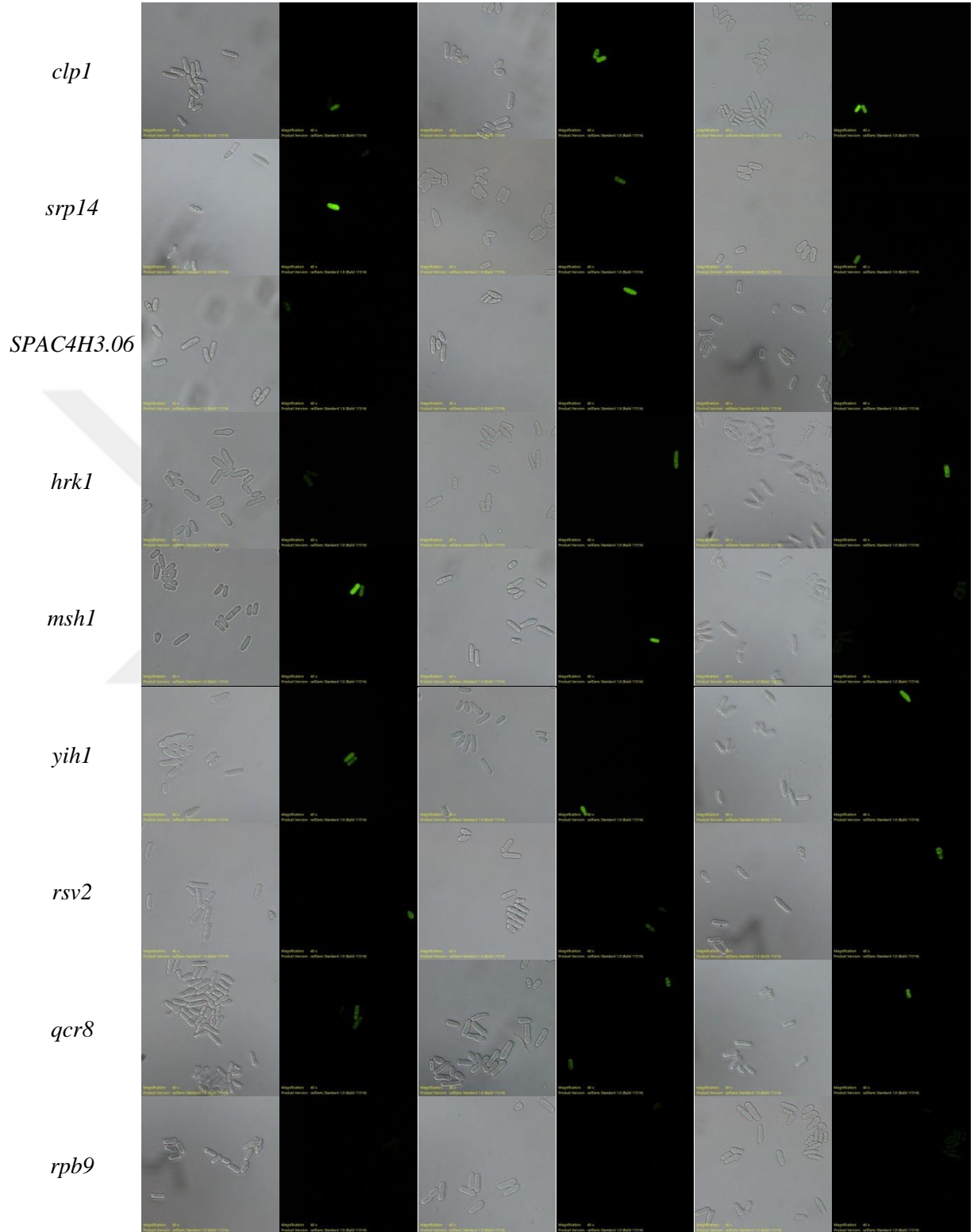


Şekil 4.8: Hücre içi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) oluşumuna neden olan H₂O₂'nin *S. pombe* ED666 yabancı ırkında 20 mM ve 40 mM H₂O₂ konsantrasyonlarında ve DCFH-DA boyası uygulanması neticesinde hücrelerin (a) Kontrol ve 20mM ve 40mM H₂O₂ uygulanmış hücrelerin DCFH-DA floresan ve ışık görüntüsü (b) bu grupların ROT yüzdesi (*:P<0.05, ****: P<0.0001).

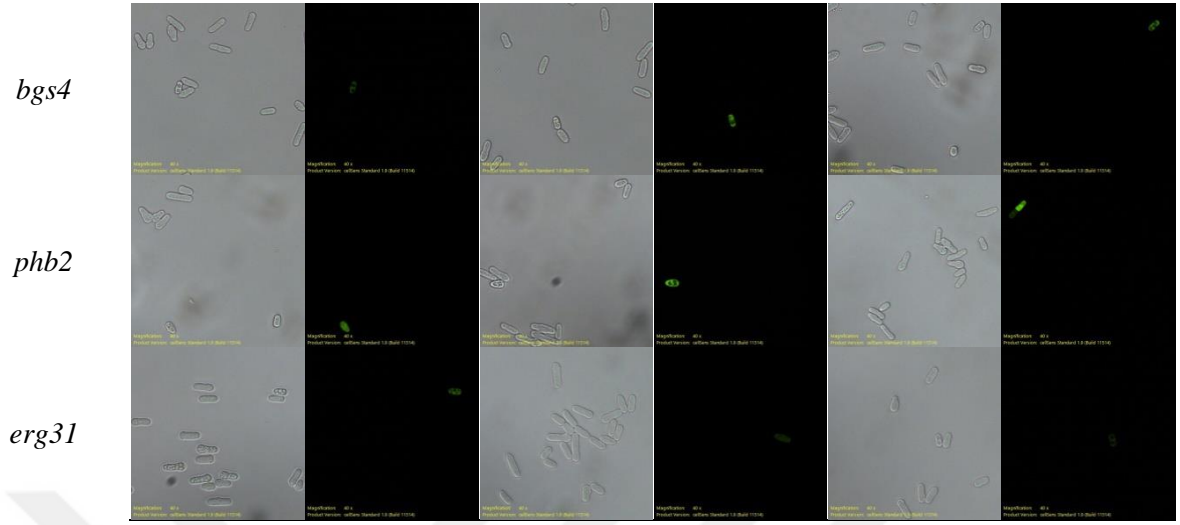
Ardından, DCFH-DA boyası, Tablo 3.1'de verilen genler açısından delesyonlu hücre suşlarına flukonazol ile birlikte 2 saat boyunca uygulandı. Ancak, her iki flukonazol dozunun da kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bir ROT artışına yol açmadığı hem mikroskopik taramalarda (Şekil 4.9) hem de grafikte (Şekil 4.10) gözlemlenmedi. Bu mutantların arasında sadece *msh1Δ* suşunda istatistiksel açıdan anlamlı bir ROT artışı gözlemlendi.



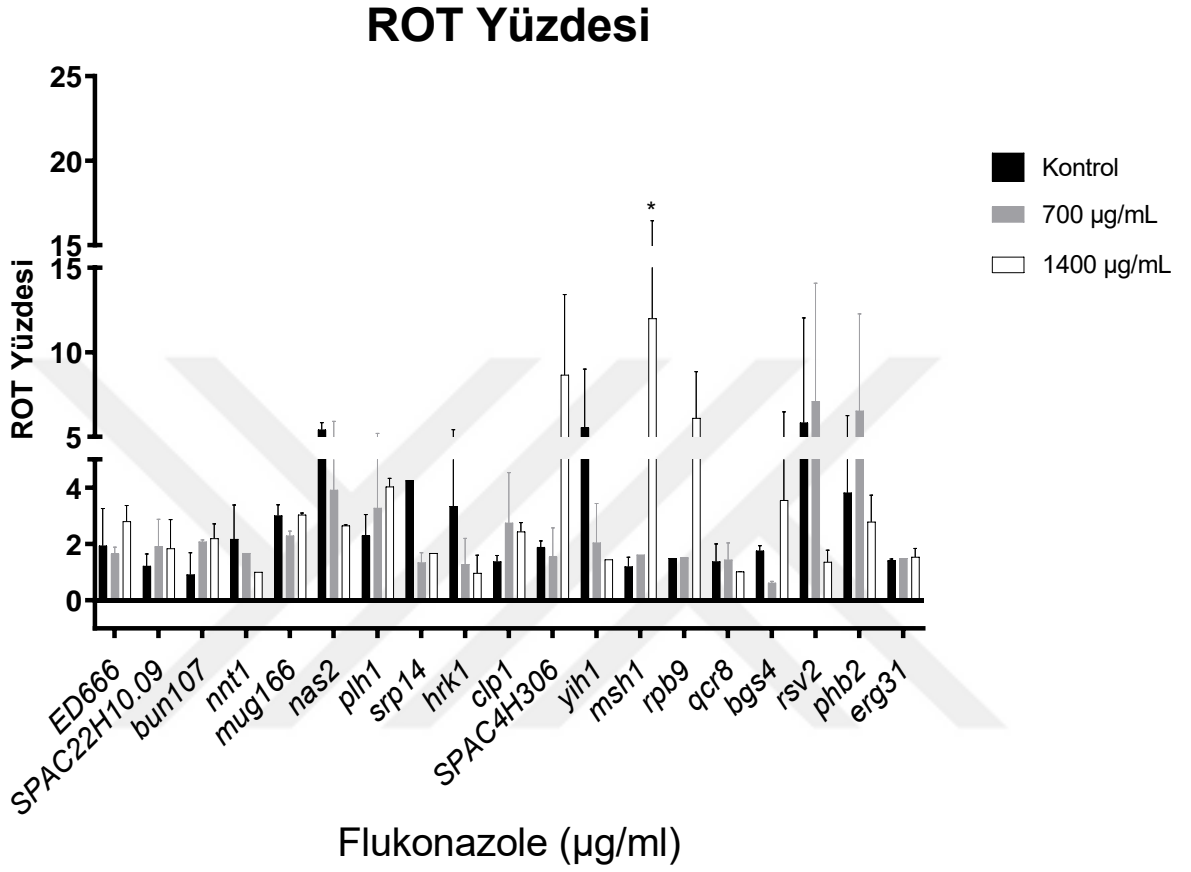
Şekil 4.9: Flukonazolün IC₅ (700 µg/mL) ve IC₁₀ (1400 µg/mL) dozlarının uygulandığı mutant hücre suşlarının ışık ve floresan görüntüleri.



Şekil 4.9: (Devamı).



Şekil 4.9: (Devamı).



Şekil 4.10: Kontrol ve Flukonazolün IC₅ (700 µg/mL) ve IC₁₀ (1400 µg/mL) dozlarının uygulandığı *S. pombe* delesyonlu hücre suşlarındaki ROT oluşum yüzdesi. |

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Modern tıptaki gelişmeler birçok hastalığı tedavi edip yayılmasını önlemiş olsa da özellikle son yıllarda antifungal ilaçların düzensiz, uzun süreli ve dikkatsiz kullanımı, hedef patojenlerin zaman içinde direnç kazanmasına yol açmıştır. Antifungal ilaç direncine yol açan başlıca nedenler, ilaç hedefinin değişikliği veya aşırı ekspresyonu, çoklu ilaç taşıyıcılarının yukarı regülasyonu ve stres tepkilerinin aktivasyonu gibi çok sayıda adaptif mekanizma bulunmaktadır (Shapiro ve diğ., 2011). Ayrıca *S. pombe* ve diğer mantarlarda dirence veya duyarlılığa neden olan genlerin çoğu çeşitli fonksiyonel kategorilere ayrılabilir. Bunlar; ergosterol biyosentezi, membran trafiği, histon asetilasyon ve deasetilasyonu, ubikitinasyon, sinyal iletimi, ribozom biyosentezi ve düzenlenişi, transkripsiyon ve tranlasyonun düzenlenişi, hücre duvarı biyogenezi ve organizasyonu, mitokondriyal fonksiyon, amino ve nükleik asit metabolizması, lipid metabolizması, mayoz, hücre polaritesi ve kromatin düzenlenişi ile ilgili süreçlerde rol alır (Fang ve diğ., 2011). Sınırlı sayıdaki antifungal savunma mekanizmaları, çoklu ilaç direnci olan mantar türlerinin gelişmesi ve özünde dirençli patojenlerin ortaya çıkmasıyla daha da tehdit altındadır (Revie ve diğ., 2018).

Sistemik mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için üç sınıf antifungal ilaç kullanılmaktadır. Bunlar ergosterol biyosentez yolağını hedefleyen azoller, mantar hücre duvarı biyosentezini engelleyen ekinokandinler ve mantar hücre zarında hücre parçalanmasına yol açan polienlerdir (Perfect, 2017; Robbins ve diğ., 2017). Bu ilaçların uzun süreli ve dikkatsiz kullanımı antifungal direncin ortaya çıkmasına nede olmuştur. Bu durumun üstesinden gelmek için sınırlı sayıda etken madde olduğundan fungisidal veya fungistatik olabilecek başka hedefleri belirlemek ve buna uygun yeni ilaçlar geliştirmek, konakçının bağışıklık sistemini güçlendirmek ve ilacın farmakokinetiğini arttırmak gibi yöntemler bu durumun üstesinden gelmek için yapılan çalışmalardan birkaç tanesidir (Bhattacharya ve diğ., 2020). Kombine ilaç kullanımı; özellikle iki farklı yolağı hedefleyen ilaçların kombine kullanımı geniş etki yelpazesi, ayrı ayrı kullanımdan daha fazla etki ve patojenin iki farklı ajana direnç geliştirmesi daha zor olacağından ve ilaca duyarlılığının artmasından dolayı tercih edilen ve son yıllarda yapılan çalışmalarla

etkinliği kanıtlanan yöntemlerden bir tanesidir (Denardi ve diğ., 2016; Fkhim ve diğ., 2017; Ghannoum ve diğ., 1995; Mukherjee ve diğ., 2005).

Bu tez çalışmasında, araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirilen ve 2017 yılında tamamlanan “İnsan hastalıklarının moleküler mekanizmalarının araştırılmasında *Schizosaccharomyces pombe*'nin model organizma olarak kullanılmasının optimizasyonu” başlıklı ve 51649 kodlu BAP projesinde, antifungal direnç ile ilişkisi belirlenen 19 genin antifungal ilaç direncinde yeni hedef genler olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceği sorgulanmıştır. Bu amaçla söz konusu 19 gen ile literatürde deneysel olarak ilişkisi kesinleşmiş 5 genin antifungal ilaç direncindeki rolleri, ökaryotik tek hücreli model organizma olan fisyon mayası'nın (*S. pombe*) ED666 suşunda üç farklı antifungal ajanın (flukonazol, tetrakonazol ve tiyabendazol) ayrı ayrı ve flukonazol ile tetrakonazolün kombine kullanımı araştırıldı. Bu kapsamda, öncelikle, her üç ajanın minimum inhibe edici konsantrasyonları (MİK) hesaplandı. Buna göre, flukonazol için $IC_{50} = 4680 \mu\text{g}$, ve tetrakonazol için $IC_{50} = 14,4 \mu\text{g}$, değerleri bulundu (şekil 4.1 ve şekil 4.2). Tiyabendazol'ün fungisidal veya fungistatik olabilecek dozlarının çözünürlüğünün, *S. pombe* besiyerinin optimal pH değerinin çok altında kalması nedeniyle, üreme ortamına 2M HCl ilave edildi. Ancak, bu durumun hücre canlılığı üzerine ilave toksik etkisinin olması, tiyabendazol için belirlenen IC_{50} değerine güvensizlik oluşturarak çalışma dışı bırakılmasına yol açmıştır.

Çalışmada kullanılan antifungal ajanlardan şekil 4.3'te gösterildiği şekilde flukonazolün IC_5 (700 $\mu\text{g/mL}$) ve IC_{10} (1400 $\mu\text{g/mL}$) değerleri ile tetrakonazolün IC_5 , IC_{10} ve IC_{20} değerleri kombine edilerek *S. pombe* ED666 ırkının üreme kapasitesine etkileri araştırıldı. Burada en yüksek ölüm oranının IC_{10} flukonazol ile IC_5 tetrakonazolde sağlanması önemli bir değer olmakla beraber, tetrakonazolün devamının sağlanamaması nedeniyle, çalışmaya sadece $IC_5 = 700 \mu\text{g/mL}$ ve $IC_{10} = 1400 \mu\text{g/mL}$ flukonazol ile devam edilmiştir. şekil 4.1'de gösterildiği gibi flukonazol uygulanan örneklerde doz artışına rağmen dramatik bir düşüşün sadece yüksek dozlarda sağlanabilmesinin, mantarlarda stresin (compensatory response) hücre duvarı içeriğinde (protein, polisakkarit ve kitin gibi) değişim meydana getirerek adaptif yanıt oluşturmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Sorgo ve diğ., 2011). Bu durumun, mantar suşlarının MİK'in üzerindeki değerlerde büyüme ve gelişme gösterebildikleri paradoksiyal etkiyi meydana getirdiği bilinir (Vigles ve diğ., 2021).

Ergosterolün hormon benzeri fonksiyonu sayesinde bölünme ve gelişimi uyarmasının yanı sıra bazı yüksek MİK değerlerinde bile artan ERG ifadesinin, yüksek OD değerine neden olduğu rapor edilmiştir (Hubberstey ve diğ., 2002; Thevelein ve de Winde, 1993).

Çalışmada ele alınan 19 yeni aday gen ile 5 pozitif hedef genin anlatım profilleri, *S. pombe* ED666 ırkında flukonazol'un 700 ve 1400 µg/mL dozlarında çıkarıldı. Bu 19 yeni aday genden 3 (*rhp18*, *SPCC338.06c*, ve *SPBC27B12.05*) tanesinin primerleri beklenen verimliliği sağlayamadığı için çalışma dışı bırakıldı. Bu 16 yeni aday gen arasından çeşitli süreçlerden sorumlu (Translasyon, transferaz, lipid ve gliserid üretimi, proteozom oluşumu, DNA onarımı, mitokondri ve ergosterol biyosentezi) *SPAC22H10.09*, *bun107*, *mug166*, *nnt1*, *nas2*, *yih1*, *SPAC4H3.06*, *msh1*, *rpb9*, *qcr8*, *rsv2*, *erg6* ve *erg9* genlerinin ifadesinin IC₅= 700 µg/ml dozunda istatistiki olarak anlamlı olmakla beraber artarken IC₁₀= 1400 µg/ml dozunda düştüğü, (Şekil 4.7.A) buna karşın (sinyal iletimi, fosfataz, mitokondri ve hücre duvarı biyogenezi süreçlerinde rol alan) *srp14*, *clp1*, *bgs4* ve *phb2* genlerinde her iki dozda istatistiki olarak azaldığı (Şekil 4.7.B) ancak sterol ve ergosterol sentezinden sorumlu olan *plh1*, *erg11* ve *erg31*'de arttığı (Şekil 4.7.C) gözlemlendi. Bu sonuçların *S. pombe*'nin güçlü çoklu ilaç direnci mekanizmasına sahip olduğu gerçeğiyle paralellik göstermesi beklenmeyen bir durum değildir (Arita ve diğ., 2011; Wolfger ve diğ., 2001). Kanser hücreleri ile yapılan benzer çalışmalarda dirençle ilgili genlerin düşük ilaç dozlarında indüksiyonu gerçekleşirken, yüksek dozlarda inhibe edildikleri bilinmektedir (Suzuki ve diğ., 2001; Ding ve diğ., 2005). Çalışmamızda, her iki dozda da anlatımları artmış olan genlerden ergosterol biyosentez yolağında rol alan *erg31* (*S. cerevisiae* Erg3 ortoloğu) ve azol hedefi *erg11* genlerinin önceki çalışmalarda da azol muamelesi sonrası upregüle olması, sonuçlarımızı desteklemektedir (Isabelle ve diğ., 2006).

Literatürde *erg11* gen anlatımındaki artışın ilaç direnci tepkisine yol açmasının hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu ile açıklanmış olması ve monooksijenaz-hidroksilaz aktivitesi olan sitokrom P450 enziminin de hücre içi oksidatif stresi önlemiş olabileceğinin ileri sürülmesi (Isabelle ve diğ., 2006), azol direncinde tespit ettiğimiz yeni aday genler bakımından delesyonlu ırklarda flukonazol uygulaması sonrasında ROT artışının gözlenmemesi (Şekil 4.10) çalışmamızı desteklemektedir. Çalışmada kullanılan ROT ölçüm tekniği, *S. pombe* ED666 ırkına artan dozlarda hidrojen peroksit (20 mM ve

40 mM, 2 saat) uygulaması ile değerlendirilmiştir. Buna göre, 20 mM H₂O₂ uygulaması ile %20, 40 mM H₂O₂ uygulaması ile de % 60 ROT çıkışı tespit edilirken (Şekil 4.8.B), flukonazol direnci ile ilişkili yeni aday genler bakımında delesyonlu ırklarda, *S. pombe msh1Δ* ırkı hariç, ROT artışının gözlenmemesi, ROT seviyesinin düşmesi ile artan flukonazol direnç mekanizmasının ilişkisini desteklemektedir (Şekil 4.10). Ek olarak, çalışmaya eklenen *erg11* ve *erg31* genlerinin transkripsiyonları flukonazolun artan dozlarına paralel artarken, aday genlerinkilerinin düşüşü (Şekil 4.7.C) aday genlerin mutant ırklarında gözlenen ROT seviyelerindeki azalma (Şekil 4.10) ile birlikte değerlendirildiğinde oldukça önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Çünkü, son zamanlarda artan ERG seviyesinin artan oksidatif dirençle de bağlantılı olduğu üzerinde durulmaktadır (Jorda ve Puige, 2020). Bunlara ek olarak, Martins ve arkadaşlarının (2019) *S.cerevisiae*'de yaptıkları çalışmada 24 saatlik azol muamelesi sonrası düşük dozlarda katalaz aktivitesinin iki veya üç katına çıktığını ancak fungisidal olabilecek daha yüksek dozlarda katalaz aktivitesinin düştüğünü ve ROT seviyesinin ancak dozun fungisidal olabilecek seviyede arttığını ve MİK'in altındaki dozlarda da katalaz seviyesinin 3 - 4 kat arttığını rapor etmişlerdir. Yine bu kapsamda, *S. cerevisiae*'de yapılan çalışmalarda fungistatik dozlarda katalaz aktivitesinin arttığı ve bu durumun hücreleri H₂O₂ toksisitesinden kurtardığı bildirilmiştir (Nollin ve diğ., 1977; François ve diğ., 2006).

Son yıllarda, birçok klinik araştırma ilaç direncinin genin aşırı ekspresyonuyla ilişkili olmadığını en azından ilaçtan ilaca bunun değişebileceğini hatta bazı ilaçlar için direncin "hedef gen" in aşırı ekspresyonundan kaynaklanamayacağı, çünkü böyle bir tek genin olmadığını ileri sürmekle beraber (Plamer ve Kishony, 2014), bu tez çalışmasında kullanılan ajanın IC₅ gibi çok düşük bir toksik dozunda ele alınan genlerin anlatımlarını değiştirmedeği, IC₁₀ dozunda anlatımlarını büyük oranda düşürdüğü gözlemlendi. Literatürle paralel olarak *erg6* ve *erg9*'un aşağı düzenlenmesi, *erg11* ve *erg31* genlerinin yukarı düzenlenmesi de bu sonuçları değerli kılmaktadır. *Escherichia coli*'deki antibiyotik hedefleri kademeli olarak aşırı ifade edilmesine rağmen ilaç direncinin bir şekilde artabileceğini, değişmeden kalabileceğini, azaltabileceğini ve hatta değişebileceği bulundu. Bazı ilaçlara direnç ise hedef genin ifadesinden bağımsız olabileceği bulundu. Enzim inhibe edici ilaçlar için, hedef aşırı ekspresyonu, inhibisyonu telafi ederek direnç sağlayabilir, ancak aşırı ekspresyon maliyetli ise direnç potansiyeli sınırlı olabilir. aynı

hedefe sahip iki ilacın etki mekanizmalarındaki farklılıkları yansıtan, hedef aşırı ekspresyonuna zıt tepkiler gösterebilir (Plamer ve Kishony, 2014).

Ayrıca, ele alınan bu genleri içermeyen delesyonlu *S. pombe* ırklarının flukonazole dirençli olmalarını da açıklamaktadır. Sonuç olarak, *SPAC22H10.09*, *bun107*, *mug166*, *nnt1*, *nas2*, *yih1*, *SPAC4H3.06*, *msh1*, *rpb9*, *qcr8*, *rsv2*, *srp14*, *clp1*, *bgs4*, ve *plh1* genlerinin ilk defa bu tez çalışmasında ilaç direnci ile ilişkisi ortaya konurken, dirençte bu genlerin aşağı düzenlenmiş olmalarının da rolü olduğu düşünülmektedir. Devam eden çalışmalarda, bu tez çalışmasında başlangıçta dahil edilip sonra teknik sorunlarla çıkarılan, tetrakonazol dahil farklı etken maddelerin ayrı ayrı ve kombine kullanılacağı koşullarda, genlerin tek tek ele alınıp moleküler hücre mekanizmalarındaki işlevlerinin anlaşılması hedeflenmiştir.



KAYNAKLAR

- Abhilash, K., Sandra, A., A., Emilie, T., Steve, K., Josie, P., Dominique, S., 2019, Comparative Genomics for the Elucidation of Multidrug Resistance in *Candida lusitanae*, *American society for microbiology*, e02512-19.
- Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N., & Khan, L. A., 2010, Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*, *Microbial pathogenesis*, 48(1), 35-41.
- Anderson, J. B., Sirjusingh, C., Syed, N., & Lafayette, S., 2009, Gene expression and evolution of antifungal drug resistance, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(5), 1931-1936.
- Andrea, P., Elizabeth, J., Elisa, C., Paolo, T., Jacques, G., and Mario, P., 2020, Antifungal Resistance Regarding *Malassezia pachydermatis*: Where Are We Now?, *Journal Of fungi*, 6(2): 93.
- Andrews, J. M., 2001, Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48(suppl_1), 5-16.
- Aneke, C. I., Rhimi, W., Otranto, D., & Cafarchia, C., 2020, Synergistic effects of efflux pump modulators on the azole antifungal susceptibility of *Microsporium canis*, *mycopathologia*, 185(2), 279-288.
- Antonella, L., Romano, D., Mario, C., Mario, D., Tacca and Steven, K., 2002, Molecular Basis of r,Resistance to Azole Antifungals, *TRENDS in Molecular medicine*, 8:76-81.
- Arita, Y., Nishimura, S., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Usui, T., Boone, C., & Yoshida, M., 2011, Microarray-based target identification using drug hypersensitive fission yeast expressing ORFeome. *Molecular biosystems*, 7(5), 1463-1472.
- Bandara, H., M., H., N., Lam, O., L., T., Jin, L., J., & Samaranyake, L. 2012, Microbial Chemical Signaling: A Current Perspective, *Critical reviews in microbiology*, 38:217-49.
- Belenky, P., Camacho, D., & Collins, J. J., 2013, Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. *Cell reports*, 3(2), 350-358.
- Bhattacharya, S., Esquivel, B. D., & White, T. C., 2018, Overexpression or deletion of ergosterol biosynthesis genes alters doubling time, response to stress agents, and drug susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular biology*, 9(4), e01291-18.
- Bhattacharya, S., Sae-Tia, S., & Fries, B., C., 2020, Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics*, 9;9(6):312.
- Blair, J., Webber, M., A., Baylay, A., J., Ogbolu, D., O., & Piddock, L., J., 2014, Molecular mechanisms of antibiotic resistance, *Nature reviews microbiology*, 13, 42-51.

- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C., 2012, Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*, 4(165), 165rv13-165rv13.
- Chaabane, F., Graf, A., Jequier, L., & Coste, A., T., 2019, Review on Antifungal Resistance Mechanism in The Emerging Pathogen *Candida Auris*, *Frontiers on microbiology*, 10:2788.
- Chang, Z., Yadav, V., Lee, S., C., & Heitman, J., 2019, Epigenetic mechanisms of drug resistance in fungi. *Fungal genetics and biology*, 132, 103253.
- Charles, S., Hoffman., Valerie, Wood., and P. A., Fantès., 2015, An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System, *Genetics* 201,403-423.
- Cheshta, S., Nelson-Sathib, S., Singh, A., Pillai, M. R., & Chowdhary, A., 2019, Genomic perspective of triazole resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates without cyp51A mutations, *Fungal genetic and biology*, 132:103265.
- Cowen, L., E., Sanglard, D., Howard, S., J., Rogers, P., D., & Perlin, D., S., 2015, Mechanisms of Antifungal Drug Resistance, *Cold spring harbor perspective medicine*, 5:a019752.
- Darma, S., Ambara, A., Aman, A., T., Annisa, L., Nuryastuti, T., & Wibawa, T., 2020, High frequency of azole resistant *Candida* spp. colonization among presumptive multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) patients, *Plos one*, 15:e0242542.
- Decottignies, A., Sanchez-Perez, I., & Nurse, P., 2003, *Schizosaccharomyces pombe* essential genes: a pilot study, *Genome research*, 13(3), 399-406.
- Denardi, L., B., Keller, J., T., Oliveira, V., Mario, D., A., N., Santurio, J., M., & Alves, S., H., 2017, Activity of Combined Antifungal Agents Against MultidrugResistant *Candida glabrata* Strains, *Mycopathologia*, 182:819-828.
- Ding, L., H., Shingyoji, M., Chen, F., Hwang, J. J., Burma, S., Lee, C., & Chen, D. J., 2005, Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiation research*, 164(1), 17-26.
- Dominique, S., 2016, Emerging Threats in Antingual-Resistant Fungal Pathogens, *Frontiers in Medicine*, 3:11.
- Dorival, M., Dao, N., Ann, M., E., 2019, Ctt1 catalase activity potentiates antifungal azoles in the emerging opportunistic pathogen *Saccharomyces cerevisiae*, *Scientific reports*, 9,9185.
- Dutcher, J. D., 1968, The discovery and development of amphotericin B. *Diseases of the chest*, 54, 296-298.
- Fang, Y., Hu, L., Zhou, X., Jaiseng, W., Zhang, B., Takami, T., & Kuno, T., 2012, A genomewide screen in *Schizosaccharomyces pombe* for genes affecting the sensitivity

- of antifungal drugs that target ergosterol biosynthesis, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), 1949-1959.
- Fantes, P., A., and Charles, S., H., 2016, A Brief History of *Schizosaccharomyces pombe* Research: A Perspective Over the Past 70 Years, *Genetics*, 203, 621-629.
- Fisher, M., C., Henk, D., Briggs, C., J., Brownstein, J., S., Madoff, L., C., McCraw, S., L., & Gurr, S., J., 2012, Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186-194.
- Forsburg, S., L., 1999, The best yeast, Comparative genomics in yeast, *Genome biology* 0168-9525/99.
- Francois, I., E., Cammue, B., Borgers, M., Ausma, J., Dispersyn, G., D., & Thevissen, K., 2006, Azoles: mode of antifungal action and resistance development, Effect of miconazole on endogenous reactive oxygen species production in *Candida albicans*, *Anti-infective agents in medicinal chemistry (Formerly current medicinal chemistry-anti-infective agents)*, 5(1), 3-13.
- Garcia-Effron, G., 2021, Molecular Markers of Antifungal Resistance: Potential Uses in Routine Practice and Future Perspectives, *Journal of fungi*, 7(3), 197.
- Gaur, M., Choudhury, D., & Prasad, R., 2005, Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbial physiology*, 9(1), 3-15.
- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., and Loprieno, N., 1974, *Schizosaccharomyces pombe*, In *Bacteria, Bacteriophages, and Fungi*, Springer, Boston, MA, 395-446
- Hanna, M., & Xiao, W., 2006, Isolation of nucleic acids. In *Yeast Protocol* (pp. 15-20). Humana Press, Totowa, NJ.
- Hayles, J., & Nurse, P., 2018, Introduction to fission yeast as a model system. *Cold spring harbor protocols*, 2018(5), pdb-top079749.
- Henry, K., W., Nickels, J., T., & Edlind, T., D., 2000, Upregulation of ERG Genes in *Candida* Species by Azoles and Other Sterol Biosynthesis Inhibitors, *Antimicrobial agents and microbiology*, p.2693-2700.
- Higgins, C., F., 1992, ABC transporters: from microorganisms to man, *Annual review cell biology*, 8, 67-113.
- Hirata, D., Yano, K., & Miyakawa, T., 1994, Stress-induced transcriptional activation mediated by YAP1 and YAP2 genes that encode the Jun family of transcriptional activators in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and general genetics MGG*, 242(3), 250-256.
- Hsieh, M., H., Chen, M., Y., Victor, L., Y., & Chow, J., W., 1993, Synergy assessed by checkerboard a critical analysis. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 16(4), 343-349.

- Iain, M., Hagan, A., Grallert and Viesturs S., 2016, Analysis of the *Schizosaccharomyces pombe* Cell Cycle, *Cold spring harbor protocols*, 27587785.
- Iwaki, T., Giga-Hama, Y., and Takegawa, K., 2006, A survey of all 11 ABC transporters in fission yeast: two novel ABC transporters are required for red pigment accumulation in a *Schizosaccharomyces pombe* adenine biosynthetic mutant, *Microbiology* 152, 2309–2321
- İbişoğlu M., S., 2021, *Schizosaccharomyces pombe*'de Hexoz Taşıyıcılarının Düzenlenmesine Katılan Transkripsiyon Faktörlerinin Araştırılması, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi.
- Jinnan, Z., Conghai, Z., Yufei, G., Yang, J., Huaxin, L., Gang, Z., 2013, Thiabendazole, a well-known antifungal drug, exhibits anti-metastatic melanoma B16F10 activity via inhibiting VEGF expression and inducing apoptosis, *Pharmazie*, 68:962-968.
- Jinxing, S., Jingwen, Z., Lei, Z. and Rongpeng, L., 2020, Mitochondria-Mediated Azole Drug Resistance and Fungal Pathogenicity: Opportunities for Therapeutic Development, *Microorganisms*, 8,1574.
- Jordá, T., & Puig, S. (2020). Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, 11(7), 795.
- Kartal B., 2017, *Schizosaccharomyces pombe*'de Tiamin'in Stres Yanıtı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi.
- Kawashima, S., A., Takemoto, A., Nurse, P., & Kapoor, T., M., 2012, Analyzing Fission Yeast Multidrug Resistance Mechanisms to Develop a Genetically Tractable Model System for Chemical Biology, *Chemistry&Biology*, 19,893-901.
- Lee, W., & Lee, D., G., 2018, A novel mechanism of fluconazole: fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in *Candida albicans*. *Microbiology*, 164(2), 194-204.
- Lingling, H., Yue, F., Tsutomu, H., Yan, M., and Tomoyuki, F., 2015, Azoles activate Atf1-mediated transcription through MAP kinase pathway for antifungal effects in fission yeast, *Genes to cells*, 20,695-705.
- Manoharlal, R., Gaur, N. A., Panwar, S. L., Morschhäuser, J., & Prasad, R., 2008, Transcriptional activation and increased mRNA stability contribute to overexpression of CDR1 in azole-resistant *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4), 1481-1492.
- Matthias, S., 2000, Where does fission yeast sit on the tree of life?, *Genome biology*, 1465-6914.
- Mazu, K., T., Bricker, B., A., Flores-Rozas, H., & Ablordeppey, S., Y., 2017, The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview, *Mini reviews in medicinal chemistry*, 16:555-578.

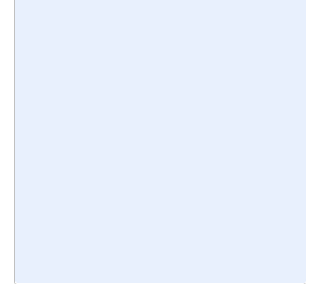
- Mitchison, J., M., 1970, Physiological and cytological methods for *Schizosaccharomyces pombe*, *Methods in cell biology* (Vol. 4, pp. 131-165). Academic Press.
- Morschhäuser, J., Barker, K., S., Liu, T., T., Blaß-Warmuth, J., Homayouni, R., & Rogers, P., D., 2007, The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*, *PLoS pathogens*, 3(11), e164.
- Moye-Rowley, W., S., 2020, Linkage between genes involved in azole resistance and ergosterol biosynthesis. *PLoS pathogens*, 16(9), e1008819.
- Mukherjee, P., K., Sheehan, D., J., Hitchcock, C., A., & Ghannoum, M., A., 2005, Combination Treatment of Invasive Fungal Infections, *Clinical microbiology reviews*, p.163-194.
- Nicole, R., Michaela, S., Tennison, Y., Donald, C., Sheppard, M., T., Gerard, D., W., 2015, An Antifungal Combination Matrix Identifies a Rich Pool of Adjuvant Molecules that Enhance Drug Activity against Diverse Fungal Pathogens, *Cell reports*, 13,1481-1492.
- Noel, T., 2012, The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs, *Journal de Mycologie medicale*, 22,173-178.
- Paul, N., Pierre, T., and Kim, N., 1976, Genetic Control of the Cell Division Cycle in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Molecular and general genetics*, 146, 167-178.
- Perfect, J., R., 2017, The antifungal pipeline: a reality check. *Nature reviews drug discovery*, 16(9), 603-616.
- Pfaffl, M., W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PZR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pfaller, M., A., & Diekema, D., 2012, Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 2846-2856.
- Podust, L., M., Poulos, T., L., Waterman, M., R., 2001, Crystal structure of cytochrome P450 14alpha -sterol demethylase (CYP51) from *Candida glabrata* in complex with azole inhibitors, *Proceeding of the national academy of science*, 98:3068—73
- Qiannan, L., Fan, Y., Guanglie, J., Min, X., Si, C., Lina, Z., Norihiro, S., Takayoshi, K., Yue, F., 2018, Dysfunction of Prohibitin 2 Results in Reduced Susceptibility to Multiple Antifungal Drugs via Activation of the Oxidative Stress-Responsive Transcription Factor Pap1 in Fission Yeast, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, e00860-18.
- Qiannan, L., Xiaoxu, G., Guanglie, J., Guoxiang, W., Hao, M., et.all., 2020, NADPH-Cytochrome P450 Reductase Ccr1 Is a Target of Tamoxifen and Participates in Its Antifungal Activity via Regulating Cell Wall Integrity in Fission Yeast, *Antimicrob. agents and chemotherapy*, e00079-20.

- Raimunda, S., Nogueira, B., Lucas, P., de Alencar, S., Praciano, B., et al., 2019, Exposure of *Candida parapsilosis* complex to agricultural azoles: An overview of the role of environmental determinants for the development of resistance, *Science of total environment*, 650,1231-1238.
- Rajendra, P., Abdul, H., S., and Manpreet, K., R., 2016, *Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance, Yeast Membrane Transport, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Chapter:14, Springer, Germany, ISBN-13:978-3319253022.
- Rani, N., Sharma, A., Kumar Gupta, G., & Singh, R., 2013, Imidazoles as potential antifungal agents: A review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(11), 1626-1655.
- Revie, N., M., Iyer, K., R., Robbins, N., & Cowen, L., E., 2018, Antifungal Drug Resistance: Evoliton, Mechanism and Impact, *Current opinion in microbiology*, 45:70-76.
- Rocha, M., F., G., Alencar, L., P. D., Paiva, M., A., N., Melo, L., M., Bandeira, S., P., Ponte, Y., B., ... & Brilhante, R., S., N., 2016, Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: an environmental resistance school?, *Mycoses*, 59,281-290.
- Ryan, K., Gordon, R., 2019, Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: the Global Threat of *Candida auris*, *American society for microbiology*, e00458-19.
- Sabatinos, S., A., & Forsburg, S., L., 2010, Molecular Genetics of *Schizosaccharomyces pombe*, *Methods in enzymology*, 470, 0076-6879.
- Sá-Correia, I., dos Santos, S. C., Teixeira, M. C., Cabrito, T. R., & Mira, N. P., 2009, Drug: H⁺ antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends in microbiology*, 17(1), 22-31.
- Saier Jr, M., H., Beatty, J., T., Goffeau, A., Harley, K., T., Heijne, W., H., Huang, S., C., & Virk, P., S., 1999, The major facilitator superfamily, *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(2), 257-279.
- Sanjoy, P., and Rowley, S., M., 2014, Multidrug Resistance in Fungi: Regulator of Transporter-encoding Gene Expression, *Frontiers in physiology*, 5:143.
- Schuetzer-Muehlbauer, M., Willinger, B., Krapf, G., Enzinger, S., Presterl, E., & Kuchler, K., 2003, The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Molecular microbiology*, 48(1), 225-235.
- Shapiro, R., S., Zaas A., K., Betancourt-Quiroz, M., Perfect, J., R., Cowen, L., E., 2012, The Hsp90 co-chaperone Sgt1 governs *Candida albicans* morphogenesis and drug resistance, *PLoS one*, 7: e44734.
- Simone, M., T., Camps., J., W., M., van der Linden., Yi, Li., Ed, J. Kuijper., Jaap, T. van Dissel., Paul, E. Verweij. and Willem, J. G. Melchers., 2011, Rapid Induction of Multiple Resistance Mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during Azole Therapy: a Case Study and Review of the Literature, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56, 10-16.

- Lee, S., Nam, M., Lee, A. R., Lee, J., Woo, J., Kang, N. S., et al., 2021, Systematic Target Screening Revealed That Tif302 Could Be an OffTarget of the Antifungal Terbinafine in Fission Yeast, *Biomolecules&Therapeutics*, 29,234-247.
- Sorgo, A., G., Heilmann, C., J., Dekker, H., L., Bekker, M., Brul, S., de Koster, C., G., & Klis, F., M., 2011, Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*, *Eukaryotic cell*, 10(8), 1071-1081.
- Suzuki, K., Kodama, S., & Watanabe, M., 2001, Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells. *Cancer research*, 61(14), 5396-5401.
- Tabara, H., M. Sarkissian, W., G. Kelly, J. Fleenor, A., Grishok et al., 1999, The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*, *Cell*, 99: 123–132.
- Uy, B., McGlashan, S., R., & Shaikh, S., B., 2011, Measurement of reactive oxygen species in the culture media using Acridan Lumigen PS-3 assay, *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 22(3), 95.
- Vígláš, J., & Olejníková, P., 2021, Signalling mechanisms involved in stress response to antifungal drugs. *Research in Microbiology*, 172(1), 103786.
- Wilhelm, B., T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., ... & Bähler, J., 2008, Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution, *Nature*, 453(7199), 1239-1243.
- Wolfger, H., Mamnun, Y., M., and Kuchler, K., 2001, Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification, *Research microbiology*. 152, 375–389
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M., A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., ... & Nurse, P., 2003, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 421(6918), 94-94.
- Yörük, E., 2018, Tetraconazole Leads to Alterations in *Fusarium Graminearum* at Different Molecular Levels, *Applied ecology and enviromental research*, 16(5),6155-6167.
- Zhou, X., Ma, Y., Fang, Y., Gerile, W., Jaiseng, W., Yamada, Y., & Kuno, T., 2013, A genome-wide screening of potential target genes to enhance the antifungal activity of micafungin in *Schizosaccharomyces pombe*, *PloS one*, 8(5), e65904.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Mustafa KAÇMAZ
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Bursa Uludağ Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	08.07.2019
Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik