

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

# **BAZI MANTARLARDA SİDEROFOR VARLIĞININ GÖSTERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AYŞE SEYER**

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Ayşe KALKANCI

ANKARA  
Ağustos 2009

**İTHAF**

**Babama...**

## İÇİNDEKİLER

|                                      |             |
|--------------------------------------|-------------|
| <b>Kabul ve Onay</b>                 | <b>I</b>    |
| <b>İthaf</b>                         | <b>II</b>   |
| <b>İçindekiler</b>                   | <b>III</b>  |
| <b>Şekil, Resim ve Grafikler</b>     | <b>VI</b>   |
| <b>Tablolar</b>                      | <b>VII</b>  |
| <b>Semboller, Kısaltmalar</b>        | <b>VIII</b> |
| <br>                                 |             |
| <b>1. GİRİŞ</b>                      | <b>1</b>    |
| <br>                                 |             |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>             | <b>3</b>    |
| 2.1. Tarihçe                         | 3           |
| 2.2. Tanım ve Taksonomi              | 3           |
| 2.2.1. Küfler (Filamentöz mantarlar) | 4           |
| 2.2.2. Mayalar                       | 4           |
| 2.2.3. Dimorfik mantarlar            | 5           |
| 2.2.4. Dermatofitler                 | 5           |
| 2.3. Hücre Yapısı                    | 5           |
| 2.4. Görünüm ve Boyanma Özellikleri  | 8           |
| 2.5. Fizyoloji                       | 8           |
| 2.6. Üreme                           | 9           |
| 2.6.1. Eşeysiz Üreme                 | 9           |
| 2.6.2. Eşeyli Üreme                  | 11          |
| 2.7. Virülans Faktörleri             | 12          |
| 2.8. Mantarların Virülans Faktörleri | 14          |
| 2.8.1. Toksinler                     | 14          |
| 2.8.2. Enzimler                      | 15          |
| 2.8.3. Fenotip Değişimi              | 17          |
| 2.8.4. Dimorfizm                     | 17          |

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.8.5. Hücre Yüzeyi                                              | 18        |
| 2.8.6. Slaym Faktörü                                             | 19        |
| 2.8.7. Termotolerans                                             | 20        |
| 2.8.8. Kapsül                                                    | 20        |
| 2.8.9. Adezinler ve Aderens (bağlanma)                           | 21        |
| 2.8.10. Sideroforlar                                             | 23        |
| 2.9. Demir ve Sideroforlar                                       | 24        |
| 2.9.1. Çeşitli Demir Kaynakları                                  | 26        |
| 2.9.2. Demirin Depolanması                                       | 27        |
| 2.9.3. Sideroforların Sınıflandırılması                          | 29        |
| 2.9.4. Siderofor Biyosentezinin Biyokimyası ve Genetiği          | 31        |
| 2.9.5. Siderofor Transportu                                      | 32        |
| 2.9.6. Fungal Siderofor Varlığının Ortaya Çıkarılması            | 33        |
| 2.9.7. Patojenik Faktörler Olarak Sideroforlar                   | 34        |
| 2.10. Virulans Faktörlerinin Moleküler<br>Yöntemlerle Saptanması | 36        |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                        | <b>41</b> |
| 3.1. Gereç                                                       | 41        |
| 3.1.1. Cihazlar                                                  | 41        |
| 3.1.2. Kimyasallar ve Besiyerleri                                | 42        |
| 3.1.3. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması                     | 43        |
| 3.2. Yöntem                                                      | 44        |
| 3.2.1. Kültür Koleksiyonundaki Örneklerin Canlandırılması        | 44        |
| 3.2.2. Çeşitli Besiyerleri ile Siderofor Tanımlanması            | 45        |
| 3.2.2.a. CASAD Besiyeri                                          | 45        |
| 3.2.2.b. CAS/ MEA Besiyerleri                                    | 46        |
| 3.2.2.c. O-CAS Besiyeri                                          | 47        |
| 3.2.3. Siderofor Real-Time PCR                                   | 51        |

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.3.a. Örneklerden total RNA Eldesi                                       | 51        |
| 3.2.3.b. Ters Transkripsiyon (RT-PCR) ile c DNA Eldesi                      | 53        |
| 3.2.3.c. Sideroforu Kodlayan cDNA'ların<br>Real-Time Cihazında Çoğaltılması | 54        |
| 3.2.3.d. Real-Time PCR' da Siderofor Gen<br>İfadesinin Kantitatif Analizi   | 55        |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                          | <b>56</b> |
| 4.1. Çeşitli Besiyerleri Aracılığı ile Siderofor Tanımlanması               | 57        |
| 4.1.1. CASAD Besiyeri ile Siderofor Tanımlama                               | 57        |
| 4.1.2. CAS/ MEA Besiyeri ile Siderofor Tanımlama                            | 60        |
| 4.1.3. O- CAS Besiyeri ile Siderofor Tanımlama                              | 62        |
| 4.2. Moleküler Yöntemlerle Siderofor Tanımlanması                           | 69        |
| 4.2.1. Nanodrop ile RNA Miktarı Ölçümü                                      | 69        |
| 4.2.2. Real Time PCR Sonuçları                                              | 70        |
| 4.2.3. Kantitasyon Sonuçları                                                | 73        |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                          | <b>75</b> |
| <b>6. SONUÇ</b>                                                             | <b>87</b> |
| <b>7. ÖZET</b>                                                              | <b>89</b> |
| <b>8. SUMMARY</b>                                                           | <b>90</b> |
| <b>9. KAYNAKLAR</b>                                                         | <b>91</b> |
| <b>10. ÖZGEÇMİŞ</b>                                                         | <b>97</b> |
| <b>11. TEŞEKKÜR</b>                                                         | <b>98</b> |

## ŞEKİL, RESİM ve GRAFİKLER

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1: Fungal hidroksammat tip sideroforların<br>Plattner ve Diekman' a göre genel biyosentez yolu. | 31 |
| Şekil 2.2: PCR basamakları.                                                                             | 37 |
| Şekil 2.3: Polimeraz zincir reaksiyonu                                                                  | 38 |
| Resim 3.1 : O- CAS besiyeri                                                                             | 48 |
| Resim 3.2 : O- CAS besiyerinde negatif sonuç.                                                           | 49 |
| Resim 3.3: O- CAS besiyerinde pozitif sonuç.                                                            | 50 |
| Resim 4.1: <i>Aspergillus niger</i> . CASAD besiyerinde pozitif sonuç.                                  | 58 |
| Resim 4.2: <i>Aspergillus niger</i> . CASAD besiyerinde pozitif sonuç.                                  | 59 |
| Resim 4.3: <i>Pseudomonas</i> 'da CAS Reaksiyonu (Zayıf pozitif).                                       | 61 |
| Resim 4.4: <i>Aspergillus niger</i> (O- CAS).                                                           | 63 |
| Resim 4.5: <i>Aspergillus niger</i> (O- CAS).                                                           | 64 |
| Resim 4.6: <i>Candida albicans</i> (O- CAS).                                                            | 65 |
| Resim 4.7: <i>Candida albicans</i> ATCC 90128 (O- CAS).                                                 | 66 |
| Resim 4.8: <i>C. albicans</i> (O- CAS).                                                                 | 67 |
| Resim 4.9: <i>Aspergillus fumigatus</i> (O- CAS).                                                       | 68 |
| Resim 4.10: <i>Aspergillus flavus</i> (O- CAS).                                                         | 68 |

## **TABLÖLAR**

|                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Tablo 2.1: Mantarlar ve bakteriler arasındaki önemli farklar.                                               | <b>7</b>  |
| Tablo 2.2: <i>Candida</i> türlerinden izole edilen proteinazların bazı özellikleri.                         | <b>16</b> |
| Tablo 3.1: Kullanılan primer dizilimleri.                                                                   | <b>55</b> |
| Tablo 4.1: Çalışmaya dahil edilen örnek listesi.                                                            | <b>56</b> |
| Tablo 4.2 : CAS agar besiyerine ekimi yapılan 6 örneğin CAS reaksiyon sonuçları.                            | <b>57</b> |
| Tablo 4.3: CAS/ MEA besiyerine ekimi yapılan örneklerin CAS reaksiyon sonuçları.                            | <b>60</b> |
| Tablo 4.4: O-CAS besiyerinde CAS reaksiyonu sonuçları.                                                      | <b>62</b> |
| Tablo 4.5: Moleküler incelemeye tabi tutulan örneklerin RNA miktarı.                                        | <b>69</b> |
| Grafik 4.1: İki farklı <i>Candida</i> örneğinin erime zirve noktaları.                                      | <b>70</b> |
| Grafik 4.2: Bazı <i>Candida</i> örneklerinin erime zirve noktaları.                                         | <b>70</b> |
| Grafik 4.3: İki farklı <i>Candida</i> örneğinin erime eğrileri.                                             | <b>71</b> |
| Grafik 4.4: Bazı <i>Candida</i> örneklerinin amplifikasyon eğrileri.                                        | <b>72</b> |
| Grafik 4.5: Real-Time PCR- SYBR Green reaksiyonunda tüm <i>Candida</i> örneklerinin amplifikasyon eğrileri. | <b>72</b> |
| Grafik 4.6: Kantitasyonda yararlanılan standart eğri.                                                       | <b>74</b> |

## KISALTMALAR

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| CAS: Chrome azurol S                                                    | 43 |
| HDTMA: Hexadecyltrimethylammonium- bromid                               | 47 |
| FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O: Demir (III) chloride hexahydrate | 47 |
| PIPES: Piperazine- 1,4-bis (2- ethansulfonic acid)                      | 47 |
| NaOH: Sodium hydroxide                                                  | 47 |
| HCl: Hydrochloric acid                                                  | 47 |
| PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu                                        | 36 |

## 1. GİRİŞ

Son yıllarda invaziv mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı dramatik olarak artmış ve toplum sağlığını tehdit eden bir durum haline gelmiştir. Özellikle *Candida* ve *Aspergillus* türleri ve diğer patojen maya ve küfler, immün yetmezlikli hastalarda hayatı tehdit edici fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır.<sup>1</sup>

*Candida albicans*, fırsatçı fungal bir patojen olup, insanlarda sistemik veya mukozal enfeksiyonlara sebep olmaktadır. İmmün yetmezlikli hastalarda, sistemik invazyon sonrasında, hayatı tehdit edebilecek sistemik enfeksiyonlara sebep olmaktadır. *Candida albicans* 'ın neden olduğu enfeksiyonlar zaman ilerledikçe daha önemli hale gelmektedir. Kandidoz dünya genelinde nozokomiyal enfeksiyon hastalıkları arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Bu sıralama dünya genelinde de hemen hemen aynıdır. Nozokomiyal *Candida* kandida enfeksiyonlarında, antifungal tedavi ölüm oranını azaltıyor gibi görünse de, hala kandidemi bağımlı ölüm oranları yüksek düzeylerde bildirilmektedir.<sup>2,3,4</sup> İmmün yetmezlikli hastalarda bir başka ölüm nedeni invaziv aspergillozdur. Bu enfeksiyonların en sık karşılaşılan etiyolojik ajanı *Aspergillus fumigatus* 'tur. İnvaziv aspergilloz, nozokomiyal enfeksiyon hastalıkları arasında daha az rastlanılan bir enfeksiyon olarak belirtilse de, bu enfeksiyonlar %90 lara varan oranlarda ölümle sonuçlanabilmektedir.<sup>5,6</sup>

Patojen mantarlar konak dokuya saldırmada yardımcı olacak virülans faktörlerine sahiptirler. Mantarların virülans faktörleri, patogeneizde rol oynayan faktörlerdirler.<sup>7,8</sup> Fungal enfeksiyonun ilerlemesine olanak sağlayan faktörlerden biri de, mantarın konağın kısıtlı demir ortamına adapte olabilme yeteneğidir. İnsan vücudunda bol miktarda bulunan demir, esas olarak hücre içerisinde (intraselular) lokalize

olmuş haldedir. Bu konumda olması ise mikroorganizmalar açısından ulaşılmaz bir yerde olduğu anlamına gelmektedir. Patojen mikroorganizmalar başarılı bir şekilde hayatlarını sürdürmek ve çoğalmak için bu esansiyel elementi assimile etmek zorundadır. Bunun için özel mekanizmalara sahip olmaları gerekmektedir. Bu gereksinim doğrultusunda mantarlar siderofor denen, demir şelate edici bileşikler salgırlar. Rekabet ortamında mikroorganizmaların gelişimini belirleyen bu bileşikler, fungal enfeksiyonların ilerlemesine neden olan virölans faktörleri arasında önemli bir yere sahiptir.<sup>6,8,9</sup>

Bakteriyal sideroforlar hakkında birçok çalışma mevcut olmasına rağmen, fungal sideroforlarla ilgili bilgiler çok kısıtlıdır. Dolayısı ile bu tezde, çeşitli patojen mantarları demirin kısıtlı olduğu özel bir besiyerinde üreterek, çeşitli konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle sideroforların varlığını saptamayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Mikoloji mantar bilimi olup, Yunanca *mykes* (mantar) ve *logos* (bilim) kelimelerinden oluşmaktadır.<sup>1</sup>

Mantar enfeksiyonlarına ait bilinen en eski bilgi Hindu kutsal yazıtında (Samhita, M.Ö. 2000-1000) bulunmaktadır. A.C. Celsus'un 8 ciltlik 'De re medicina' adlı eserinde yer alan ve Hipokrat'ın M.Ö. 400-300 yıllarında thrush olarak adlandırdığı ağızdaki *Candida* enfeksiyonlarına ait bilgiler ilk mikoz olguları olarak sunulmuştur. Bununla birlikte ilk yüzyıllarda Mısır'lılar tarafından Tanrı Osiris'in insanlara bir armağanı olarak sunulan şarap ve ekmek, o yıllarda insanların mantarlardan yararlandıklarını göstermiştir. G. Bauhin (1560-1624) 'Pinax Theatri Botanici' adlı eserinde 100 kadar mantarın özelliğini bildirmiştir. Mantarlarla ilgili ilk gerçek anlamdaki çalışmalar ise XVII. yüzyılda, Antonie van Leeuwenhoek'un (1632-1723) mikroskobu keşfi ile başlamış, bu mikroorganizmaların yararları, zararları, oluşturdukları enzimler, toksinleri ve mikoz olarak tanımlanan hastalıkları konusunda zaman içinde kapsamlı bilgilere ulaşılmıştır. 1729 yılında, mikolojinin kurucusu olarak kabul edilen İtalyan botanist P.A. Micheli, 'Nova Plantarum Genera' adlı eserinde mantarlar ile ilgili araştırmalarını yayınlarken, E. Fries 'Systema Mycologicum' adlı eserinde mantar sistematığının esasını sunmuştur.<sup>7,9,10,11,12</sup>

### 2.2. Tanım ve Taksonomi

Mantarlar bitkilerden daha az farklılaşmış fakat prokaryotlardan daha yüksek organizasyon gösteren ökaryot

mikroorganizmalardır. Canlıların beşinci alemini oluşturan mantarların 50.000'den fazla türü bulunmaktadır.<sup>13,14</sup>

Günümüzde tıbbi açıdan önemli olan mantarlar şu şekilde sınıflandırılmaktadır:<sup>15</sup>

Domain: Eukaryota

Kingdom: Fungi

Division: Chytridiomycota

Division: Zygomycota

Division: Ascomycota

Division: Basidiomycota

Mantarların taksonomisi esas olarak morfolojik özelliklerine dayanmaktadır. Tıpta, mantarların gruplandırılması tıbbi pratik açısından ele alınmıştır. Buna göre mantarlar, küfler (filamentöz mantarlar), mayalar, dimorfik mantarlar ve dermatofitler olmak üzere gruplandırılmaktadırlar.<sup>14</sup>

#### 2.2.1. Küfler (Filamentöz mantarlar)

Küflerin temel elemanı hiflerdir. Hifler dallanmış, tubuler yapılar olup, 2-10 µm uzunluğundadırlar. Hifler biraraya gelip miselleri oluştururlar. Vejetatif misel, besinlerin bulunduğu yere doğru gelişirken, hava miselleri beslenme ortamının dışına doğru gelişir. Misellerin besiyerindeki görünümüne ise mantar tallusu (koloni) olarak adlandırılmaktadır.<sup>13</sup>

#### 2.2.2. Mayalar

Guilliermond (1912) mayaları tomurcuklanma (blastformasyonu) ya da ortadan ikiye bölünerek (fision) çoğalan tek hücreli mantarlar olarak tanımlamıştır.<sup>16</sup> Klinik önemi olan mayaların çoğu

yuvarlak veya yuvarlağımsıdır. Çapları 2-20 µm, boyları 2-50µm arasında değişmektedir. Tomurcuklanma sırasında, olgunlaşan ana hücreden kopan blastokonidiyum denen yavru hücreler, bazı mayalarda (*Candida* türleri) ana hücreden ayrılmadan peşisıra uzar gider. Oluşan bu yapıya yalancı hif (psödohif) adı verilmektedir.<sup>13</sup>

### 2.2.3. Dimorfik Mantarlar

Bazı mantarlar, çevre koşullarına bağlı olarak maya veya küf şeklinde bulunabilirler. Bu olaya dimorfizm denilir.<sup>14</sup> Doğal ortamlarında ve oda sıcaklığındaki besiyerlerinde küf, *in vivo* ve 35-37°C' de maya şeklinde üreyen mantarlara ise dimorfik mantarlar adı verilmektedir. Küf şeklinden maya şekline dönüşümü, ısının 35-37°C'ye yükselmesi, ortamda basit şekerlerin fazla miktarda bulunması, sistein gibi sülfidril gruplarının bulunması ve bir organik nitrat kaynağının bulunması gibi faktörler etkilemektedir.<sup>13</sup>

### 2.2.4. Dermatofitler

Dermatofitler keratinaz üretebilen filamentöz mantarlardır. Dolayısı ile keratince zengin dokuları (deri, saç, tırnak) enfekte ederler. Mantar besiyerlerinde 25-30°C'de 5-14 gün inkübasyonun ardından, kültürde farklı renklerde yün yumağı şeklinde ürerler.<sup>13,14</sup>

## **2.3. Hücre Yapısı**

Mantar hücre duvarının %80-90'nını karbohidratlar oluşturmaktadır. Polisakkarit olarak mannan, glukon ve kitin içermektedir. Mannoproteinler, mannan ve bunun polimeri olan mannozün, proteinlerle kovalent bağları olan glikoproteinlerdir. β- glukonlar, β -1,3 ve β -1,6 bağları içeren glukozün dallanmış homopolimerleridir. Ayrıca mevcut olan

kitin,  $\beta$  -1,3- 1,4 bağları içeren *N*- asetil-D- glukozaminin dallanmış homopolimeridir. Protein ve lipidler hücre duvar yapısında çok az bulunmaktadırlar. Glukan ve kitin sert bir ağ oluşturarak, duvarın yapısal bileşenini oluşturmaktadır. Proteinler ve gluko(manno)proteinler bu iskelete bağlanırlar. Hücre duvarındaki immünodominant yapı mannanıdır. Duvar kuru ağırlığının %30'unu ve polisakkarit içeriğinin %40'ını mannan oluşturmaktadır. Glukan ise kuru ağırlığın % 47-60'ını oluşturmaktadır. Proteinler % 6-25, lipitler % 1-7 ve kitin % 0.5-9 oranında bulunmaktadır.<sup>17,18</sup>

Mantarlarda çok katlı (kitin,mannan,glukan) bir hücre duvarı bulunması, mantarları gerçek bir hücre duvarı olmayan hayvan hücresinden ayırmaktadır. Ayrıca mantar hücre duvarında bulunan kitin, mantarın bakteri ve yüksek bitkilerden ayrılmasını sağlamaktadır.<sup>13,19</sup>

Hayvan hücreleri gibi ökaryot olan mantarların sitoplazma zarı yapısal olarak insan sitoplazma zarına benzerlik göstermektedir. Dolayısı ile mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ilaçlar, bu yapısal benzerlikten dolayı, insan hücresi üzerine de toksik etki yapmaktadır. Sitoplazma zarı sterol içermekte ve sitoplazma içerisinde mitokondri, endoplazmik retikulum ve golgi gibi organeller yer almaktadır. Bunların yanı sıra zarla çevrili gerçek bir çekirdeğe sahiptirler.<sup>13</sup>

**Tablo 2.1: Mantarlar ve bakteriler arasındaki önemli farklar.** <sup>14</sup>

| <b>Özellikler</b> | <b>Mantarlar</b>                                        | <b>Bakteriler</b>                                   |
|-------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Nukleus           | Ökaryot.Nukleus zarla çevrili<br>Birden fazla kromozom. | Prokaryot.Nukleus zarı yok.<br>Sadece bir kromozom. |
| Sitoplazma        | Mitokondriler var.ER var.<br>80S ribozomlar.            | Mitokondri yok.ER yok.<br>70S ribozomlar.           |
| Sitoplazma zarı   | Sterol(ergosterol) içerir.                              | Sterol içermez.                                     |
| Hücre duvarı      | Glukan, mannan, kitin, kitosan                          | Murein,teikoik asit, proteinler                     |
| Metabolizma       | Heterotrof.Aerob.<br>Fotosentez yok                     | Heterotrof; Zorunlu ve fakültatif aerob ve anaerob  |
| Boyut             | Maya:5-10µm,<br>Küf: Tanımlanamaz                       | 1-5 µm                                              |
| Dimorfizm         | Sıklıkla görülür                                        | Görülmez                                            |

## 2.4. Görünüm ve Boyanma Özellikleri

Küflerin temel yapı birimi olan hifler üç boyutlu olarak incelendiğinde, hücre duvarları birbirine paralel tübüler yapılar olarak gözlemlenirler. Bazı küflerde hifler enine bölmelere bölünmüştür. Hücrelerdeki bu enine bölmelere septum adı verilir. Septumlu hifler bölmeli hifler, septumsuz olanlar ise bölmesiz hifler olarak tanımlanırlar.<sup>7,13</sup>

Tomurcuklanarak ya da ortadan ikiye bölünerek çoğalan mayalar ise, tomurcuklanan yavru hücrenin ana hücreden kopmaması sonucu yalancı hif (psödohif) denen filamentöz yapılar oluşturabilirler. Gerçek maya hiflerinde hücre duvarları birbirine paralel iken, yalancı hiflerde tomurcuklanma bölgesine yakın bir yerde içe bükey bir yapı görülür.<sup>7,13</sup>

Gram pozitif olan mantarlar, aside dirençli boyanmamakta, histopatolojik amaçlı olarak Giemsa, hematoksilen eozin, peryodik asit şif (PAS), Gomori'nin metanamin gümüş (GMS) boyası, Wright ve Gram boyamasından yararlanılmaktadır.<sup>7,13</sup>

## 2.5. Fizyoloji

Tüm mantarlar heterotroftur; yani besin maddesi olarak ekzojen organik karbon kaynaklarına ihtiyaç duyarlar. Pek azı dışında, mantarlar zorunlu aoptur. Fotosentez yetenekleri bulunmayan ve zorunlu kemoorganootrofik olan mantarlar değişik karbon kaynaklarını kullandıkları için, doğada çok çeşitli yaşam alanlarında yaygın biçimde bulunurlar. Doğal yaşam alanları başta bitkiler olmak üzere, hayvanlar, toprak, su, atmosferdir. Ayrıca düşük su potansiyeli, düşük sıcaklık dereceleri ve düşük oksijen gibi özel veya olağandışı koşullarda yaşamlarını sürdürebilirler. Pek çok tür çok basit besiyerlerinde bile üreyebilmektedir.

Besin zincirlerinde, karbon, azot ve kükürt döngülerinde önemli rol oynarlar. Mayaların fizyolojik aktivitelerinin çoğu insan yaşamı için yararlı olmakla birlikte (besin ve ilaç endüstrisi), bazı türlerin (örneğin; *Candida albicans*) fırsatçı insan patojeni olduğu, bir kısmının da besinlerin bozulmasına yol açtığı bilinmektedir.<sup>14,20</sup>

## 2.6. Üreme

Mantarlar sporları aracılığı ile ürer ve canlılıklarını sürdürürler. Kolayca havada dağılırlar ve ortam koşullarına oldukça dirençlidirler. Uygun ortam buldukları zamansa çoğalmaya başlarlar. Mantar sporları iki tip üreme sonucu oluşmaktadır:

1. Eşeyli (anamorfik) üreme
2. Eşeyli (telemorfik) üreme

### 2.6.1. Eşeyli Üreme

Tek bir ana hücrenin mitoz ile bölünmesi ile oluşur. Hücre çekirdekleri arasında birleşme söz konusu değildir. Bu üreme biçiminde, mantar hücresinde hacim ve kütlece artış söz konusudur. Hif sayısı artar, koloni büyür ve eşeyli çoğalma özelliği gösteren yapılar oluşur. Tıbbi önemi olan mantarların oluşturduğu eşeyli sporlar; artrokonidya, blastokonidya, klamidokonidya, konidyospor ve sporangiyosporlardır.<sup>7,13</sup>

#### 2.6.1.a. Artrokonidya

Özellikle bölmeli hif yapan küf mantarları tarafından, sıklıkla hifin parçalanması sonucu oluşturulur. Dikdörtgen ya da fıçı görünümünde olup, uygun koşullarda yeni hif ve mantar kolonilerinin oluşumunu sağlar.

<sup>7,13</sup>

#### 2.6.1.b. Blastokonidya

Maya hücrelerinin tomurcuklanması ile oluşmaktadır. Tomurcuklar uç uca geldiğinde tesbih görüntüsü ortaya çıkmaktadır. Bu yapıya yalancı hif (psödohif) denilmektedir. Bazı küfler de blastokonidya oluşturabilmektedirler.<sup>7,13</sup>

#### 2.6.1.c. Klamidokonidya

Bir hifin ucunda (terminal), arada (interkalar) veya yan kısımlarında (sesil) bulunan tek hücreli, kalın duvarlı, oval, geniş yapılara klamidokonidyum adı verilir. Çoğalma fonksiyonundan ziyade mantarın dayanıklı elementleridir. Sitoplazmanın yoğunlaşması ile oluşmaktadır. Isı ve kuruluğa dirençlidirler. Uygun koşullar oluştuğunda açılıp yeni mantar hücresi oluşturabilirler.<sup>7,13</sup>

#### 2.6.1.d. Konidyospor

Hiflerin uçlarında oluşmuş serbest sporlar olup, oluşturdukları hiflere farklı şekillerde bağlanırlar. Ascomycota ve Deuteromycota bölümündeki mantarlar tarafından oluşturulmaktadır. Konidyosporları taşıyan hifler konidyofor adını alırlar. Bazen *Aspergillus* ve *Penicillium*'da olduğu gibi fialid ucunda boncuk tarzında, bazen *Microsporum canis*'de olduğu gibi birkaç bölmeli büyük sporlar görünümünde (makrokonidyum), bazen de hiflere yapışık, tek hücreli (mikrokonidyum) yapıdadırlar.<sup>7,13</sup>

#### 2.6.1.e. Sporangiyospor

Sporangiyosporlar, sporangiyofor olarak tanımlanan bölmesiz hiflerin ucunda yer alan, sporangiyum denen ince duvarlı keselerin içinde oluşmuşlardır. Olgunlaştığı zaman kese patlar ve açığa çıkarlar. Tıbbi önemi olan *Zygomycetes* sınıfı mantarlarda ( *Rhizopus*, *Absidia*) oluşan sporlardırlar.<sup>7,13</sup>

### 2.6.2. Eşeyli Üreme

Mantarlarda eşeyli üreme prensip olarak yüksek ökaryotlardakiyle aynıdır. İki haploid mantar hücresinin biraraya gelmesi (plazmogami), haploid nukleusların füzyonu (karyogami) ve sonra çekirdeğin bölünmesi (mayoz) ile oluşan haploid hücre oluşumu evrelerinin tümü eşeyli üremeyi oluşturur. İnsan dokularında parazit olarak yaşayan mantarlarda eşeyli sporlar çok ender olarak gelişir. Tıbbi önemi olan mantarlarda, zigospor, askospor, bazidiyospor ve oospor oluşumu ile sonuçlanan eşeyli üreme görülmektedir.<sup>7,13,14</sup>

#### 2.6.2.a. Zigospor

Uygun iki hifin ucundaki özgün hücreler yanyana geldiğinde aralarındaki bölmelerin kaybolması ve hücrelerin füzyonu sonucu oluşan büyük ve kalın çeperli yeni hücrelerdir. Zygomycetes sınıfı mantarlarda görülmektedir.<sup>7,13,14</sup>

#### 2.6.2.b. Askospor

Askosporlar askus adı verilen keseler içinde bulunur. Her askus 2 ile 8 arasında, ortalama 4 spor içerir. Aynı ya da ayrı hiflerde bulunan anteridyum ve askogonyum adlı iki hücrenin yanyana gelerek birleşip bütünleşmesinden meydana gelmektedirler. Ascomycota bölümündeki mantarlarda görülmektedir.<sup>7,13,14</sup>

#### 2.6.2.c. Bazidiyospor

Eşleşme sonucunda hiflerin ucunda bulunan ve bazidyum denilen lobut biçimindeki oluşumların üstünde ve dışında meydana gelen sporlardır. Uygun iki hücrenin birleşmesi sonucu mayoz ve diğer bölünmeler sonucu dört spor oluşur ve bu sporlar bazidiyum üzerinden

ıkan dört sapın herbiri üzerine yerleşir. Basidiomycota bölümündeki mantarların sporları örnek gösterilebilir.<sup>7,13,14</sup>

#### 2.6.2.d. Oospor

Eşeyli reme sonucunda bazı mantarlarda bir başka eşeyli spor çeşidi olan oospor oluştuğu gözlenmiştir. Anteridyum ve oogonyumun birleşmesi ile meydana gelir.<sup>7,13,14</sup>

### 2.7. Virlans Faktörleri

Patojen mikroorganizmaların hastalık yapma dereceleri virlansları olarak isimlendirilir. Virlans faktörleri, konakta patojenlerin nasıl hasara neden olduklarını açıklar. Bu faktörler bazı patojenler için gerekli, bazıları için de yardımcıdır.<sup>8</sup>

Mikozların patogenezi ile ilgili bilgiler çok kısıtlıdır. Doğal dirençlerinden dolayı bağışıklık sistemi güçlü kişilerde çok seyrek olarak mantar enfeksiyonlarına rastlanırken, immun sistem yetmezliği olan hastalarda fırsatçı mantarlarla bile sistemik enfeksiyon gelişebilmektedir.<sup>7</sup> rneğin avirlan olan *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium* gibi fırsatçı mantarlar immun yetmezlikli kişilerde ölümlle sonuçlanabilecek enfeksiyonlara sebep olabiliyorken, dermatofitler sağlıklı bireylerde dahi hastalık oluşturabilmektedir.<sup>21</sup> Mikroorganizmaların hastalık oluşturma özellikleri, esasen aralarında kesin bir sınır olmayan iki terimle açıklanmaktadır; hastalık yapıcı karakterdeki "patojen" mikroorganizmalar ve hastalık oluşturma özelliği bulunmayan "apatojen" olanlar. Hastalık yapıcı karakterdeki bir mantarın vcoda girmesi enfeksiyonun oluşmasındaki ilk aşama olsa da, enfeksiyonun meydana gelmesi için yeterli değildir. Konakta üreyebilme ve çoğalma özelliği etkenin enfeksiyon

oluşturabilmesi için bir ön koşuldur. Eğer etken vücuda yerleşmiyor, üremiyor veya yayılma eğilimi göstermiyor ise enfeksiyon oluşmaz. Bu sebeple vücutta patojen bir mantarın bulunması enfeksiyonun başlaması için ön koşul olmasına rağmen enfeksiyonun gelişmesinde yeterli değildir.<sup>2</sup>

Enfeksiyonun gelişebilmesi için öncelikle mantarın konak hücrelere tutunması, hücrenin savunma mekanizmalarından kaçması, uygun koşullar altında kolonize olması gerekmektedir.<sup>3</sup>

Hücrenin savunma mekanizmalarından kaçışta en önemli mekanizma, fagositoz olayını engellemeye yönelik olanıdır. *Cryptococcus* gibi büyük hacimli mantarlar, kapsülleri aracılığı ile fagositozdan korunurken, bazı mantarlar da belirli hücre duvarı componentleri ve melaninleri yardımı ile kendilerini korumaktadırlar.<sup>7</sup> *Candida* 'larda konak hücre ile etkileşim, reseptör -ligand etkileşimleri ile sağlanmaktadır. Reseptör-ligand etkileşimi farklı tip kandidoz patogenezinde anahtar faktördür. Organizmaya hangi reseptörün bağlandığı, enfeksiyona karşı geliştirilen konak cevabını kararlaştırmak açısından önemlidir. Ayrıca *Candida* türleri konak hücreye bağlanmada aracılık yapan birçok adezin içermektedir. Toll- like reseptörleri (TLRs) patojenle ilişkili moleküler desenleri tanımada ve enfeksiyona karşı doğal ve kazanılmış bağışıklıkta esas rölü oynamaktadır. İki farklı TLRs; TLR2 ve TLR4, *C. albicans*'ı tanımakta ve HDC (hematogenously disseminated candidiasis) ye karşı konak savunmasını modüle etmektedir. Phan, *C. albicans* hiflerinin, in vitro vasküler endotelial hücrelerin yüzeyindeki N-cadherin'e bağlandığını keşfetmiş ve N-cadherin'e bağlanma olayının, organizmayı endosite etmesi için konak hücrelerini uyarmakta olduğunu belirtmiştir. Endotel hücrelerin N-cadherin'lerin siRNA(small interfering) ile ekspresyonunun down-regülasyonu *C. albicans* endositozunu azaltmaktadır. N- cadherin

'den başka diğer endotelyal hücre proteinleri de, bu organizmaların endositozuna aracılık etmektedir.<sup>3</sup>

Yukarıda bahsedilen konağın savunma sistemlerinden kaçışta, mantarların virülans faktörleri önemli rol oynamaktadır.<sup>3</sup>

## **2.8. Mantarların Virülans Faktörleri**

### **2.8.1. Toksinler**

İlk defa Henrice tarafından *Candida albicans* 'da endotoksin benzeri toksin bulunduğu gösterilmiştir. Toksin üretimi iki grupta incelenmektedir;

#### **2.7.1.a. Yüksek moleküler ağırlıklı toksinler (Glikoproteinler ve kandid toksin)**

Sağlam hücrelerde, hücre duvarında bulunurlar. Tavşana pirojen olup, aktinomin D verilmiş farelere letal etki yaparlar. Toksik aktivite için, hem protein hem karbohidrat kısımları gereklidir. Iwata, virülan suşlardan 3 toksik glikoprotein izole etmiş ve bunların şeker kısmının D- mannoz olduğunu göstermiştir. Kandid toksin; sitotoksik, farmakolojik, immunolojik, enzimatik ve enfeksiyonu artırıcı etkiler gibi çok yönlü aktivite göstermektedir.<sup>8</sup>

#### **2.7.1.a. Düşük moleküler ağırlıklı toksinler**

Birbirine çok benzeyen bu toksinler, şok oluşturan veya öldürücü aktivite gösterenler olarak ayrılır.<sup>8</sup>

Sistemik hastalarda görülen klinik belirtilerin çoğu zaman Gram (-) bakteri sepsislerinden ayırt edilememesi, *Candida* toksinlerinin

patogenezdeki rolüne kanıt olabilir. Ancak bakteri toksinleri ile potens açısından yarışamazlar. Bunun başlıca sebebi de mayanın konakçı ile kommensal ilişki kurmasıdır.<sup>8</sup>

### 2.8.2. Enzimler

Konakçı dokuya yayılmak için mikroorganizmalar hidrolitik enzimler üretirler. Lipid ve proteinden oluşan konakçı hücre membranı bu enzimlerin hedefidir. *Candida albicans* için 14 enzim tanımlanmıştır. Fakat bunlardan sadece iki tanesinin patojenitede rol oynadığı gösterilebilmiştir.<sup>8</sup>

#### 2.8.2.a. Proteinaz enzimi

Besiyerinde nitrojen kaynağı olarak protein varsa, bazı *Candida* türleri tarafından salgılanır. İlk olarak hücre dışı proteinaz, 1965 yılında Staib tarafından saptanmış ve 3 yıl sonra Remold ve Fasold, enzimi saflaştırarak tiplendirmiştir. Asidik karboksil proteinaz, patojen *Candida* türleri tarafından salgılanmakta, non-patojen türlerde ise bulunmamaktadır. Tablo 2 'de *Candida* türlerinden saflaştırılan proteinazların bazı özellikleri gösterilmiştir.<sup>8</sup>

Klinik ve deneysel bulgular salgısal proteinazın, *Candida* vajinitinin patogenezinde rol oynayan önemli bir virülans faktörü olduğunu desteklemektedir. Ayrıca kandidal proteinaz, mukozal koruyucu sistem elemanlarından salgısal IgA'yı parçalayabilmektedir. IgA'nın parçalanması ise fungal bağlanma lehine bir olaydır.<sup>8</sup>

#### 2.8.2.b. Fosfolipaz enzimi

Membran lipidlerinden fosfogliseridleri hidrolize eden bu enzim, lesitin ve yumurta sarısı içeren besiyerlerinde üretilen *C. albicans*

suşundan izole edilmiştir. Patojen *Candida* larda genellikle %30-55 oranında fosfolipaz üretimi saptanmaktadır.<sup>8</sup>

**Tablo 2.2: *Candida* türlerinden izole edilen proteinazların bazı özellikleri.<sup>8</sup>**

| Tür                                        | Enzim grubu         | Optimum pH | Aktivite tipi | İnaktivite ısı |
|--------------------------------------------|---------------------|------------|---------------|----------------|
| <i>C. albicans</i><br><i>C. tropicalis</i> | Karboksil proteinaz | 2.5- 3.9   | Proteolitik   | 45°C           |
| <i>C. albicans</i>                         | Karboksil proteinaz | 4.0        | Keratinolitik | > 70°C         |
| <i>C. albicans</i>                         | Nötral proteinaz    | 6-7.5      | Proteolitik   | -              |
| <i>C. parapsilosis</i>                     | Aspartik proteinaz  | 4.3        | Proteolitik   | -              |

### 2.8.3. Fenotip Değişimi

Slutsky ve arkadaşları 1985 yılında *C. albicans* 'ın amino asit yönünden zengin besiyerinde ürerken, spontan olarak koloni morfolojisini değiştirdiğini gösterdiler. Aynı araştırmacılar 1987 yılında beyaz-opak koloni morfolojisi değişimini açıkladılar. Fenotip farklılığı, mayaların epitel hücrelerine tutunmasında, nötrofillerin kandidasidal aktivitelerine duyarlılıklarında, hidrofobisitelerinde, proteinaz salgılamalarında değişikliğe neden olmaktadır. Örneğin beyaz koloni morfolojisine sahip olanlar %90 aderens (bağlanma) gösterirken, opak koloni morfolojisine sahip olanlar %50 bağlanma göstermektedir. Çevre faktörlerine bağlı olarak beyaz-opak değişimi, opak-beyaz değişiminden daha sık meydana gelmektedir. Fenotip değişiminin patogenezdaki önemi, *in vitro* şartlarda da araştırılmış ve vajinitli hastalardan izole edilen *C. albicans* suşlarında %80 oranında görülmüştür.<sup>8</sup>

### 2.8.4. Dimorfizm

*C. albicans*, kültürde tomurcuklanan oval maya hücreleri (blastokonidyumlar), uzun mayamsı hücrelerden oluşan yalancı hifler ve gerçek bölmeli hifler halinde gelişebilen dimorfik bir mayadır. *Candida* türleri arasında hif oluşturarak çoğalabildiği bilinen tek tür *C. albicans*' dır. Sıcaklık, pH ve besiyeri gibi ortam koşulları gelişecek fenotipi belirlemektedir.<sup>8</sup>

*C. albicans* enfekte dokuda hem maya hem hif şeklinde bulunabilmesine rağmen, aktif- semptomatik enfeksiyonu ile hif formu ilişkilidir. Hif formunun maya formuna göre dokuya 50 defa daha fazla yapışması, fagositler tarafından sindirilememesi, klinik örneklerden sıklıkla izole edilmesi, plastik yüzeylere yapışmayı sağlayan fibriler yüzey tabakaları oluşturması, patogenez ve virülansdaki rolünü kanıtlayan bulgulardır. Ancak, hif (germ tüp) yapma özelliği önemli bir faktör olsa da,

enfeksiyon yapmak için çok gerekli değildir. Yapılan deneylerde çimlenme borusunun, ağız epiteline daha iyi bağlanmayı sağladığı, buna karşın boru oluşumunun baskılanmasının, bağlanmayı azalttığı gösterilmiştir.<sup>8</sup>

Hem blastokonidyumlar hem de çimlenme borusu, mantarın bulunduğu yüzeyi kaplayıp daha ilerilere saldırmasını (invazyonunu) gerçekleştirebilir ve bunun başarılması için çimlenme borusu koşul da değildir. Fare deneylerinde çimlenmenin adezyon olayının başlamasını uyardığı, fakat eksikliğin invazyonu önlemediği gösterilmiştir.<sup>8</sup>

#### 2.8.5. Hücre Yüzeyi

Konak-parazit arasındaki etkileşim başlıca hem konak hem de mikrop hücrelerinin yüzeyleriyle ilgilidir. Mikrop yüzeylerinin patojenliğe katılımına göre beş farklı noktada incelenmesi gerektiği öne sürülmüştür; (i) konağa giriş, (ii) *in vivo* çoğalma, (iii) konak savunmasına engel olma, (iv) konak ve doku özgüllüğü, (v) konağın tahribi.<sup>8</sup>

Genelde mantarların, özelde *C. albicans*'ın yüzey bileşikleri büyük ölçüde belirsizdir ancak virülansla ilgisi açısından araştırılmaya başlandığı; hücre yüzey tabakalarının kimyaca yapısı, bileşikleri ve yapışmada rol oynayan özel bileşiklerinin patojenlikle ilgisinin incelendiği görülmektedir. Cutler ve arkadaşları, *C. albicans* 'ın hücre duvarının içerdiği toksik yapılar nedeni ile pirojen ve öldürücü etkisi olduğunu göstermişlerdir. Sandin ve arkadaşları ise, hücre yüzeyinde mannan içeren bölgelerin yanak epitel hücrelerine *in vitro* bağlandığını açıklamışlardır.<sup>8</sup> *C. albicans* suşları yüzey özelliklerine göre 2 gruba ayrılmaktadırlar;

2.8.5.i. Besiyerindeki yüksek şeker konsantrasyonuna bağlı olarak hücre yüzey kompozisyonlarını değiştirebilen suşlar

Bu değişimler mayanın çeşitli hücre ve yüzeylere bağlanmasını ve virülansını artırmaktadır.

2.8.5.ii. Yüzeyini değiştirme özelliğini tamamen kaybetmiş olan suşlar

Bunlar çok düşük patojenik potansiyele sahiptirler.<sup>8</sup>

Hücre yüzeyi komponentlerinden en önemlisi hücre duvar mannanıdır. *Candida* antijenleri ve kuvvetli virülans faktörleri arasında, mannanın özel bir yeri vardır. Mannan;

- (i) Antijenik değişimi ile tür ve alt suşların ayrımını sağlar.
- (ii) Hücresel ve humoral cevabı stimule eder veya baskılayarak enfeksiyonun devamına neden olur.
- (iii) Enfeksiyonların erken ve çabuk serolojik tanısı için en uygun antijendir.
- (iv) *Candida* 'ların immun sistem fonksiyonları üzerine etkilerini araştırmak için sıklıkla seçilen bir komponenttir.<sup>8</sup>

#### 2.8.6. Slaym Faktörü

Bazı mikroorganizmaların doğada ve insan vücudunda, katı yüzeylere yapışarak, kalınlığı birkaç mm'ye varan hücre tabakalarından oluşan biyofilm oluştururlar. Bu yapışmanın özgün olabildiği veya olmadığı bilinmektedir. Bu biyofilm, damar içi kateter veya protez uygulamalarında başlıca komplikasyon olan enfeksiyonlara da yol açabilmektedir. Bu yabancı cisim, organizmada fibronektin, fibrinojen, vitronektin veya laminin ile kaplanır ve mikroorganizmalar konağın bu matriks proteinlerine yapışabilirler. Burada hücre dışı matriks salgılayabildiklerinde yüzeye yapışan, çoğunlukla polisakkarit yapısında bir biyofilm oluşur.<sup>8</sup>

Kateterler, ekstraselüler matriks içinde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ile kolonize olmakta ve mikroorganizmanın bu biyofilmden ayrılması çoğu kez septisemi ile sonuçlanmaktadır. Hastane kaynaklı kan dolaşımı ile ilgili enfeksiyonların başında Gram negatif bakterilerden sonra mantarlar gelmektedirler. Ancak slaym faktörünün, proteolitik enzimler, fosfolipaz, dimorfizm gibi diğer virülans faktörlerinden daha az öneme sahip olabileceği de öne sürülmektedir. Bu yorum, slaym faktörün virülans etkisinin diğer etmenlerde olduğu gibi, tüm vücut bölgeleri için genel anlamda geçerli olmayıp, yalnızca kateter gibi yabancı bir cisme bağlı enfeksiyonlarla sınırlı bir çerçevede kalmasından kaynaklanabilir.<sup>8</sup>

#### 2.8.7. Termotolerans

İnsanları enfekte eden mantarlar için sıcaklık önemli bir unsurdur. *Aspergillus fumigatus* toprakta yaşayan, organik maddeleri parçalayan bir mantardır. Bu organizma hava yolu ile bulaşan önemli bir patojendir. İnsanda çeşitli sağlık problemlerine sebep olmaktadır ve bunlardan en ciddi olanı 'invaziv pulmonar aspergilloz' dur. Enfeksiyon havadaki konidyumların solunum yolu ile alınması ile ortaya çıkar. İnsanlarda hastalığa sebep olabilmesi için ,alınan *A.fumigatus* konidyumlarının immun sistemin savunma mekanizmalarından kurtulup akciğerde çimlenmesi gerekmektedir. Bu aşamada *A. fumigatus* ' un avantajı termotoleransı ve vücut sıcaklığında gelişebilme yeteneğinin olmasıdır.<sup>2</sup>

#### 2.8.8. Kapsül

Polisakkarit kapsül çok fonksiyonlu virülans faktörüdür. *Cryptococcus neoformans*' ta polisakkarit kapsül bulunmaktadır. Taramalı elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, kapsülün maya yüzeyi

üzerinde bol fibriller ağ yaptığını göstermiştir. Bu yapı baskın olarak glukronoksilomannandan (GXM) ibarettir. Kapsül sentezi için birçok gen ürünü gereklidir. UV ile ya da kimyasal mutagenез ile elde edilen akapsüler mutantları kullanarak, Kwon-Chung ve arkadaşları kapsül sentezi için gerekli olan 4 gen tanımlamışlardır. Bunlar CAP10, CAP59, CAP60 ve CAP64' dür. Kapsüler polisakkaritin önemli bir özelliği, hücre duvarından salınması ve hem deney hayvanlarının hem de kriptokokozlu hastaların periferik kanında bulunmasıdır. Polisakkarit kapsül hem konağın doğal bağışıklığında hem de kazanılmış bağışıklıkta immunomodulator etkileri olan güçlü bir virölans faktörüdür.<sup>2</sup>

#### 2.8.9. Adezinler ve Aderens (bağlanma)

Mantarlar, başlangıçta konağın deri ve mukozalarına yapışarak enfeksiyon sürecini başlatırlar. Bu olaya **adezyon** denilir. Konak hücreye ve dokulara adezyon, fungal yüzey molekülleri aracılığı ile gerçekleşir.<sup>2</sup>

Hücre yüzeyinin en kritik görevlerinden biri diğer hücrelere ve yüzeylere adere olma yeteneğidir. Adezyon, nemli bir ortamda bulunan hücreleri yıkanıp gitmekten korur ve biyofilm oluşturarak tehlikeli koşullardan korunmalarına yardımcı olur.<sup>22</sup>

Adezyon, mantarlar için çok önemli bir virölans faktörüdür. Azaltılmış adherans özelliği olan suşlarda, atenüe (azaltılmış) virölans gözlenmektedir.<sup>2</sup>

*Candida*'ların mukozal epitel hücrelerine veya endotel hücrelerine bağlanması, kandidozun ortaya çıkmasında önemli bir adımdır. Bu bağlanma fungus yüzeyindeki adezinler tarafından kontrol edilmektedir.<sup>8</sup> *Candida* adezinleri olarak;

(i)Epitelyal hücre glikoproteinlerinin fukoz kısımlarını tanıyan lektine benzer hücre yüzey proteinleri,

(ii)Kompleman reseptör benzeri proteinler ( $C_{3d}$  $C_{3b}$  reseptörlerine benzer moleküller olup özellikle endotel hücreleri için adezin görevi görmektedirler.)

(iii)Mannan, tanımlanmaktadır.<sup>8</sup>

*C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. stellatoidea* 'da çeşitli hücre ve yüzeylere bağlanma yüksek oranda olmaktadır. *C. parapsilosis* 'de ise bu oran düşüktür. *C. guilliermondii*, *C. krusei* ve *C. kefyr* 'de bağlanma gösterilememiştir.<sup>8</sup>

*C. albicans* ' da Hwp1, Ala1/Als5 ve Als1, *C. glabrata* ' da ise Epa1 yapısal açıdan benzer olan adezinlerdir. Bunlar, GPI- bağımlı hücre duvar proteinleridir. Konak hücre duvarındaki glukanlara bağlanırlar. Bu adezinlerin mukozal kandidozdaki önemi Hwp1 ile yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.<sup>2</sup>

*Candida* 'lar en fazla yanak epitel hücrelerine, daha az olarak vajinal epitel hücrelerine ve en az oranda da üriner sistem hücrelerine bağlanmaktadır. Ayrıca deri, endotel, intestinal sistem hücreleri ve HeLa hücresine de bağlanma olmaktadır. 36-70 µm büyüklükteki hücreler, *Candida* için hedef durumundadırlar.<sup>8</sup>

Adezin üretimi yüksek oranda mayanın ürediği ortama bağlıdır. Optimal bağlanma aktivitesi, karbohidrat bulunan uygun besiyerinde 25°C 'de görülmektedir. 6.2-7 pH arasında, oral epitel hücrelerine bağlanma en yüksek düzeyde olmaktadır. HeLa hücresinde

ise, pH 3'de üst seviyeye ulaşırken, nötral pH'da düşmektedir. Ortamda  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  gibi iyonların bulunması bağlanmayı artırmaktadır. Seramid monohekzozidler ve seramid dihekzozidler maya formunda, glikozidler hif formunda bağlanmada etkili olmaktadırlar. Estradiol, progesteron, testosteron gibi hormonlar, HeLa ve vajinal epitel hücrelerine bağlanmayı etkilemektedirler. Özellikle progesteron uterusda prostaglandin üretimini artırarak, hücrel cevabı baskılamakta,  $\text{INF-}\alpha$ 'yı, fagositozu ve sitotoksik lenfosit etkisini azaltmakta, germ tüp yapımını artırarak ve böylece fungal enfeksiyonu başlatmaktadır.<sup>8</sup>

Bağırsak mikroflorası *Candida*-mukoza ilişkisin inhibe ederek, *C. albicans* 'ın kolonizasyonunu ve yayılmasını önleyebilmektedir. *In vitro* olarak, HeLa hücresi önceden *Streptococcus salivarius* ve *Streptococcus mitior* ile muamele edilirse, kandidal bağlanmanın önlendiği görülmektedir. Barsak mikroflorasının geniş spektrumlu antibakteriyel ajanlar tarafından bozulması, *Candida* enfeksiyonuna neden olmaktadır.<sup>8</sup>

#### 2.8.10. Sideroforlar

Ekstrem demir stresinin bulunduğu koşullar altında, mantarlar siderofor olarak bilinen, düşük moleküler ağırlıklı ( $M_r < 1,500$ ) ferrik demir şelatörleri üretmektedirler. Bu bileşikler ferrik demiri çözüp, mikrobiyal hücrelere taşırlar.<sup>23,24,25,26,27</sup>

1997 yılında Winkelman ve Drechsel' in sideroforların yapısını belirlemesinin ardından ve 2003 yılında Hass tarafından yürütülen çalışmalarla siderofor biyosentezinin regülasyonu hakkında edinilen bilgilerin ardından hem sideroforlar hem de demir kaynakları birçok mikroorganizmanın virülansında önemli bir faktör haline gelmiştir.<sup>28</sup>

## 2.9. Demir ve Sideroforlar

Dünyada en çok bulunan ikinci metal olan demir, Fe (II) ve Fe (III) olmak üzere iki iyonize halde bulunabildiğinden, sıklıkla oksidasyon-redüksiyon enzimlerinin kofaktörü olarak kullanılmaktadır.<sup>24,29</sup>

Birçok canlı sistem demire gereksinim duymaktadır ve demir hemen hemen tüm organizmalar için temel elementtir. Oksijen transportu, depolanması, elektron transportu, DNA replikasyonu, bakteri toksinlerinin sentezi gibi birçok hücresel fonksiyonda, demir önemli rol oynamaktadır.<sup>23,24,29</sup>

Herhangi bir patojenin sebep olduğu enfeksiyon sürecinde, demirin elde edilmesi, enfeksiyon oluşumunda kilit noktadır. Bu metal, memeli konağındaki yüksek afiniteli demir bağlayan proteinlerden (tranferrin, laktoferrin, ferritin, hemoglobin) ayrı bir yere sahiptir.<sup>30</sup>

Demir eksikliği, mikroorganizmaların yüzey kompozisyonları üzerine etki yapabilmektedir. Yüzey kompozisyonundaki bu değişim ise mikroorganizmanın antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılığını değiştirmektedir.<sup>31</sup>

Demir, memeli dokularında bol miktarda bulunmasına rağmen, hücre dışında sınırlı miktarlarda bulunur. Biyolojik sıvılardaki demir konsantrasyonu, demirin hücre içerisine alınımı ve hücre içerisinde depolanması kontrolünde düzenlenmektedir. Hücre dışı demir, transferrin ve laktoferrin gibi yüksek afiniteli transport glikoproteinlerine bağlı iken hücre içinde ise, ferritin, hemosiderin, hem olarak bulunmaktadır.<sup>23,24,30</sup>

Serbest demir aerobik ortamlarda çözünmez bileşikler (oksit-hidroksit) halinde bulunmaktadır. Ayrıca gevşek bağlanan demir,

anaerobik ortamda çok toksiktir, çünkü bu formda iken serbest radikallerin üretimini katalize etmektedir.<sup>23,24,29</sup> Bundan dolayı repolimerizasyonu ve toksisiteyi önlemek adına, demirin elde edilmesinin ardından depolanması fungal metabolizmanın esası haline gelmiştir. Demir toplanması iki aşamadan oluşmaktadır; çevresel kaynaklardan veya konaktaki yüksek afiniteli bağlama proteinlerinden demirin çözünmez haldeki ferrik formunu çözünür hale getirmek ve bu metali fungal membrandan geçirmek.<sup>24,27,32</sup>

Bazı patojenik mantarların ise siderofor sentezlememelerine rağmen sideroforları kullandıkları gözlemlenmiştir. Kullanıldığı mantar tarafından sentezlenmeyen sideroforlara ksenosideroforlar denilmektedir. Ksenosiderofor tanımı ile birlikte, mantarların kendi sentezledikleri sideroforların yanı sıra, sentezleyemedikleri sideroforları da kullanabilecekleri kanıtlanmış olundu.<sup>27</sup>

*C. albicans* hidrokamat tip sideroforları sentezleyebildiğinden, *C. albicans* için ksenosiderofor tanımı ferrioksaminB, ferrikrom, ferrikrosin ve fusarinin gibi sideroforların kullanılmaktadır.<sup>27</sup>

Fungal sideroforların çoğu hidrokamat tiptedir. Buna rağmen, zigomiçetler demir düzenleyici polikarboksilatlar oluştururken, tahta çürümeye neden olan mantarlarda fenolat-katekolat tipte siderofor bulunduğu bildirilmiştir. Bu bileşikler kağıt kromatografisi ile ayrıştırılmış fenolik sideroforlarla karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda, kesin olmamakla birlikte *C. albicans* 'ın da fenolatlar oluşturduğuna dair raporlar sunulmuştur, fakat bu raporlar renk reaksiyonlarını temel almaktaydı.<sup>24</sup>

Serumda bulunan *C. albicans* 'ın filamentöz formunun ferrikrom tip siderofor ürettiği ve bunun virülansda önemli rol oynadığı

düşünülmektedir. Ayrıca *C. albicans*' da ferrokrom taşıyıcısı, epitelyal invazyonda gereklidir. Bunların yanı sıra hemin de *C. albicans* tarafından demir kaynağı olarak kullanılmaktadır.<sup>27</sup>

#### 2.9.1. Çeşitli Demir Kaynakları

##### 2.9.1.a. Hemin

Demirin kaynağı olarak hemin kullanımı bakterilerde iyi bilinen bir olaydır. Hemoglobinin ayrışması ile ortaya çıkan demir içeren bileşikler, iki patojenik mantar *C. albicans* ve *H. capsulatum*' u stimule eder. Normal insan serumu *C. albicans* gelişimini inhibe etmektedir. Bunun büyük ihtimalle transferrine bağlı olduğu düşünülmektedir çünkü; transferrin demiri bağlar ve demir konsantrasyonunu mantarın gelişimine etki etmeyecek seviyelere düşürür. Fakat Moors ve arkadaşları hemoglobin veya heminin serum içeren besiyerinde *C. albicans*' ın gelişimini geri kazandırdığını gösterdiler.<sup>24</sup>

##### 2.9.1.b. $\beta$ - ketoaldehit fitotoksin

Barash ve arkadaşları *Stemphylium botryosum* f. sp. *lycopersici*' den iki fitotoksin izole etmiş ve kimyasal olarak tanımlamıştır. Bu toksinlerin sentezi demirle düzenlenmekte ve ligandlar Fe (III)' ü şelate etmektedirler.<sup>24</sup>

Zoopatojenik mantarlar tarafından kullanıldığı bilinmeyen bakteriyel şelatörler:

#### 2.9.1.b.i. Sistein

Bir amino asit olan sisteinin demir bağladığı iyi bilinen bir unsurdur. *Legionella pneumophila* hidroksamat tip siderofor üretmemekte ancak CAS plaklarında renk değişimi meydana gelmektedir. Bu aktivitenin besiyerinin sistein içermesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

#### 2.9.1.b.ii. $\alpha$ -Keto asitler

$\alpha$ -Keto asitler bakteriler tarafından salgılanmakta ve siderofor olarak görev yapmaktadırlar.

#### 2.9.1.b.iii. Hidroksi asitler

Bazı mantarlar sitrik, malik ve süksinik asit gibi krebs döngüsü ürünleri salgırlar. Bu hidroksi asitlerin konsantrasyonları besiyerinde biraz yüksek olabilir ( $< 1\mu\text{M}$ ). Bu bileşiklerden özellikle sitrik asit, demirin potansiyel ligandıdır.<sup>24</sup>

### 2.9.2. Demirin Depolanması

#### 2.9.2.a. Önemi

Serbest demir, harab edici bir metaldir. Fenton reaksiyonunda  $\text{Fe (II)}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ile reaksiyona girer ve hidroksi radikal oluşur. Bu radikal canlı hücrelerdeki, şekerlere, amino asitlere, fosfolipidlere, DNA bazlarına ve organik asitlere bağlanarak onlara zarar vermektedir. Dolayısı ile serbest demirin oluşumu ile ortaya çıkacak toksisiteyi yok etmek ve mantar hücresine taşınan demirin repolimerizasyonunu önlemek amacı ile birtakım demir depolama metodlarının kullanılmasına gereksinim duyulmaktadır.<sup>24</sup>

#### 2.9.2.b. Depo Molekülleri

Mantarlarda birçok farklı demir depolama mekanizmaları bilinmektedir. *Saccharomyces cerevisiae'* da polifosfatlar vakuolar depo bileşikleri olarak görev yaparken, zigomiçetlerde ferritin benzeri proteinler, demir depo bileşikleri olarak görev yapmaktadırlar. Askomiçetlerde ve bazidiyomiçetlerde bu tarz proteinlerin varlığı gözlenmediğinden dolayı, bu filumlarda hidroksamat sideroforlar depo molekülleri olarak görev yapmaktadırlar.<sup>24,32</sup>

Hayvanlarda ferritin, bitkilerde fitoferritin ve bakterilerde bakteriyoferritin olarak adlandırılan, demir bakımından zengin moleküller keşfedilmiştir. Mantarlarda ise zigomiçetlerde bu tür moleküller tanımlanmıştır.

Zigomiçetlerin üyelerinde 3 tip ferritin açıklanmıştır;

- (i) Mikoferritin: Memeli ferritinine benzer yapıda olan
- (ii) Zigoferritin: Sadece zigomiçetlerde bulunan ferritin.
- (iii) Bakteriyoferritin: *Absidia spinosa'* da bulunan.

Askomikota ve bazidiyomikota filumlarının üyelerinde ferritin benzeri moleküller keşfedilememiştir. Askomiçetlerden *Neurospora crassa* ve *Aspergillus ochraceus* üzerinde yapılan çalışmalarda; *N. crassa'* nın koprogen ve ferrikrosin olmak üzere iki hidroksamat siderofor formu üretmekte olduğu ve demirin az olduğu koşullarda esas ürettiği hücre dışı sideroforun desferrikoprogen olduğu keşfedilmiştir. Desferrikrosin ise çoğunlukla hücre içinde bulunur. Koprogenin alınmasının ardından, demir serbest bırakılır ve ligand değişimi ile desferrikrosine transfer edilir.

Desferrikrosin ferrikrosin formuna dönüşür ve esas hücre içi demir depo bileşiği olarak görev yapar. *A. ochraceus*' da ise ferrokrosin uzun süreli demir depo bileşiği olarak görev yapmaktadır.<sup>24</sup>

### 2.9.3. Sideroforların Sınıflandırılması

Sideroforlar demir yük formları esas alınarak adlandırılmaktadırlar:

#### 2.9.3.a. Hidroksamatlar

Bütün hidroksamatlar bir *N*- $\delta$  hidroksi ornitin içerirler. Bazı mantarlar tarafından üretilen hidroksamat aileleri şunlardır:

##### 2.9.3.a.i. Rhodotorulik asit

Bir *N*- $\delta$  asetil- L- *N*  $\delta$ - hidroksiornitin. Temel olarak basidiomycetlerde bulunmuştur. Rhodotorulik asidin farklı bir formu olan dimerum asit olarak adlandırılan bir dihidroksamattır. Üç mol dimerum asit (DA), demir ilişkili ligandı oluşturmak için iki mol demirle bağlanma yapar.(Fe<sub>2</sub>DA<sub>3</sub>) Demirin bağlanması diğer üç hidroksamat ailesinden daha zayıftır. Tıbbi önemi olan mantarlardan *H. capsulatum* ve *Blastomyces dermatitidis*' de bu tip hidroksamat bulunmaktadır.<sup>24</sup>

##### 2.9.3.a.ii. Koprojen

Koprojenler üç mol *N*- $\delta$ -açıl-*N*- $\delta$ - hidroksi-L-ornitin, üç mol anhidromevalonik asit ve bir mol asetik asitten oluşmaktadır. Koprojenler bazı bitki patojenleri, *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, insan patojeni *Fusarium dimerum* ve *Curvularia lunata* tarafından üretilmektedir.<sup>24</sup>

#### 2.9.3.a.iii. Ferrikrom

Ferrikromlar *N*- $\delta$ -açıl-*N*- $\delta$ -hidroksiornitinin gliserin, serin ve alaninle kombinasyonunu içeren siklik peptidlerdir. Ferrikromun demirin hücre dışında depolanmasında da görev yapmaktadır. *Trichophyton* spp., *Aspergillus* spp. gibi patojenik mantarların yanı sıra, bazı fito- patojenik mantarlar tarafından da üretilmektedir.<sup>24</sup>

#### 2.9.3.a.iv. Fusarininler

Fusarininler veya bir başka deyişle fusigenler, lineer veya siklik hidroksamatlar olabilirler. Fusarinin *N*- hidroksiornitinin anhidromevalonik asitle *N* asetillenmiş bileşigidir. Zoopatojenlerin yanı sıra *Fusarium* spp. ,*Paecilomyces* spp. ve *Aspergillus* spp. da çeşitli fusarininler bulunmuştur.<sup>24</sup>

#### 2.9.3.a.v. Tanımlanmamış hidroksamatlar

*C. albicans* tarafından hidroksamat oluşturulması ile ilgili kesin olmayan raporlar bulunmaktadır. Bu hidroksamatların kimyasal yapıları tam olarak belirtilmemiştir ve bazı araştırmacılar, mantarın uzun süre kültüre edilmesi (20 gün) sonucu oluşan ürünlerin renk oluşumuna dayalı testlerde pozitif sonuç verebileceğini ileri sürmüştür.<sup>24</sup>

#### 2.9.3.b. Polikarboksilatlar

Tamamlanmamış bir rapor olmasına rağmen, zigomiçetlerde hidroksamat tip siderofor sentezi gözlemlenmemiştir. Bunun yerine, *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*' den, rhizoferrin adı verilen bir sitrik asit içeren polikarboksilat izole edilmiştir. Bu molekül diaminobütana bağlı iki sitrik asit ünitesi içermektedir. Rhizoferrin geniş ölçüde Zygomycota filumu üyeleri tarafından paylaşılmaktadır. Bunun yanında Mucorales filumunda da gözlemlenmiştir.<sup>24</sup>

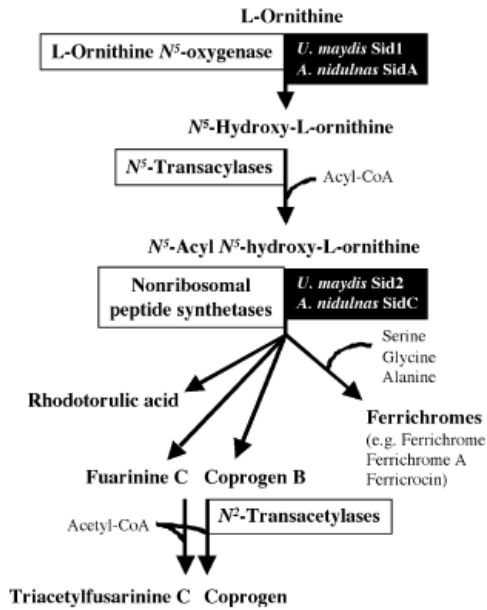
### 2.9.3.c. Fenolat- katekolatlar

Çoğu araştırmacı fenolat-katekolat siderofor sınıfının mantarlar tarafından üretilmediğini düşünmektedir. Sadece iki istisna bildirilmiştir. Birinci istisna *C. albicans*' dır. Diğer istisna ise tahtaya zarar veren belli başlı mantar türlerini içermektedir.<sup>24</sup>

### 2.9.4. Siderofor Biyosentezinin Biyokimyası ve Genetiği

Bütün siderofor peptidleri ribozomal olmayan peptid sentetaz tarafından sentezlenir. Mantar sideroforları, başlıca protein oluşturmayan aminoasit olan ornitin tarafından oluşturulur.<sup>24</sup>

Hidroksamat tip sideroforların kimyası ile ilgili detaylı bir tanımlama henüz yeni yapılmıştır (2002).



Şekil 2.1: Fungal hidroksamat tip sideroforların Plattner ve Diekman'a göre genel biyosentez yolu. (1994)

Siderofor biyosentezinin birinci basmağı Ornitin  $N^5$ -Oksijenaz tarafından katalizlenen ornitin  $N^5$ -hidroksilasyonudur. İlk tanımlanan fungal ornitin  $N^5$ -oksijenaz kodlayan gen, *Ustilago maydis*'e ait *sid1* geni idi. Günümüzde ise *Aspergillus nidulans*'da *sid1* geninin ortoloğu olan *sidA* geni klonlanmış ve tanımlanmıştır. *sid1* ve *sidA*, çeşitli bakteriyel ornitin  $N^5$ -oksijenazlara karşı önemli benzerlikler göstermektedir.<sup>30</sup>

*U. maydis*' in *sid1* ve *A. nidulans*'ın *sidA* nın ekspresyonu demir tarafından baskılanmaktadır ve ornitin  $N^5$ -oksijenaz kodlayan genlerin bozulması, parçalanması, bu iki mantar türündeki hidroksamat tip sideroforların sentezini bloklamaktadır.<sup>30</sup>

#### 2.9.5. Siderofor Transportu

Demirin tam olduğu ve eksik olduğu ortamlarda gelişen *N. crassa*' nın plazma membranından elde edilen proteinler karşılaştırılmıştır. SDS jel elektrogorez profillerinde iki kaynağın proteinleri arasında kayda değer değişiklikler gözlenmemiştir.<sup>24</sup>

##### 2.9.5.a. Hidroksamat-Demir Transport Mekanizması

###### 2.9.5.a.i. Mekik Mekanizma

Bu mekanizma ile siderofor-demir kompleksi hücre içine alınır. Demir redüktaz veya ligand değişimi ile serbest bırakılır. Toplayıcı ligand diğer demir molekülünü yakalamak için serbest kalır. Bu mekanizma koprogen ve ferrikrom siderofor ailelerinin kullandığı bir mekanizmadır.

#### 2.9.5.a.ii. Direkt Transfer

Bu mekanizmada ise hücre içerisine ligand girişimi olmadan demir alınır. Membran ilişkili değişim, sideroforlar ile internal şelatör ajanlar arasında olmaktadır. Bu tip transfer rhodotorulik asit ailesinde yapılmaktadır.

#### 2.9.5.a.iii. Esteraz- redüktaz mekanizması

Bu mekanizma ferrik triasetilfusarinin C ile yönetilmektedir. Ligandın alınması ile, demir ligandındaki ester bağları parçalanır, ferrik demir miktarı azalır ve depolanır.

#### 2.9.5.a.iv. Reduktif mekanizma

Bu mekanizma sideroforu kullanan ancak kendileri sentezleyemeyen mantarlar tarafından kullanılmaktadır.<sup>24</sup>

#### 2.9.6. Fungal Siderofor Varlığının Ortaya Çıkarılması

Sideroforlar demir bakımından fakir kùltürlerde üretilir ve Fe (III) 'ün yakalanmasına bağlı olarak besiyerinin rengi kırmızıya döner. Dolayısı ile yapılması gereken, mantar için az miktarda demir içeren bir besiyeri hazırlamak, bu kısıtlı demir ortamında büyümesini sağlamak, santrifüj edilmiş örneklere periodik olarak demir tuzları eklemek ve bir örnek kırmızıya döndüğü zaman ilerki aşamalar için kùltür ortamını kullanmaktır.<sup>24</sup>

Sideroforlar çoğunlukla Arkin ve arkadaşları tarafından geliştirilen metodla saptanmaktadır. Bu metod semikantitatifdir ve sideroforun miktarı 510 nm de optik dansiteyi ölçmekle hesaplanabilmektedir. Bir diğer kolorimetrik deney, CAS (krom azurol S)

boyası ile hekzadesiltrimetilamonyum bromür (HDTMA) kompleksini kullanmayı içermektedir.<sup>24,32</sup> Siderofor tarafından CAS- HDTMA kompleksinden demirin alınması, boyanın renginde değişime neden olmaktadır. Boyanın rengini maviden menekşe, mora dönmesi katekol tip siderofor varlığını ( *Aspergillus niger*), maviden turuncuya dönmesi hidroksamat tip siderofor varlığını ( *Bacillus cereus*) ve maviden açık sarıya dönmesi ise karboksilat tip siderofor varlığını ( *Rhizopus oligosporus*) göstermektedir. Sideroforun var olup olmadığı belirlendikten sonra, tipini belirlemek için kimyasal karakterizasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Kimyasal bir karakterizasyon ise ince tabaka kromatografisi, yüksek performans sıvı kromatografisi, nükleer magnetik rezonans ve kütle spektroskopisi ile yapılabilmektedir.<sup>24</sup>

Siderofor biyosentezinin moleküler düzeyde analiz edilmesine ise *Ustilago maydis* üzerinde yapılan öncü çalışmalarla başlanmış ve daha sonra *Aspergillus nidulans* ve *Neurospora crassa* bulunan yapısal ve regülatör genlerin tanımlanması ile ilerleme kaydedilmiştir.<sup>30</sup>

#### 2.9.7. Patojenik Faktörler Olarak Sideroforlar

Sideroforların patojenezdeki esas rolü, birçok bakteriyel türde kanıtlanmış olsa da siderofor ürettiği bilinen bir takım patojenik mantarda (*A. fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporotrix schenckii*, *Microsporium spp.*, *Blastomyces dermatitis*, *Trichophyton spp.*), siderofor üretiminin fungal virülansdaki rolü henüz aydınlığa kavuşmamıştır.

#### 2.9.7.a. Aktiviteleri

##### 2.9.7.a.i. Fitopatojenler

Hem bakteriyel patojenler hem de bitkisel mantar patojenleri birçok siderofor üretmelerine rağmen bunların patogenezi genelde bilinmemektedir. *Verticillium dahlia* gibi fungal patojenler hidroksamat tip siderofor olan koprojen B ve DA üretmektedirler. Sınırlı demir içeren ortamlarda bu bileşikler tespit etmek için gösterilen çabalar sonuçsuz kalmıştır.<sup>24</sup>

##### 2.9.7.a.ii. Fitotoksinler

*Stemphiliium botryosum* f. sp. *lycopersici* tarafından üretilen ve ferrik demir şelatörleri olan Stemfilotoksin I ve II fitotoksinlere tek örnektir. Oluşumları demir konsantrasyonuna bağlıdır ama hidroksamatlar gibi demir tarafından düzenlenmemektedir. Bu sebepten dolayı siderofor aktivitesi fitotoksitesinin ardına yer almaktadır.<sup>24</sup>

##### 2.9.7.b. Konak cevabı

Sideroforların antijenik oldukları bilinmektedir. Ancak in vivo ortamda sideroforların etkileyici demir çöpçüleri olamayabilecekleri öne sürülmektedir çünkü; sideroforlar serum proteinlerine bağlanarak bir immun cevap elde ederler. Böyle bir bağışıklık, demirin toplanmasında sideroforların etkisi ile uzlaştırılabilir. Aynı zamanda immun cevap in vivo sentezin de kanıtıdır.<sup>24</sup>

## 2.10. Virulans Faktörlerinin Moleküler Yöntemlerle Saptanması

Hasta ve doku örneklerinin mikroskopik incelemesi, mantar enfeksiyonlarının tanısında oldukça özgül ve bu nedenle çok önemli olmakla birlikte, duyarlılığın düşük olması farklı tanı yollarını gerekli kılmıştır. Klinik örneklerin ekimi ve etkenin üretilerek gösterilmesi daha duyarlı olmasa da mantarlar geç üreyen mikroorganizmalar olduğundan üremenin beklenmesi zaman kaybına yol açmaktadır. Oysa bağışıklığı bozuk hastalarda mantar enfeksiyonları aniden başlar, hızlı seyir gösterir ve tedavi edilmezse mortal sonuçlanır. Bu tür hastalarda antikor yanıtı da iyi olmadığından serolojik testlerin başarısı ne yazık ki düşüktür. Antijen ve metabolit tarayan testler ümit verici olmakla beraber altın standartta bir test henüz geliştirilememiştir. Dolayısıyla nükleik asit tespitine dayalı tanı yolları gündeme gelmiş, daha çok yeni olmakla beraber bazı sonuçlar alınmaya başlanmıştır.<sup>33</sup>

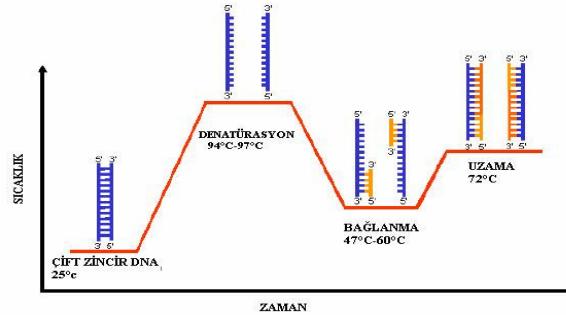
Nükleik asit tespitine dayalı yöntemleri kullanmadan önce mutlaka amplifikasyonun yapılması gerekmektedir. Bu moleküler yöntemler arasında en çok kullanılan, genellikle hedeflenen bir gen bölgesinin çoğaltılıp görüntülenmesine dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olsa da, en heyecan verici amplifikasyon sonuçları “realtime PCR” ile elde edilmiştir.<sup>33</sup>

1980 yılında Kary Mullis tarafından tasarlanmış olan PCR tekniği moleküler araştırmaların yapılmasında büyük kolaylıklar sağlamış ve günümüzdeki PCR çalışmalarının temelini atmıştır.<sup>34</sup>

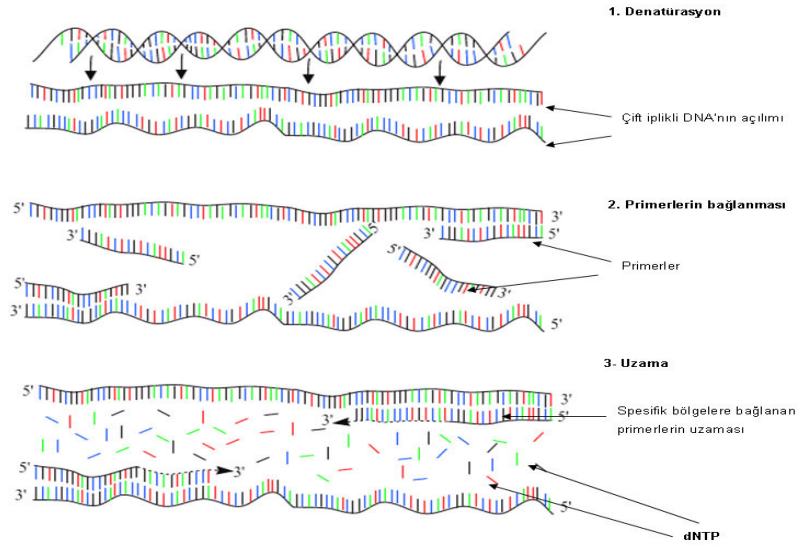
PCR, spesifik primerler aracılığı ile, bir DNA parçasının çoğaltılmasına dayanan *in vitro* bir yöntemdir. Bu reaksiyonda temel olarak çoğaltılması planlanan hedef bölgenin iki ucundaki DNA dizilerini özgül olarak tanıyıp, karşı iplikçiklerini hibridize eden iki oligonükleotid primer,

primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz, sentez için gerekli olan deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP), polimerazın çalışması için gerekli olan tampon maddeler ve kofaktör olan  $Mg^{+2}$  iyonları kullanılmaktadır.<sup>35</sup>

PCR 'da reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA içeren örnek, çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir. Daha sonra, örnekteki hedef çift sarmal ds DNA'nın tek sarmal ssDNA'ya dönüşmesi sağlanır. Bu basamak **denatürasyon** adını alır. Tek DNA iplikçiklerinin karşısı, 20-30 baz çifti (bp) uzunluğundaki sentetik oligonükleotid diziler, DNA/RNA heterodubleksini oluşturmak üzere primer gibi kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacı ile ikinci bir primer kullanılır. Primerlerden birisi, ssDNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerindeki sonlandırıcı bölgeye bağlanır. Bu aşama ise **bağlanma (annealing)** aşamasıdır. Taq DNA polimeraz enziminin yardımı ile, primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her ssDNA zincirinin komplementeri oluşturulur. Bu aşama da **uzama (extention)** aşamasıdır. Bu aşamaların sonunda iki adet dsDNA oluşur. Oluşan dsDNA 'lar, yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenir. Bu işlem 30 siklus tekrarlandığı zaman, birkaç saat içerisinde, hedefin milyarlarca kopyası elde edilebilir.<sup>36</sup>



Şekil 2.2: PCR basamakları



**Şekil 2.3: Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Real Time PCR ise, reaksiyon boyunca veri toplanması ve analizin aynı anda devam etmesi demektir. Yani bu reaksiyonda amplifikasyon ve analiz birlikte yapılmaktadır. DNA boyaları ya da floresan probalar gibi analiz için gerekli olan reaktifler, PCR karışımına amplifikasyondan önce eklenmektedir. Veriler amplifikasyon süresince aynı tüp içinden ve aynı cihaz ile toplanmaktadır. Örnek transferi, reaktif eklenmesi ve jel ayırımı yoktur. Bu reaksiyon ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanıldığı için, sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azaltılmaktadır. Miktar tayini ise Real-Time PCR kullanılarak, örnekteki özgül mRNA sekansının saf miktarı ölçülerek yapılmaktadır.<sup>37</sup>

Real-Time PCR kimyası amplifikasyonun, reaksiyonun erken fazlarında ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır. Reaksiyonun

kinetiklerini PCR 'ın erken fazlarında ölçebilmek, geleneksel PCR' a kıyasla kesin bir avantaj sağlamaktadır.<sup>37</sup>

Geleneksel PCR yöntemlerinde amplifikasyonu tanımlamak için agaroz jeller kullanılmaktadır. Agaroz jelde sonuçlar, reaksiyonun bitiş noktasında elde edilmektedir. Bitiş noktasının belirlenmesi ise çok zaman almaktadır. Günlerce sonuç elde edilemeyebilir. Ortaya çıkan sonuçlar tam, kusursuz değildir. Çünkü bitiş noktaları örnekten örneğe çeşitlilik göstermektedir. Jeller bu çeşitliliği çözümleyemeyebilirken, Real-Time PCR bu çeşitliliği tanımada oldukça duyarlıdır.<sup>37</sup>

Real-Time PCR;

- i. Bilgileri eksponensiyel büyüme fazında topladığından ,
- ii. Floresan sinyallerde artış, üretilen ampikonların miktarı ile doğru orantılı olduğundan,
- iii. Prob bir ampikonun sürekli amplifikasyonunu sağladığından,
- iv. Geniş tanımlama aralığı olduğundan,
- v. Post PCR işlemlerine gerek duyulmadığından dolayı geleneksel PCR yöntemlerine kıyasla daha avantajlı bir yöntemdir.<sup>37</sup>

### **Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”- “SYBR Green I”**

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında “**SYBR Green I**” yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından, çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak “real-time” PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. “SYBR Green I” en fazla kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya, 30 amplifikasyon

döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder . Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve “SYBR Green I” boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ısıma yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar ve bu artış “real-time” cihazının monitöründen izlenebilir. Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir. Floresan işaretli problara ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Bunun yanı sıra yöntemin dezavantajları da vardır. İstenmeyen PCR ürünlerinin çoğalması ile yine floresan açığa çıkacağından, her zaman istediğimiz DNA'nın çoğaldığını işaret etmez, yanlış pozitif sonuç almak mümkündür. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında, primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda “primer dimer”leri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ısıma gözlenebilir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizlerinin (“melting curve”, “dissociation”) yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde, cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature=  $T_m$ ) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (' $T_m$ ' derecesi) vardır. Bu erime sıcaklığı, çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında (primer dimer'lerinde) aranan DNA parçasının  $T_m$  derecesi arasında farklılık olacaktır.  $T_m$  derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindendir. Bu yüzden  $T_m$  sıcaklığı her ürün için özeldir. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir.<sup>38</sup>

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Gereç**

##### 3.1.1. Cihazlar

Etüv ( elektro-mag, Türkiye)

Otoklav ( Sanyo, Japonya)

Nanodrop cihazı (Thermo Scientific, ABD)

LightCycler® 2.0 ( Roche, Almanya)

Hassas terazi ( Libror AEG-220, Japonya)

Mikropipetler ve uçları ( Expell, Meksika- Beta Pette™, ABD)

Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

Derin dondurucu (Uğur, Türkiye)

Sınıf 2 biyogüvenlik kabini (Metis biyoteknoloji, Türkiye)

Işık mikroskobu ve dijital fotoğraf makinesi CX31 ( Olympus, Japonya)

Santrifüj cihazı (BOECO, Almanya)

Mikrosantrifüj ( Beckman Coulter, Almanya)

Kuru blok ( Bio TDB-100, Almanya)

pH metre ( Fisher Scientific, ABD)

Cam eşyalar, özeler, bistüriler, ependorflar, kapillerler

### 3.1.2. Kimyasallar ve Besiyerleri

#### 1. Sabouraud 2 % Glukoz Agar ( pH 5.6) ( Fluka Biochemika, İsviçre)

|              |        |
|--------------|--------|
| Peptone      | 10 g/L |
| D (+) Glukoz | 20 g/L |
| Agar         | 17 g/L |

#### 2. Malt Extract Agar (Merck, Almanya)

|                        |        |
|------------------------|--------|
| Malt Extract Agar      | 30 g/L |
| Mikolojik pepton       | 3 g/L  |
| Agar- agar             | 15 g/L |
| pH 5.6± 0.2 (25°C' de) |        |

#### 3. Siderofor besiyeri

CAS boyası ( Merck, Almanya)  
HDTMA ( Merck, Almanya)  
FeCl<sub>3</sub>. 6H<sub>2</sub>O ( AppliChem, Almanya)  
Agaroz ( ONBIO, Kanada)  
Agar ( HIMEDIA, Hindistan)  
PIPES ( Merck, Almanya)  
NaOH ( Merck, Almanya)  
HCl ( J.T. Baker, Hollanda)

#### 4. High Pure RNA Isolation Kit ( ROCHE, Almanya)

#### 5. 1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (ROCHE, Almanya)

#### 6. PCR için kullanılmış primer dizileri (Eurogentec, Belçika)

#### 7. LightCycler® DNA Master SYBR Green I (Roche, Almanya)

### 3.1.3. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

#### (i) CAS boyası solüsyonu

0.03 gr CAS boyası tartılarak 25 ml distile suda çözülmüştür.

#### (ii) HDTMA solüsyonu

0.036 gr HDTMA 20 ml distile suda çözülmüştür.

#### (iii) Fe( III) solüsyonu

0.027 gr  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  tartılıp, 102  $\mu\text{l}$  HCL ve 100 ml distile su içerisinde çözülmüştür.

### 3.2. Yöntem

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı bünyesindeki Mikoloji laboratuvarında bulunan kültür koleksiyonundan sağlanan 40 mantar suşu (*Candida* ve *Aspergillus*) ile 5 referans suş ( *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 90128, *C.albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. krusei* ATCC 6258) bu çalışmaya dahil edilmiştir.

#### 3.2.1. Kültür Koleksiyonundaki Örneklerin Canlandırılması

Kültür koleksiyonundan seçilen örneklerin canlandırılması amacı ile, maya örnekleri SDA besiyerine pasajlanmış ve 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda üreme gözlenmeyen örnekler 37°C' de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Koleksiyondan seçilen küfler ise hem siklohegzimitli hem de siklohegzimitsiz SDA besiyerine pasajlanmış, siklohegzimitli SDA besiyerine ekimi yapılan örnekler oda sıcaklığında inkübasyona bırakılırken, siklohegzimitsiz SDA besiyerine ekimi yapılan örnekler ise hızlı bir üreme elde edebilmek amacı ile tıpkı mayalar gibi 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir.

### 3.2.2. Çeşitli Besiyerleri ile Siderofor Tanımlanması

#### 3.2.2.a. CASAD Besiyeri

60.5 mg CAS 50 ml distile, deiyonize suda, 72.9 mg HDTMA ise 40 ml suda özölmüştür. Üzerine 10 ml Fe (III) solüsyonu eklenip, karışım 121 ° C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ayrı bir erlenmayere 750 ml distile su, 15 g agar, 30.24 g PIPES ve 12 g NaOH [ 50 % ( w/w)] konularak 121 ° C' de 15 dakika sterilize edilmiştir.

#### Testin Uygulanması

Otoklavlanan iki karışım birbirine eklenmiş ve mavi CAS agar besiyeri elde edilmiştir. Besiyerinde açılan küçük kuyucuklara, hazırlanan maya ve küf solüsyonları aktarılmıştır. Örnekler 37°C 'de 4-8 saat inkübe edilmiştir.

#### Değerlendirme

Kuyucukların etrafında meydana gelen renk değişimleri ve oluşan turucu renkli zonun çapı değerlendirilmiştir.

### 3.2.2.b. CAS/ MEA Besiyeri

#### 3.2.2.b.i. CAS agar (Schwyn ve Neilands, 1997)

#### 3.2.2.b.ii. Malt Extract Agar

|                                            |        |
|--------------------------------------------|--------|
| Malt Extract Agar                          | 24 g   |
| Distile su                                 | 500 ml |
| 121 °C' de 15 dakika sterilize edilmiştir. |        |

### Testin Uygulanması

Petrilerin yarısına CAS agar besiyeri, diğer yarısına ise MEA besiyeri dökülmüştür. Test edilecek mantar suşları, MEA besiyerine ekilmiş ve 24 saat 37 ° C' de inkübe edildikten sonra 6 gün boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

### Değerlendirme

MEA besiyerinde üreyen mantarların siderofor varlığı, CAS agar besiyerinde meydana gelen renk reaksiyonu ve CAS reaksiyonu esas alınarak değerlendirme yapılmıştır.<sup>39</sup>

### 3.2.2.c. O-CAS Besiyeri ( pH 3.86)

CAS boyası solüsyonu 25 ml

HDTMA solüsyonu 20 ml

Fe (III) solüsyonu 5 ml

121 ° C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ayrı bir cam kaptaki

Agaroz 2.5 gr

PIPES 15.12 gr

Steril distile su 450 ml

NaOH ( pH 6.8 olana kadar)

121 ° C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra iki karışım karıştırılmış ve mavi renkli bir besiyeri elde edilmiştir. (Resim 3.1)

### Testin Uygulanması

SDA besiyerine ekimi yapılan ve üreme gözlemlenen örnekler (koloni oluşturan) üzerine 50 °C' ye soğutulmuş yarı katı CAS besiyeri dökülmüş ve 15 dakika içerisinde meydana gelen renk değişimleri incelenmiştir.

### Değerlendirme

Mantar kolonilerinin etrafındaki ve mavi CAS yarı katı besiyerinde meydana gelen renk değişiklikleri, test edilen mantarların siderofor sentezlediğini gösteren bulgular olarak değerlendirilmiştir.<sup>40</sup> (Resim 3.1, 3.2)



**Resim 3.1 : O- CAS besiyeri**



**Resim 3.2 : O- CAS besiyerinde negatif sonuç.**



**Resim 3.3: O- CAS besiyerinde pozitif sonuç.**

### 3.2.3. Siderofor Real-Time PCR

#### 3.2.3.a. Örneklerden total RNA Eldesi

Örneklerden RNA elde edilmesi için High Pure RNA Isolation Kit ( Roche, Almanya) kullanılmıştır. Üretici firma önerilerine uygun olarak, 100 µl örnek ile çalışılmıştır. Kit içeriğindeki DNaz enzimi ile örneklerin olası DNA bulaşı engellenmiştir. Bu protokole göre;

1.  $2 \times 10^6$  hücre içeren maya ve küf süspansiyonlarından 100 µl alınıp üzerine 500µl PBS eklenmiştir.
2. Örnek 2,000 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Üst kısım dökülüp ve çökelek tekrardan 200 µl PBS ile sulandırılmıştır.
4. Her ependorfa 10 µl Litikaz (0.5 mg/ml) eklenir ve 30°C' de 15 dakika inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyonun ardından 400 µl Lysis/ Binding Buffer eklenip 15 saniye boyunca vortekslenmiştir.
6. Örneği filtreli tüplere aktarmak için her toplama kabı içerisine bir filtreli tüp yerleştirilmiş ve en çok 700 µl olacak şekilde örnekler bu yeni tüplerin filtre kısmına aktarılmıştır.
7. Tüpler 8,000 x g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüjün ardından filtreli tüp toplama kabından ayrılmış, toplama kabında bulunan sıvı dökülmüş ve filtre tekrar toplama kabına yerleştirilmiştir.
9. Her örneğe 90 µl DNaz İnkübasyon Tamponu ve 10 µl DNaz 1 eklenmiş, solüsyon karıştırılıp, 15-20° C' de 15 dakika inkübe edilmiştir.
10. Üst kısma 500 µl Yıkama Tamponu I eklenmiş ve 8,000 x g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama kabındaki sıvı dökülmüştür.

11. Üst kısma 500 µl Yıkama Tamponu II eklenmiş ve 8,000 x *g*'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama kabındaki sıvı dökülmüştür.
12. Üst kısma 200 µl Yıkama Tamponu II eklenmiş ve en yüksek devirde 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
13. Toplama kabı atılmış ve filtreli tüp yeni, steril bir 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpü ile birleştirilmiştir.
14. RNA 'yı ayrıştırmak için; üst kısma 100 µl ayrıştırma Tamponu eklenmiş ve 8,000 x *g*'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
15. Ayrıştırılmış RNA içeren mikrosantrifüj tüpü daha sonraki çalışmalar için -80°C' de saklanmıştır.

Elde edilen total RNA miktarları RNA ölçüm cihazında (NanoDrop, ABD) ölçülerek RNA varlığı kontrol edilmiştir.

### 3.2.3.b. Ters Transkripsiyon (RT-PCR) ile c DNA Eldesi

Total RNA'dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi için 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche, Almanya) kullanılmıştır. Özgöl olmayan randomize primer dizisi kullanılarak, 25 °C, 42 °C ve 99 °C'lik üç inkübasyon ile işlem tamamlanmıştır. Kullanılan ticari kit protokolüne uygun olarak 20 örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı;

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| 10 x Reaksiyon tamponu   | 40µl  |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub>  | 80 µl |
| Deoksinükleotid karışımı | 40 µl |
| Random Primer            | 40 µl |
| RNaz inhibitörü          | 20 µl |
| AMV Ters Transkriptaz    | 16 µl |
| Steril su                | 64 µl |

Ependorlara, hazırlanan reaksiyon karışımından 15 µl ve her RNA örneğinden 5 µl eklenmiştir.

#### Testin Uygulanması

1. Ependorf içerisinde reaksiyon karışımı ve örnek RNA' lar 25 °C' de inkübe edilmiştir.
2. Daha sonra 42 °C' de 60 dakika inkübe edilmiştir.
3. 42 °C' nin ardından 99°C' de 5 dakika inkübe edilmiştir.
4. +4 °C' de 5 dakika bekletilmiş ve cDNA elde edilmiştir.
5. Elde edilen cDNA 'lar spin santrifüj edilmiş, daha sonra kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır.

### 3.2.3.c. Sideroforu Kodlayan cDNA'ların Real-Time Cihazında Çoğaltılması

Siderofor için en az 10 ng cDNA kullanılmıştır. LightCycler cihazı (Roche diagnostics, Tenay, Turkey) ve LightCycler yazılımının 3.5 versiyonu kullanılmıştır. Real-Time PCR amplifikasyon karışımı kalıp cDNA, SYBR Green master karışım tamponu ve her bir primerden ( Forward ve Reverse primerler (Eurogentec, Belçika) 100 pmol içerecek şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon üç aşamada gerçekleştirilmiştir; denatürasyon ( 95°C'de 15 saniye, sıcaklık değişimi 20°C/saniye), hibridizasyon (zaman ve sıcaklık primerlere bağlı, sıcaklık değişimi 20°C/saniye), uzama ( 72°C'de primerlere göre değişen zamanlarda, sıcaklık değişimi 20°C/saniye). Analiz 55-90°C arasında ( sıcaklık değişimi 0,2°C/ saniye) basamaklı olarak gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR amplifikasyonu sonrasında, erime eğrisi analizleri incelenmiştir.

### 3.2.3.c.i. Hazırlanan Ana Karışım

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Su                  | 3.5 µl |
| MgCl <sub>2</sub>   | 2 µl   |
| P1 (SidF)           | 0.5 µl |
| P2 (SidR)           | 0.5 µl |
| Enzim ( SYBR Green) | 1 µl   |

Her örnek için hazırlanan ana karışımdan 7.5 µl, cDNA' dan ise 2.5 µl kapillerlere eklenmiştir. Örnekler hızlı bir şekilde spin santrifüj edilerek LightCycler ® 2.0 ( Roche, Almanya) cihazına yerleştirilip işlem başlatılmıştır.

### 3.2.3.c.ii. Real-Time PCR için kullanılan primer dizilimleri

**Tablo 3.1: Kullanılan primer dizilimleri.**

| Mikroorg.          | Primer | Dizilim                          | Baz Çifti |
|--------------------|--------|----------------------------------|-----------|
| <i>C. albicans</i> | SidF   | 5' GAA-TGC-CAG-CTG-CCA-ACC 3'    | 18 bp     |
|                    | SidR   | 5' GGG-TCT-CGA-GCT-CCG-TAA-CC 3' | 20 bp     |

### 3.2.3.d. Real-Time PCR' da Siderofor Gen İfadesinin Kantitatif Analizi

Örneklerden önce bir cDNA havuzunun 6 farklı dilüsyonu üç farklı kopya olarak ölçülmüş ve floransın başladığı siklus sayısı (Cp) ile gen ifadesinin logaritmik artışı arasında lineer regresyonla, kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

Genlerin sayısal analizi için yapılan mutlak ölçüm ( absolute quantification) sırasında, örnekteki hedef ile daha önce konsantrasyonu bilinen aynı hedefin standard eğrisi karşılaştırılmıştır. Standart eğriler, 10 kat seri dilüsyonlarla (  $10^2$  -  $10^{10}$  kopya/  $\mu$ l), kopyalar ölçülerek ( kuantifiye edilerek) oluşturulmuştur. Siderofor gen ifadesi miktarı kopya/  $\mu$ l olarak ölçülmüştür.

#### 4. BULGULAR

Çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı'na, daha önce gönderilen, siklohegzimitli veya siklohegzimitsiz SDA besiyerlerine ekimi yapılan, ID 32 C testi uygulanarak tanımlanmaya çalışılan ve PCR yöntemi ile kesin tür tanımı yapıp kültür koleksiyonuna eklenen örnekler arasından seçilen 40 mantar suşu ve 5 referans suş, çeşitli yöntemler aracılığı ile siderofor üretimi açısından incelenerek değerlendirilmiştir. (Tablo: 4.1)

**Tablo 4.1: Çalışmaya dahil edilen örnek listesi**

| No | PCR                          |
|----|------------------------------|
| 1  | <i>Aspergillus flavus</i>    |
| 2  | <i>Candida tropicalis</i>    |
| 3  | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| 4  | <i>Aspergillus niger</i>     |
| 5  | <i>Candida rugosa</i>        |
| 6  | <i>Aspergillus flavus</i>    |
| 7  | <i>Candida parapsilosis</i>  |
| 8  | <i>Candida parapsilosis</i>  |
| 9  | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| 10 | <i>Candida albicans</i>      |
| 11 | <i>Aspergillus niger</i>     |
| 12 | <i>Aspergillus fumigatus</i> |
| 13 | <i>Candida albicans</i>      |
| 14 | <i>Candida albicans</i>      |
| 15 | <i>Candida albicans</i>      |
| 16 | <i>Candida albicans</i>      |
| 17 | <i>Candida albicans</i>      |
| 18 | <i>Candida albicans</i>      |
| 19 | <i>Candida albicans</i>      |
| 20 | <i>Candida albicans</i>      |
| 21 | <i>Candida albicans</i>      |
| 22 | <i>Candida albicans</i>      |
| 23 | <i>Candida albicans</i>      |
| 24 | <i>Candida albicans</i>      |
| 25 | <i>Candida albicans</i>      |
| 26 | <i>Candida albicans</i>      |
| 27 | <i>Candida albicans</i>      |
| 28 | <i>Candida albicans</i>      |
| 29 | <i>Candida albicans</i>      |
| 30 | <i>Candida albicans</i>      |
| 31 | <i>Candida albicans</i>      |
| 32 | <i>Candida albicans</i>      |
| 33 | <i>Candida albicans</i>      |
| 34 | <i>Candida albicans</i>      |
| 35 | <i>Candida albicans</i>      |
| 36 | <i>Candida albicans</i>      |
| 37 | <i>Candida albicans</i>      |
| 38 | <i>Candida albicans</i>      |
| 39 | <i>Candida albicans</i>      |
| 40 | <i>Candida albicans</i>      |

#### 4.1. Çeşitli Besiyerleri Aracılığı ile Siderofor Tanımlanması

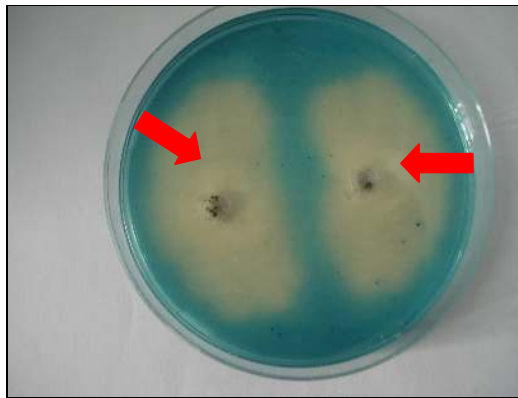
##### 4.1.1. CASAD Besiyeri ile Siderofor Tanımlama

Çalışma kapsamına alınan 2 *Candida* ve 4 *Aspergillus* suşu siderofor varlığının araştırılması için CASAD besiyerine pasajlanmıştır. (Tablo 4.2)

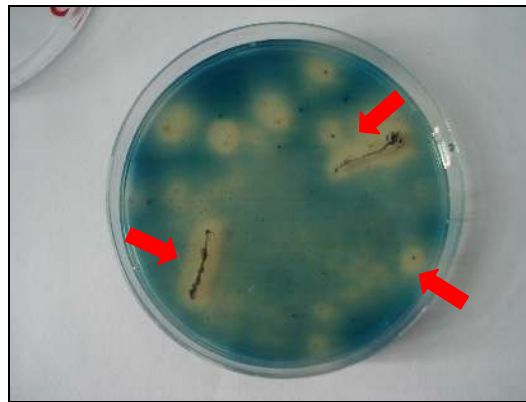
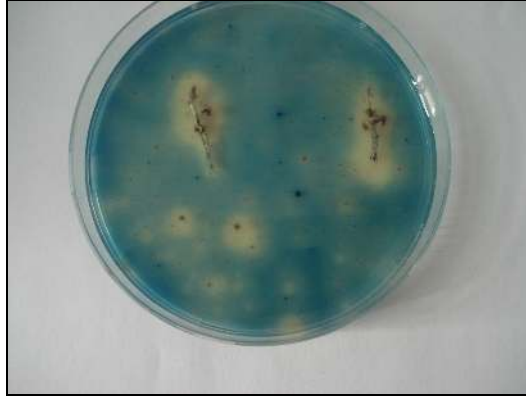
3 hafta kadar uzun bir inkübasyon süresinin ardından sadece 2 (%33.3) *Aspergillus* örneğinde pozitif sonuç gözlenmiştir. (Resim 4.1, 4.2)

Tablo 4.2 : CAS agar besiyerine ekimi yapılan 6 örneğin CAS reaksiyon sonuçları.

| No | Örnek                        | CAS Reaksiyonu |
|----|------------------------------|----------------|
| 1  | <i>Aspergillus flavus</i>    | Negatif (-)    |
| 2  | <i>Candida tropicalis</i>    | Negatif (-)    |
| 4  | <i>Aspergillus niger</i>     | Pozitif (+)    |
| 11 | <i>Aspergillus niger</i>     | Pozitif (+)    |
| 12 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | Negatif (-)    |
| 21 | <i>Candida albicans</i>      | Negatif (-)    |



**Resim 4.1: *Aspergillus niger*. CASAD besiyerinde pozitif sonuç.**



Resim 4.2: *Aspergillus niger*. CASAD besiyerinde pozitif sonuç.

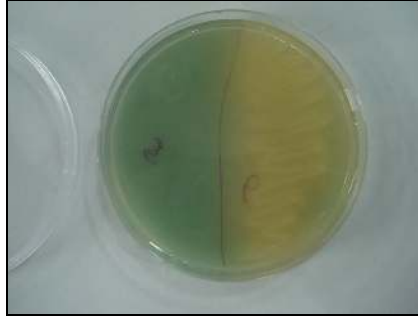
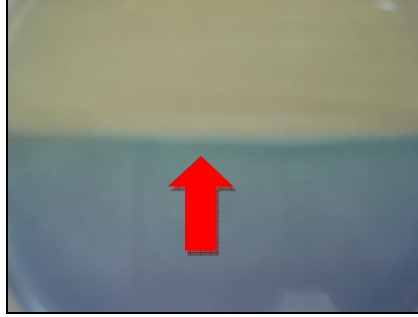
#### 4.1.2. CAS/ MEA Besiyeri ile Siderofor Tanımlama

SDA besiyerinde üreyen 5 örnek CAS /MEA besiyerine pasajlanmış, ancak hiçbir örnekte CAS reaksiyonu gözlemlenmemiştir. (Tablo 4.3)

Besiyerini kontrol etmek amacıyla, siderofor ürettiği bilinen *Pseudomonas* MEA besiyerine pasajlanmış ve inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde ( 24-48 saat) *Pseudomonas*' ın MEA besiyerinde ürettiği ve CAS agar besiyeri ile MEA besiyerinin temas noktasında hafif bir renk değişiminin meydana geldiği gözlemlenmiştir. (Resim 4.3)

**Tablo 4.3: CAS/ MEA besiyerine ekimi yapılan örneklerin CAS reaksiyon sonuçları.**

| No | Örnek   | Kültür-Mikroskopi         | CAS Reaksiyonu |
|----|---------|---------------------------|----------------|
| 1  | Kan     | <i>Aspergillus flavus</i> | Negatif (-)    |
| 2  | Kan     | <i>Candida tropicalis</i> | Negatif (-)    |
| 4  | Kan     | <i>Aspergillus niger</i>  | Negatif (-)    |
| 11 | BAL     | <i>Aspergillus niger</i>  | Negatif (-)    |
| 21 | BOS     | <i>Candida albicans</i>   | Negatif (-)    |
| -  | Kontrol | <i>Pseudomonas sp.</i>    | Zayıf pozitif  |



Resim 4.3: *Pseudomonas*'da CAS Reaksiyonu (Zayıf pozitif).

#### 4.1.3. O- CAS Besiyeri ile Siderofor Tanımlama

SDA besiyerinde üreyen tüm mantar suşlarının üzerine O-CAS besiyeri dökülmüştür. (Tablo 4.4)

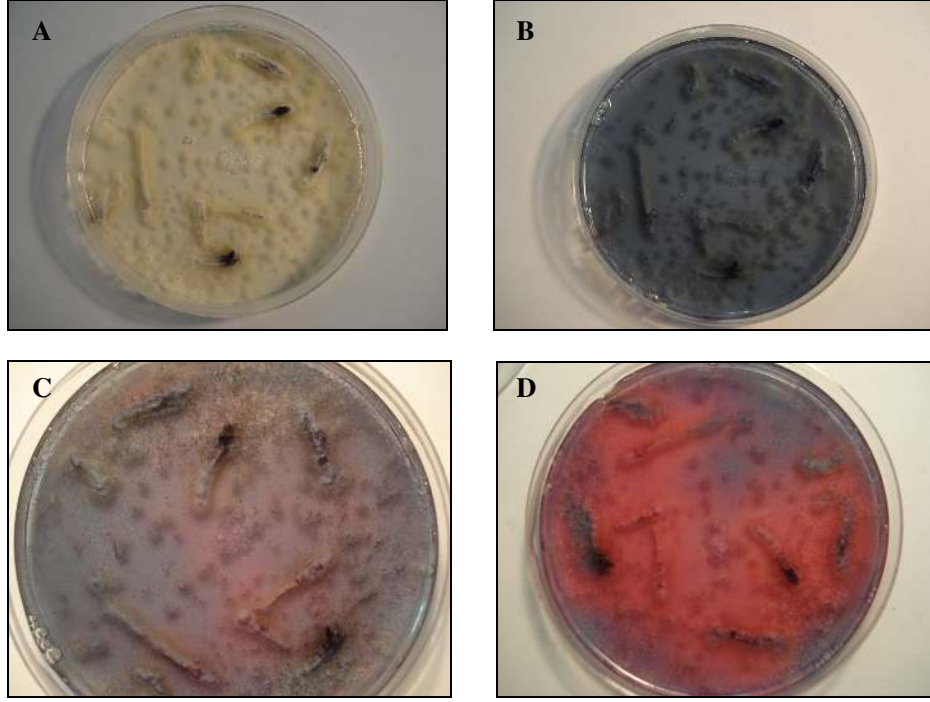
*Aspergillus fumigatus* (2 adet), *Aspergillus flavus* (2 adet), *C. tropicalis* (1 adet) , *C. rugosa* (1 adet) hariç diğer tüm suşlarda CAS reaksiyonu gözlemlenmiştir. (Resim 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10)

**Tablo 4.4: O-CAS besiyerinde CAS reaksiyonu sonuçları.**

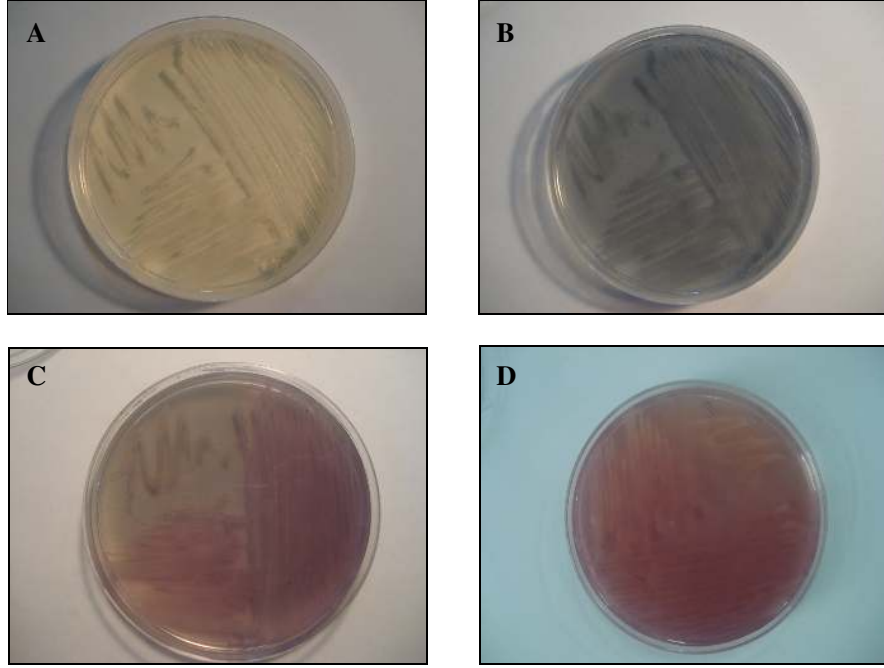
| No | Örnekler                     | CAS Reaksiyonu |
|----|------------------------------|----------------|
| 1  | <i>Aspergillus flavus</i>    | -              |
| 2  | <i>Candida tropicalis</i>    | +              |
| 3  | <i>Aspergillus fumigatus</i> | -              |
| 4  | <i>Aspergillus niger</i>     | +              |
| 5  | <i>Candida rugosa</i>        | +              |
| 6  | <i>Aspergillus flavus</i>    | -              |
| 7  | <i>Candida parapsilosis</i>  | +              |
| 8  | <i>Candida parapsilosis</i>  | +              |
| 9  | <i>Aspergillus fumigatus</i> | -              |
| 10 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 11 | <i>Aspergillus niger</i>     | +              |
| 12 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | -              |
| 13 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 14 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 15 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 16 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 17 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 18 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 19 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 20 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 21 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 22 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 23 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 24 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 25 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 26 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 27 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 28 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 29 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 30 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 31 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 32 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 33 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 34 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 35 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 36 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 37 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 38 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 39 | <i>Candida albicans</i>      | +              |
| 40 | <i>Candida albicans</i>      | +              |



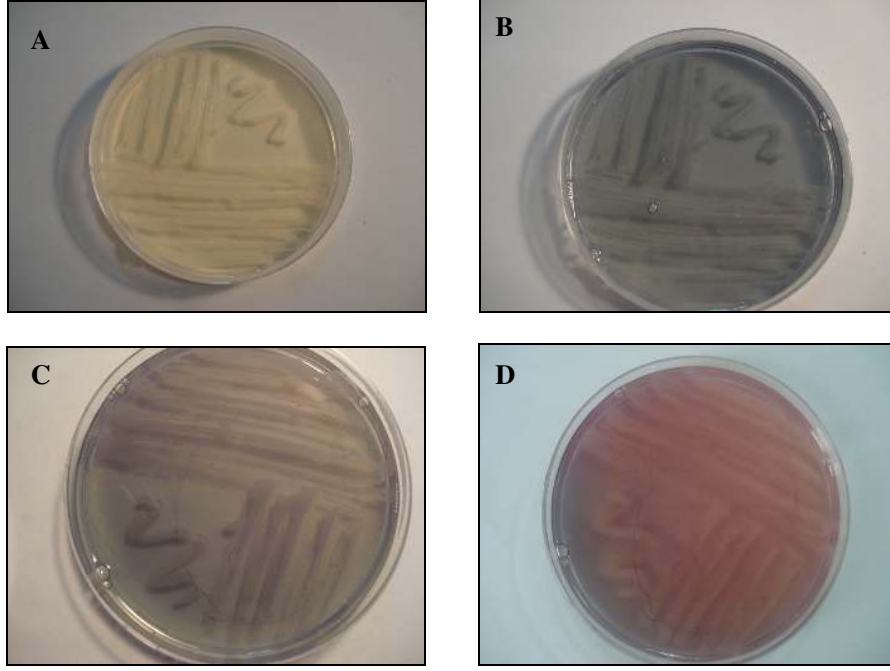
**Resim 4.4:** A. *Aspergillus niger*. B. Üremiş *Aspergillus niger* kolonilerinin üzerine O- CAS besiyeri döküldüğü an. C. Besiyeri döküldükten 15 dakika sonra meydana gelen CAS reaksiyonu. D. 24 saat oda sıcaklığında inkübasyondan sonra meydana gelen CAS reaksiyonu.



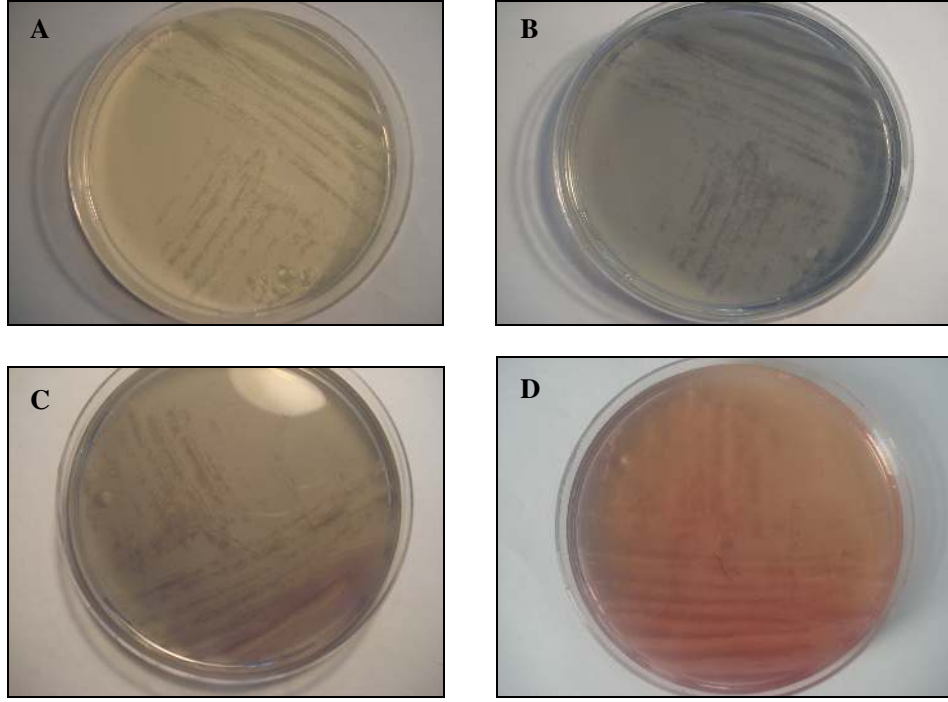
**Resim 4.5: A. *Aspergillus niger* B. Üremiş *Aspergillus niger* kolonilerinin üzerine O- CAS besiyeri döküldüğü an C. Besiyeri döküldükten 15 dakika sonra meydana gelen CAS reaksiyonu D. 24 saat oda sıcaklığında inkübasyondan sonra meydana gelen CAS reaksiyonu.**



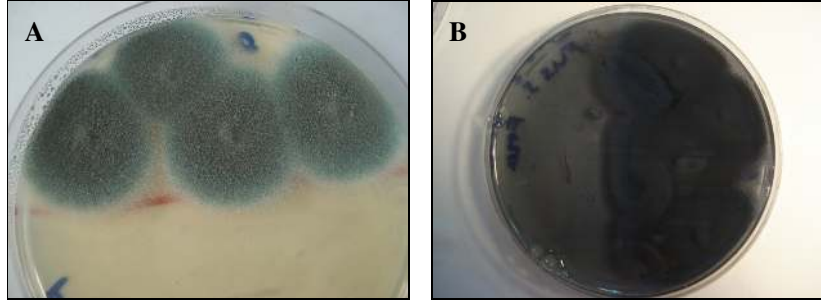
**Resim 4.6: A. *Candida albicans* B. Üremiş *Candida albicans* kolonilerinin üzerine O-CAS besiyeri döküldüğü an C. Besiyeri döküldükten 15 dakika sonra meydana gelen CAS reaksiyonu D. 24 saat oda sıcaklığında inkübasyondan sonra meydana gelen CAS reaksiyonu.**



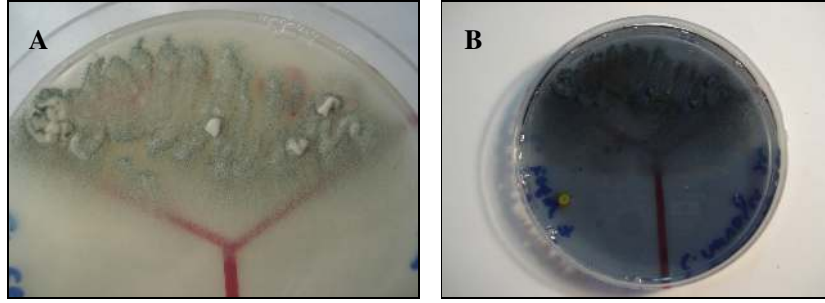
**Resim 4.7: A. *Candida albicans* ATCC 90128 B. Üremiş *Candida albicans* kolonilerinin üzerine O- CAS besiyeri döküldüğü an C. Besiyeri döküldükten 15 dakika sonra meydana gelen CAS reaksiyonu D. 24 saat oda sıcaklığında inkübasyondan sonra meydana gelen CAS reaksiyonu.**



**Resim 4.8: A. *C. albicans* B. Üremiş *Candida albicans* kolonilerinin üzerine O-CAS besiyeri döküldüğü an C. Besiyeri döküldükten 15 dakika sonra meydana gelen CAS reaksiyonu D. 24 saat oda sıcaklığında inkübasyondan sonra meydana gelen CAS reaksiyonu.**



Resim 4.9: *Aspergillus fumigatus*. CAS Reaksiyonu negatif.



Resim 4.10: *Aspergillus flavus*. CAS Reaksiyonu negatif.

## 4.2. Moleküler Yöntemlerle Siderofor Tanımlanması

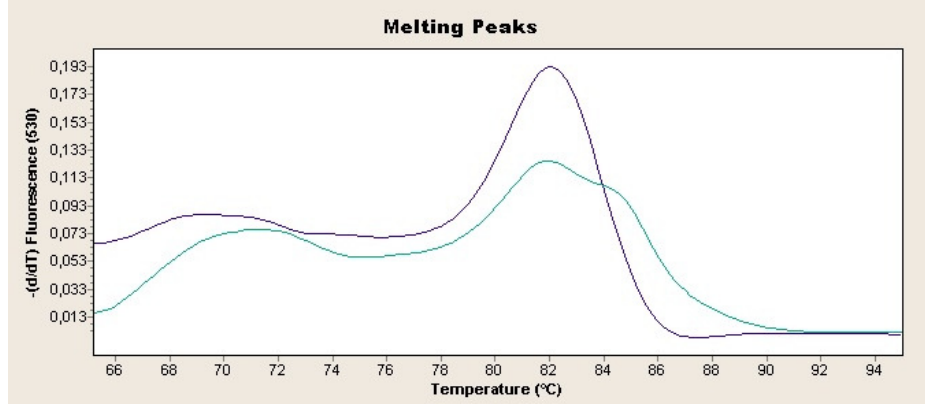
### 4.2.1. Nanodrop ile RNA Miktarı Ölçümü

Ticari kit ile RNA izolasyonu yapılan örneklerdeki RNA miktarı NanoDrop cihazı (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Bu aşama Real Time PCR' ın kantitasyonu için gerekliydi ve oldukça büyük önem arz etmekteydi. (Tablo 4.5)

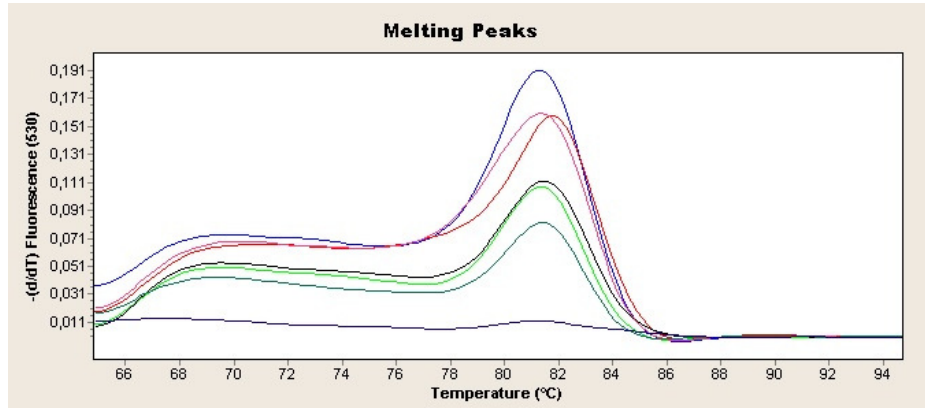
**Tablo 4.5: Moleküler incelemeye tabi tutulan örneklerin RNA miktarı.**

| No | Örnekler                      | RNA miktarı |
|----|-------------------------------|-------------|
| 1  | <i>Candida albicans</i>       | 11.2 ng/ µl |
| 2  | <i>Candida albicans</i>       | 10.3 ng/ µl |
| 3  | <i>Candida tropicalis</i>     | 12.4 ng/ µl |
| 4  | <i>Candida albicans</i>       | 15.7 ng/ µl |
| 5  | <i>Candida albicans</i>       | 11.3 ng/ µl |
| 6  | <i>Candida albicans</i>       | 11.4 ng/ µl |
| 8  | <i>Aspergillus niger</i>      | 11.7 ng/ µl |
| 10 | <i>Candida albicans</i>       | 10.4 ng/ µl |
| 11 | <i>Candida albicans</i>       | 12.9 ng/ µl |
| 15 | <i>Candida albicans</i> 90128 | 15.2 ng/ µl |
| 16 | <i>Candida albicans</i>       | 45.9 ng/ µl |
| 17 | <i>Candida albicans</i>       | 12.8 ng/ µl |
| 18 | <i>Candida albicans</i>       | 15.0 ng/ µl |
| 19 | <i>Candida albicans</i>       | 18.5 ng/ µl |

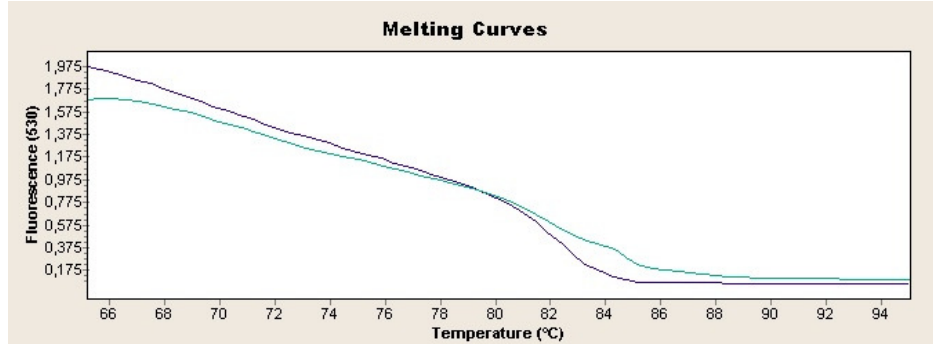
#### 4.2.2. Real Time PCR Sonuçları



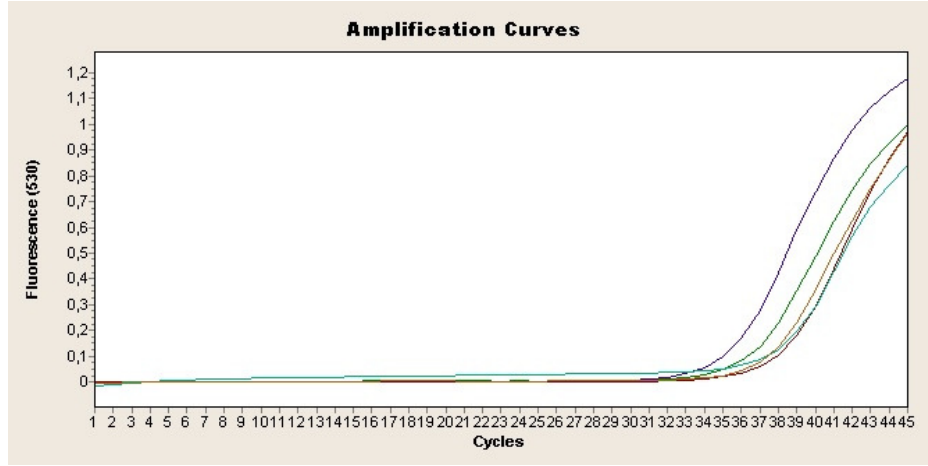
Grafik 4.1: İki farklı *Candida* örneğinin erime zirve noktaları.



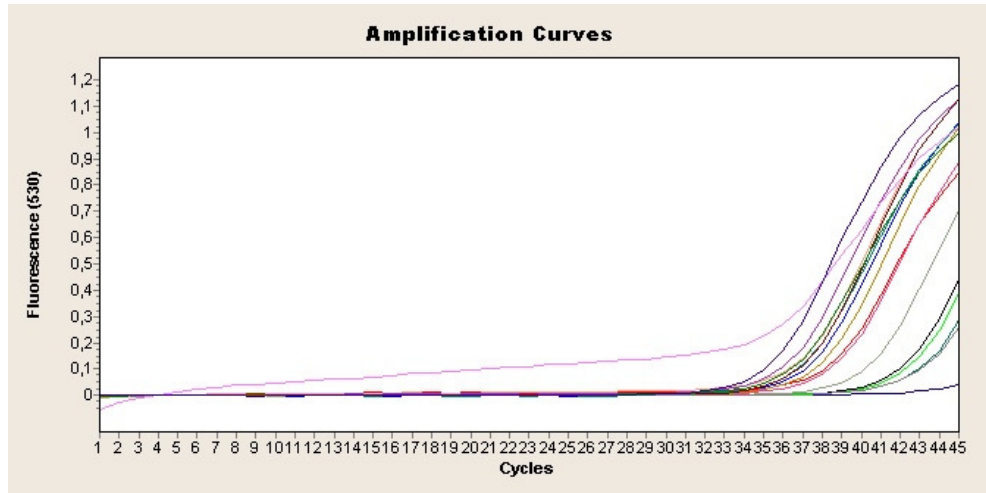
Grafik 4.2: Bazı *Candida* örneklerinin erime zirve noktaları. Düz çizgi: Negatif kontrol.



Grafik 4.3: İki farklı *Candida* örneğinin erime eğrileri.



Grafik 4.4: Bazı *Candida* örneklerinin amplifikasyon eğrileri.



Grafik 4.5: Real-Time PCR- SYBR Green reaksiyonunda tüm *Candida* örneklerinin amplifikasyon eğrileri.

#### 4.2.3. Kantitasyon Sonuçları

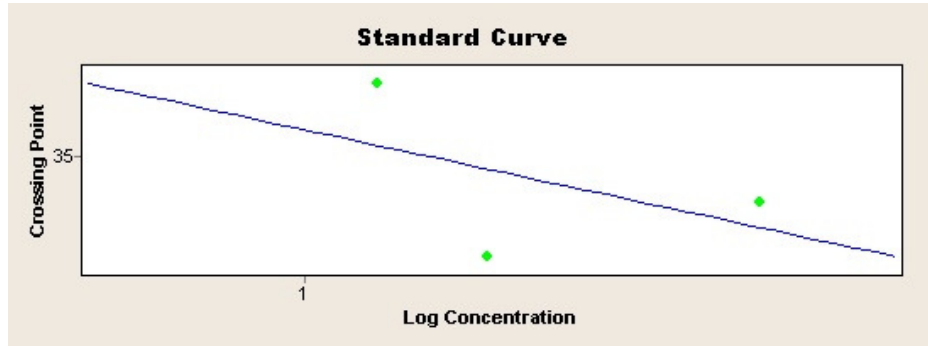
**Tablo 4.6: *Candida* kantitasyon sonuçları**

| Örnek | RNA miktarı | CP    | Konsantrasyon | Standard    |
|-------|-------------|-------|---------------|-------------|
| 1     | 11.2 ng/ µl | 36.2  | [ 1.23 E0 ]   | -           |
| 2     | 10.3 ng/ µl | >40   | [ 1.92 E-4 ]  | St. 1.03 E1 |
| 3     | 12.4 ng/ µl | 37.19 | [ 1.08 E-1 ]  | -           |
| 4     | 15.7 ng/ µl | >40   | [ <1.92 E-4]  | -           |
| 5     | 11.3 ng/ µl | 37.53 | [ 5.06 E-2 ]  | -           |
| 6     | 11.4 ng/ µl | >40   | < 1.92 E-4    | St. 1.14 E1 |
| 8     | 11.2 ng/ µl | >40   | [ <1.92 E-4 ] | -           |
| 10    | 10.4 ng/ µl | 35.85 | [ 2.26 E0 ]   | -           |
| 11    | 12.9 ng/ µl | 35.16 | 1.06 E1       | -           |
| 15    | 15.2 ng/ µl | >40   | < 1.92 E-4    | St. 1.52 E1 |
| 16    | 45.9 ng/ µl | 34.69 | 3.10 E1       | St. 4.59 E1 |
| 17    | 12.8 ng/ µl | 35.51 | 4.86 E0       | St. 1.28 E1 |
| 18    | 15.0 ng/ µl | 34.31 | 7.21 E1       | St. 1.85 E1 |
| 19    | 18.5 ng/ µl | 36.84 | [ 1.33 E-1 ]  | -           |

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda;

$$\text{St. } 1.03 \text{ E1} < \text{St. } 1.14 \text{ E1} < \text{St. } 1.28 \text{ E1} < \text{St. } 1.52 \text{ E1} \\ < \text{St. } 1.85 \text{ E1} < \text{St. } 4.59 \text{ E1}$$

olarak bulunmuş ve bu değerler doğrultusunda standart eğri elde edilmiştir.



Grafik 4.6: Kantitasyonda yararlanılan standart eğri.

## 5. TARTIŞMA

*C. albicans* mukozal yüzeylerde kommensal olarak yaşayan, ancak zayıf bağışıklık durumunda konak için invazif ve patojen hale gelebilen ve ölümcül sistemik enfeksiyonlara sebep olan bir mantardır. Tedavide yaygın olarak kullanılan antifungal ajanlara karşı direnç her geçen gün arttığından, *C. albicans* klinikte, AIDS hastaları ve granülositopenik hastalar için büyük bir problem teşkil etmektedir.<sup>41,42</sup>

*C. albicans* hastane kaynaklı enfeksiyonların da önemli bir ajanı olarak farkedilmiştir. İntravasküler kateterler gibi, mikroorganizmaların yapışkan bir biyofilm oluşturabileceği yüzeyler risk faktörleri olarak görülmekte ve sıklıkla bu enfeksiyonlarla ilişkili bulunmaktadır.<sup>31,42,43</sup>

Virülansı değiştiren konak- patojen ilişkileri, kritik bir besin olan demir tarafından etkilenmektedir. Demir çoğu konak hücre yaralanmasını indükleyen kritik bir metaldir. İntravasküler enfeksiyonu destekleyen demir kaynakları ve fungal demir alım sistemleri iyice tanımlanamamış olsa dahi, demir alımının *C. albicans'* in virülan enfeksiyonlar meydana getirmesinde özel bir role sahip olduğu düşünülmektedir.<sup>43,44</sup>

Dimorfik bir mantar olan *C. albicans'* in morfolojik değişim geçirme yetisi virülans için gereklidir. Hatta *C. albicans'* in filamentöz formunun, mukozal yüzeylere tutunmada ve makrofajlardan kaçmada rolü olduğu düşünülmektedir. *C. albicans'* da demir taşınmasında aracılık yapan proteinler, anti- Candida terapilerinin potensiyel hedefi olduğundan dolayı konağın demire sahip olması da konak-patojen ilişkisinde ve mantarın virülansında kritik bir öneme sahiptir. Bu sebeplerden dolayı *C.*

*albicans*' ın demiri ne şekilde elde ettiğinin anlaşılması tıbbi açıdan önem arz etmektedir.<sup>41</sup>

Fratti ve arkadaşları yaptıkları bir çalışma ile *C. albicans*'ın neden olduğu hücre yaralanmasında, demirin rolünü incelemek için fenantrolin ve deferoksamin gibi demir şelatörlerinin endotelial hücre yaralanmasındaki rollerini araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonunda, hücrelere fenantrolin ve deferoksamin gibi demir şelatörler ile önceden muamele edilmesinin, hücreleri kandidal yaralanmadan koruduğu belirlenmiştir.<sup>44</sup>

Ayrıca Heymann ve arkadaşları *C. albicans*'ın siderofor demir taşıyıcıları üzerinde yaptıkları bir çalışmada SIT1 mutant suşlar inşa ederek *C. albicans*' ın Sit1p/ Arn1p siderofor demir taşıyıcısının virülansını ve demir komplekslerini kullanabilme yeteneklerini test etmişlerdir. Sonuç olarak Sit1 mutant suşların ferrikrom tip sideroforları almada kusurlu olduğu, dolayısı ile Sit1p/ Arn1p ile siderofor alımının epitelyal invazyon ve penetrasyon gibi *C. albicans* infeksiyonunun belirli bir aşamasında gerekli olduğu ifade edilmiştir.<sup>45</sup>

Patojenik mantarlar tarafından siderofor üretildiği ilk kez *Histoplasma capsulatum*' da yapılan çalışmalarla farkedilmiştir. Günümüzde ise patojenik mantarlar tarafından demirin elde edilmesi patogenezin esası haline gelmiştir. Demir mekanizmaları üzerinde yapılan çalışmalar merkezi bir önem arz etmektedir çünkü; bu metal konakta çok ciddi kısıtlamalara neden olabilmektedir. Ayrıca yeni terapötik ajanların keşfedilmesine yön vermesi açısından da patojenik mantarlar tarafından demirin elde edilmesi ve taşınması ayrı bir önem arz etmektedir.<sup>27,46</sup>

Demir, laktobasilluslar hariç tüm canlı formlar için esansiyel elementtir. Evrim sürecinde oksijen konsantrasyonunun artmasına paralel olarak çözünmez ferrik demir içerisindeki çözünür ferrozun oksidasyonuna bağlı olarak mikroorganizmalar azalan demire karşı cevap vermek zorunda bırakılmış ve siderofor olarak bilinen özel mikrobiyal  $Fe^{III}$ -şelate edici ajanlar üretmek durumunda kalmışlardır. Sideroforların sentezi demir tarafından baskılanmaktadır ancak, inhibisyon için gerekli demirin konsantrasyonu, üretilen sideroforun tipine ve sideroforu üreten organizmaya bağlıdır.<sup>47</sup>

Mantarlar ile aerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler tarafından üretildiği bilinen yaklaşık 500 farklı siderofor varlığı bilinmektedir.<sup>47</sup>

Simon ve arkadaşları 12 *C. albicans* suşunu düşük miktarda demir (0.026-0.8  $\mu M$ ) içeren besiyerinde üretmişler ve tüm suşların hidroksamat tip siderofor salgıladığını, fenolat tip siderofor sentezlenmediğini tesbit etmişlerdir. *C. albicans* tarafından siderofor sentezinin, 0.026- 0.2  $\mu M$  demir konsantrasyonunda en fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç; düşük konsantrasyonda demir varlığında siderofor sentezinin teşvik edildiğini, yüksek konsantrasyonlarda ise baskılandığını ve siderofor üretiminin, üremeyi inhibe etmeyecek kadar düşük demir konsantrasyonunda ( 0.2  $\mu M$ ) en fazla olduğu kanıtlamıştır.<sup>48</sup>

Askomiçetlerden *A. nidulans* ve *A. fumigatus* siderofor üreten tipik mantarlardandır. Eisendle ve arkadaşları *A. nidulans* üzerinde yaptıkları bir çalışma ile *A. nidulans*' ın demir depolayan bileşik olan ferritinden yoksun olduğunu ancak bunun yerine hücre içi siderofor olan ferrikrosine sahip olduğunu ortaya koymuşlar ve ferrikrosinin *A. nidulans*'

in demir depolamasının yanı sıra oksidatif strese karşı direncinde, çimlenmesinde ve seksüel gelişiminde rol oynadığını belirtmişlerdir.<sup>49</sup>

Baakza ve arkadaşları denizden ve karadan izole edilen 10' ar mantar türü olmak üzere toplam 20 mantar izolatu üzerinde siderofor üretme potansiyellerini araştırmışlar ve karşılaştırmışlardır. Sonuçlar ise denizden izole edilen *A. flavus* hariç diğer tüm izolatların siderofor ürettiğini, üretilen sideroforların tümünün hidroksamat tip siderofor olduğunu, sadece *Mucor*' ların karboksilat tip siderofor ürettiğini, hiçbir izolatu katekol tip siderofor üretmediğini, dolayısı ile sideroforların kimyasal doğasının habitata bağlı olmadığını ortaya koymuştur.<sup>50</sup>

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar mantığa çok yatkın sonuçlar olarak değerlendirilmiştir çünkü; mantarların hidroksamat tip siderofor ürettiği, katekol tip siderofor üretmediği Winkelmann tarafından *Ustilago sphaerogena* üzerinde yapılan çalışmadan elde edilen ilk rapordan günümüze kadar bu görüş savunulmaktadır.<sup>50</sup>

Holzberg ve Artis yapmış oldukları çalışmada fırsatçı ve sistemik fungal patojenler tarafından hidroksamat tip siderofor üretimini araştırmışlardır. Çalışmaya *Absidia corymbifera*, *A. niger*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, *Blastomyces dermatitidis*, *H. capsulatum*, *Sporothrix schenickii*, *C. albicans* ve *Trichophyton mentagrophytes* dahil edilmiştir. Mantarlar hem 27°C de hem de 37°C de kültüre edilmiştir. Çalışmanın sonuçları; tüm mantarların siderofor ürettiğini ve bunların tümünün hidroksamat tip sideroforlar olduğunu, 27°C de 37°C den daha çok siderofor üretildiğini ortaya koymuştur. Bu çalışma ile birlikte siderofor ürettiği bilinen mantarlar listesine 8 yeni mantar daha eklenmiştir.<sup>51</sup>

İsmail ve arkadaşları bazı *C. albicans* suşlarında hidroksamat ve fenolat tip siderofor üretimini kanıtlamak için bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada *C. albicans* suşları 37 °C de kültüre edilmiştir. Sonuç olarak tüm *C. albicans* suşlarının hidroksamat tip siderofor ürettiği ancak bu suşların % 40' ının aynı anda fenolat tip sideroforlar da salgıladığı rapor edilmiştir. Bu çalışma patojenik bir maya olan *C. albicans* tarafından her iki tip siderofor sınıfının da üretildiğini gösteren ilk çalışmadır.<sup>46</sup>

Schretti ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada *A. fumigatus*' un fusarinin C ve triasetilfusarinin C salgılayarak hücre dışı demiri aldığı ve hifal demir depolanması için de ferrikrosini kullandığını belirtmişlerdir.<sup>52</sup>

Schretti ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada ise hücre içi ve hücre dışı siderofor sentezini incelemişler ve *A.fumigatus*' un hidroferrikrosin adında, konidyal demir depolanmasından sorumlu dördüncü sideroforu salgıladığını ortaya çıkarmışlardır.<sup>52</sup>

İki askomiçet; *A. nidulans* ve *N. crassa* farklı hücre dışı siderofor salgılasalar da ferrikrosin adı verilen aynı tip hücresel siderofora sahiptirler. Ferrikrosin tarafından demir depolanmasının *A. nidulans* 'ın konidya oluşturmada kritik rol oynadığı gözlemlenmiştir. Çünkü hücresel siderofor sistemindeki eksiklik, konidya üretimindeki verimin azalması ile sonuçlanmaktadır. Çimlenme ve büyümenin ardından ferrikrosin demir havuzunun yok olması, bu metalin çimlenme sırasında kullanıldığını işaret etmektedir.<sup>30</sup>

Buna bağlı olarak *A. nidulans*, *N. crassa* ve *Penicillium chrysogenum* da konidyal siderofor depolanmasının önemli bir çimlenme faktörü olduğu söylenebilir. Çünkü yüksek tuz konsantrasyonu ile müdahale edilen,

hücrel sideroforlarını yitiren konidiyaların çimlenmesinin ortadan kalktığı veya uygun bir siderofor tedarik edilene kadar çimlenme ertelendiği gözlemlenmiştir.<sup>30</sup>

Virülan mikroorganizmalar tarafından üretilen sideroforların patogenezdaki önemini kanıtlamak için, öncelikle sideroforların *in vivo* sentezlenip sentezlenmediğinin ortaya çıkarılması gerekmektedir.<sup>53</sup>

Siderofor varlığını ortaya çıkarmak amacıyla, kimyasal ve biyolojik özellikleri esas alınarak birçok test geliştirilmiştir. Çoğu test universal CAS agar testini esas almaktaydı.<sup>54</sup>

Universal CAS agar metodu ( Schwyn ve Neilands, 1997) iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan bir siderofor tanımlama metodudur. Bu metod ile kimyasal olarak tanımlanmış besiyerindeki total sideroforlar belirlenebilmektedir. Fakat siderofor üretiminin miktarını belirlemek mümkün değildir ve bu besiyerinin bazı içerikleri doğal antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Bir deterjan olan HDTMA' nın bazı bakteri ve mantarlar için toksik olduğu kanıtlanmıştır. Yüksek toksisite, bu besiyerinin Gram pozitif bakteriler ve bazı mantarlar tarafından kullanılmasını önlemektedir.<sup>39,40,53,55</sup>

Bu çalışma kapsamında bulunan örnekleri CAS agar plaklarına pasajladığımız zaman, mikroorganizmalar bu besiyerinde ürememiştir. Gerek besiyeri içeriğinde bulunan, üremeyi inhibe eden toksik maddelerin varlığından, gerekse uzun inkübasyon süresinden dolayı bu yöntem başarılı bulunmamıştır.

Schwyn ve Neilands 1997 yılında yaptıkları bir çalışma ile HDTMA nın bazı mikroorganizmalar için toksik olduğunu farketmişler ve bu

toksik etkiyi ortadan kaldırmak için bazı fikirler geliştirmişlerdir. Önerileri arasında fazla HDTMA yı emici resin ile nötralize etmek, gelişmekte olan hücrelerden bu bileşiği ayırmak için prosedürler oluşturmak veya mikrobiyal gelişim için daha az toksik etki yapacak yeni bir madde kullanmak gibi fikirler yer almaktaydı.<sup>39</sup>

Fekete ve arkadaşları 1989 yılında yaptıkları bir çalışmada bu önerileri dikkate alarak, universal CAS agar besiyerine resin gibi emici maddeler ekleyerek, HDTMA nın toksisitesini azaltmaya çalışmışlardır.<sup>56</sup>

Bunun üzerine Milagres ve arkadaşları 1999 yılında bir çalışma yürütmüşler ve bu çalışmada universal CAS agar testi üzerinde bir değişiklik yaparak toksisiteyi ortadan kaldırmayı denemişlerdir. CAS boyası içerisinde bulunan HDTMA nın, gelişen mikroorganizmalar üzerine toksik etkisini yok etmek amacıyla, yarısında MEA/ NA, diğer yarısında ise CAS mavi agar bulunan plaklar oluşturmuşlardır. Çalışmada bakterilerin yanı sıra bazidiyomisetler, askomisetler, deuteromisetler ve zigomisetler olmak üzere birçok mantar suşu da test edilmiştir. Mikroorganizmaları MEA/ NA kısmına ekerek, gelişen hücrelerin CAS ayırıcı ile temasını engellemişlerdir. Sonuç olarak mikroorganizmaların hiçbirinde büyüme inhibisyonu gözlemlenmemiştir.<sup>39</sup>

Ancak Milagres ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu metod da tarafımızdan denenmiş ancak, 3 hafta kadar uzun bir inkübasyon süresinin ardından sonuç verdiğinden ve tıpkı CAS agar plakları gibi siderofor varlığını belirlediğinden, fakat siderofor üretim miktarı hakkında bir veri sunmadığından tercih edilmemiştir.

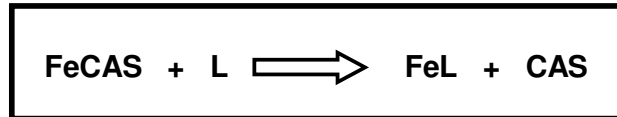
Öte yandan Machuca ve Milagres 2002 yılında yayınladıkları bir çalışmada modifiye olmuş CAS agar plaklarını kullanarak çeşitli değişkenlerin

*Aspergillus* tarafından siderofor üretimi üzerine olan etkilerini ve CAS agar plak testini kantitatif bir metod olarak değerlendirmenin mümkün olup olmadığını araştırmışlardır. Tıpkı bir önceki çalışmada olduğu gibi plakların yarısına MEA diğer yarısına ise CAS agar konulmuştur. Diğer çalışmadan farklı olarak örnekler 28°C ' de 6 gün inkübe edilmiştir. Sonuç olarak inokulum tipinin, demir konsantrasyonunun ve besiyerinin pH' sının *Aspergillus* tarafından siderofor üretimine etkisini değerlendirmek mümkün olmuştur.<sup>40</sup>

Zaman biraz olsun kısalmış olsa da, *A. niger* gibi iyi bir sitrik ve oksalik asit üreticisi olan bazı türler, bu besiyerinde fazla miktarda demir bulunduğu zaman CAS ile reaksiyon verebildiğinden çok tercih edilen bir metod değildir.<sup>40</sup>

Bu iki metoda zıt olarak, Smith ve arkadaşları 1985 yılında CAS sıvı testini geliştirmişlerdir. Bu test hem duyarlılığı yüksek olduğu hem de miktar belirleyebildiği için geniş ölçüde kullanılan bir test olmuştur. Bu test, sideroforları kimyasal yapılarına bakmaksızın ölçmek için geliştirilmiştir. Ayrıca testin, iyi tanımlanmış fenolat ve hidroksamat tip sideroforların yanı sıra rhizobaktin gibi yapısı henüz yeni açıklanmış diğer sideroforların da miktarını ölçebildiği rapor edilmiştir.<sup>57</sup>

Sıvı bir faz içerisinde bulunan demir şelate edici sideroforları ölçmek için kullanılan CAS sıvı testinin prensibi şu şekilde özetlenebilir:



Güçlü bir ligand (L) olan siderofor, demir-CAS (FeCAS) kompleksine bağlandıktan sonra, demir-ligand ( FeL) kompleksi oluşuyor ve serbest CAS renk değişimini ( turuncu/ sarı) meydana getirmek için salıveriliyor.<sup>53</sup>

CAS sıvı testi, FeCAS kompleksinden demiri şelate eden herhangi bir tip sideroforun üretim miktarını ölçebilmektedir. Ancak bu testin kompleks besiyerlerinde üretilen sideroforları ölçmede bazı doğal problemleri olduğu belirtilmiştir. Dolayısı ile sadece kimyasal yapısı belirlenmiş sıvı besiyerlerindeki siderofor miktarını ölçebilmektedir. En bilinen problem ise kompleks besiyerinin sarı renk veren içerikleridir çünkü; bu sarı renk CAS reaksiyonu sonucu oluşan turuncu/ sarı renklerle karıştırılabilmektedir.<sup>53</sup>

CAS sıvı testi ölçümü yapılan sıvıların pH sıندان da şiddetli bir şekilde etkilenmektedir. pH 7' nin üzerine çıktığı zaman demir hidroksit oluşmakta ve normalde mavi olan besiyerinin rengi sarıya dönmektedir. Bu aşamada ise oluşan demir hidroksiti, demirden yoksun serbest CAS' dan ayırt etmek mümkün olmamaktadır.<sup>53</sup>

Ayrıca bu testte, kompleks besiyerindeki fosfat, sitrat veya dihidrobenzoik asit gibi düşük ilgili demir şelatörleri de CAS reaksiyonu ile karıştırılabilmektedir. Dolayısı ile bu problemi ortadan kaldırmak için, siderofor aranan besiyerinde fosfat tamponu yerine Tris veya Pipes kullanılmakta ve çoğu araştırmacı da incelemelerinde kompleks bir besiyeri yerine, kimyasal olarak tanımlanmış besiyerlerini tercih etmektedirler.<sup>53</sup>

CAS sıvı besiyeri, sadece kimyasal yapısı belirlenmiş sıvı besiyerlerindeki siderofor miktarını ölçebildiği, ölçümü yapılan sıvıların pH sıندان da

şiddetli bir şekilde etkilenebildiği ve kompleks besiyerindeki fosfat, sitrat veya dihidrobenzoik asit gibi düşük ilgili demir şelatörleri de CAS reaksiyonu ile karıştırılabildiği için tercih edilmemiş ve bu çalışma kapsamında denenmemiştir.

CAS sıvı besiyerindeki birtakım problemlerden dolayı, Shin ve arkadaşları 2000 yılında universal CAS agar testinde birtakım değişiklikler yaparak yeni bir metod geliştirmişler ve bu metodla çeşitli biyolojik sıvılardaki siderofor miktarını ölçmeyi amaçlamışlardır. CASAD (CAS agar difüzyon) testi adını verdikleri bu test iki prensibe dayandırılarak ortaya çıkarılmıştır. Esas alınan prensibler ise şunlardır :

1. Universal CAS agar deneyinde, CAS' a bağlanan demirin sideroforlar tarafından kolayca şelate edilmesi ve maviden turuncuya doğru olan renk değişimi esas alınmıştır.
2. Barry' nin 1991 yılındaki antimikrobiyal difüzyon deneyi de esas alınarak besiyerine açılan kuyucuklar içerisine yerleştirilen sıvılardaki sideroforların merkezden başlayarak radyal bir şekilde meydana getirdiği renk değişimi incelenmiştir.

Bu araştırmacılar geliştirdikleri bu metodu, siderofor üreten suşları göstermede ve total siderofor miktarını ölçmede güvenilir bir metod olarak tavsiye etmektedirler. CAS sıvı testindeki problemlere yer vermediğinden ve CAS sıvı besiyerinin aksine doku sıvıları da dahil olmak üzere birçok biyolojik sıvıdaki sideroforları ölçebilmesi açısından, CASAD besiyeri daha kullanışlı bir metoddur. Ancak bu besiyeri sadece boş sideroforları ölçebilmektedir çünkü; boş sideroforlar FeCAS kompleksinden demiri şelate edebilmektedir.<sup>53</sup>

Hem demir bağılı hem de boş sideroforları ölçmek için ise Arnow testi ve Csaky testleri geliştirilmiştir.<sup>58,59</sup>

Bazı küçük problemlere rağmen biyolojik sıvıları kullanarak *in vivo* veya *in vitro* siderofor üretimini inceleme açısından güzel bir yöntem olduğundan dolayı ve herhangi bir biyolojik sıvı içerisindeki herhangi bir tip siderofor miktarını kantitatif olarak belirleyebildiği için yaygın olarak kullanılan bir metoddur.<sup>53</sup>

Araştırmacılar bu metodu başarılı bir metod olarak değerlendirseler de, bu çalışma kapsamında denenen bu metod, haftalar süren uzun bir inkübasyon süresinin ardından sonuç verdiğinden dolayı ve biyolojik sıvı içerisindeki mantar konsantrasyonu ile yakın ilişkili olduğundan dolayı çok başarılı bulunmamıştır.

Miranda ve arkadaşları 2007 yılında gerçekleştirdikleri bir çalışma ile popüler CAS testini tekrardan düzenlemişler ve yeni, hızlı, toksik olmayan ve kolay bir metod geliştirmişler ve bu metodu O- CAS (Overlay CAS) metodu olarak adlandırmışlardır.<sup>54</sup>

O- CAS metodu diğer tüm metodlardan farklı olarak 15 dakika içerisinde sonuç veren bir metoddur. Bu test doğrultusunda 15 dakika içerisinde üste dökülen mavi O-CAS agarın mavi renginin menekşeye dönüşmesi kateşol tip siderofor varlığını, maviden turuncuya dönüşmesi ise hidroksamat tip siderofor varlığını temsil etmektedir.<sup>54</sup>

Çalışma kapsamında denenen metodlar arasından en başarılı sonuçların elde edildiği metod O-CAS metodu olmuştur. Çalışma kapsamına dahil edilen *C. albicans* suşlarının hemen hemen hepsinde hidroksamat tip siderofor varlığı gözlemlenirken; *A. flavus*, *A. fumigatus* ve

*A.niger* suşları arasından sadece *A. niger*' de siderofor varlığı tesbit edilmiş ve renk değişimi incelenerek *A. niger* tarafından kateşol tip siderofor sentezlendiği sonucuna varılmıştır.

O- CAS testi diğer testlere kıyasla, basit olması ve kısa sürede sonuç vermesi, bir reaktif ya da pH' dan dolayı herhangi bir inhibisyonun gözlemlenmemiş olması, reaksiyonun ardından mikroorganizmaların tekrardan kullanılabilmesi gibi birtakım avantajlara sahip olduğundan dolayı, bu metod siderofor üreten mikroorganizmaların izolasyon ve tesbitlerinde güçlü bir ilk aşama haline gelebilir.<sup>54</sup>

Bu çalışmada konvansiyonel yöntemlerin yanı sıra, seçilen bazı *Candida albicans* suşlarında Real-Time PCR yöntemiyle, siderofor kodlayan genler araştırılmıştır. TaqMan® Probe yöntemine kıyasla, ekonomik oluşu ve kısa sürede sonuç vermesinden dolayı SYBR Green yöntemi tercih edilmiştir. Real-Time PCR- SYBR Green yöntemiyle elde edilen sonuçlar, konvansiyonel yöntemlerle elde edilen sonuçlarla benzer bulunmuştur.

Bu çalışmanın sonucuna göre; St. 1.03 E1< St. 1.14 E1< St. 1.28 E1< St. 1.52 E1< St. 1.85 E1< St. 4.59 E1 olarak bulunmuştur. CaSIT1 primerleri (forward ve reverse) kullanıldığı için *C. tropicalis* ve *A. niger* kontrol amaçlı kullanılmış ve reaksiyon sonucunda beklenen şekilde bu iki örnekten sonuç eldelememiştir.

Literatürde yapılan araştırmada, daha önce böyle bir çalışmanın yapıldığına dair bir bilgiye ulaşılamadığından sonuçlar diğer çalışmalarla karşılaştırılamamıştır. Ancak birtakım çalışmalarda ALS, SAP gibi fungal genlerin de Real-Time RT PCR ile incelendiği bilinmektedir.<sup>60</sup>

## 6. SONUÇLAR

1. Bu çalışma, çeşitli mantar suşlarında siderofor varlığını araştırmayı amaçlayan bir çalışmaydı. Çalışma, çeşitli besiyerleri ile siderofor varlığının araştırılması ve moleküler yöntemlerle siderofor varlığının araştırılması olmak üzere esas olarak iki kısımdan oluşmaktaydı.
2. Çalışmanın ilk aşaması olan, çeşitli besiyerleri ile siderofor varlığının saptanması aşamasına, 40 mantar suşu ve 5 referans suş olmak üzere toplam 45 örnek dahil edilmiştir.
3. Çalışma kapsamındaki 40 mantar suşundan 7'si ( %17.5) *Aspergillus*, 33'ü (%82.5) ise *Candida*' ydı.
4. CASAD besiyeri ile siderofor tanımlanması aşamasına 6 (%15) örnek dahil edilmiş ve bunlardan sadece 2' sinde (%33.3) pozitif sonuç elde edilmiştir.
5. CAS/ MEA besiyeri ile siderofor tanımlama aşamasına 5 (%12.5) örnek dahil edilmiş ancak hiçbir örnekte CAS reaksiyonu gözlemlenmemiştir.
6. O- CAS besiyeri ile siderofor tanımlama aşamasına ise 40 mantar suşunun tümü dahil edilmiş, 2 (%28.5) *A. niger* ve 28 (%84.8) *C. albicans*' da siderofor varlığı tesbit edilmiştir.
7. Siderofor varlığının belirlenmesi için araştırma kapsamında denenen CASAD ve CAS/ MEA besiyerleri, içeriğinde bulunan toksik maddelerden dolayı, mikroorganizmaların gelişmesine imkan tanımamıştır.
8. Ancak O-CAS besiyeri, SDA besiyerinde üreyen mikroorganizma kolonlerinin üzerine uygulandığı için, içeriğinde toksik maddeler bulunsa da üremeyi engellememektedir.

9. Bu çalışmada O-CAS metodu diğer iki besiyerine kıyasla; basit, hızlı, dayanıklı, duyarlı, ekonomik ve yaygın olarak kullanılabilen bir metod olduğundan dolayı en başarılı metod olarak değerlendirilmiştir.

10. Çalışmanın ikinci aşaması olan, siderofor kodlayan genleri tanımlamak için Real-Time PCR- SYBR Green yöntemi uygulanmıştır.

11. Uygulamaya tabi tutulan 14 mantar suşunun 1 tanesi (% 7.14) *C. tropicalis*, 12 tanesi (% 85.7) *C. albicans* ve 1 tanesi (% 7.14) de *A. niger* idi.

12. Uygulamada CaSIT primerleri kullanıldığından dolayı *C. tropicalis* ve *A. niger* suşlarında istenilen sonuçlar elde edilememiştir.

13. Çalışma sonunda; St. 1.03 E1< St. 1.14 E1< St. 1.28 E1< St. 1.52 E1< St. 1.85 E1< St. 4.59 E1 sonucu elde edilmiştir.

14. Bu çalışmada, Real-Time PCR yönteminde, TaqMan probler yerine SYBR Green kullanılarak basit ve ekonomik yoldan sonuca ulaşılmıştır.

## 7. ÖZET

### Bazı Mantarlarda Siderofor Varlığının Gösterilmesi

Bu çalışmada, kültür koleksiyonundan seçilen çeşitli *Candida* ve *Aspergillus* suşlarında çeşitli besiyerleri ve moleküler yöntemler aracılığı ile siderofor varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Besiyerleri aracılığı ile siderofor varlığının araştırılması aşamasında, CASAD besiyeri, CAS/ MEA besiyeri ve O-CAS besiyeri olmak üzere üç besiyeri kullanılmıştır. CAS/ MEA besiyerinde denenen örneklerin hiçbirinde CAS reaksiyonu gözlenmezken, CASAD besiyerinde %33.3 oranında pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu üç besiyeri arasında O-CAS besiyerinden %75 oranında pozitif sonuç elde edilmiş ve diğer besiyerlerine kıyasla daha basit, duyarlı, ekonomik ve başarılı bulunmuştur. İkinci aşama olan moleküler yöntemlerle siderofor varlığının belirlenmesi aşaması, TaqMan® Probe yöntemine kıyasla, ekonomik oluşu ve kısa sürede sonuç vermesinden dolayı SYBR Green yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamaya 14 örnek ( *Candida* ve *Aspergillus*) dahil edilmiş ve CaSIT1 primerleri (forward ve reverse) kullanılarak siderofor kodlayan genler tanımlanmaya çalışılmıştır. Real-Time PCR- SYBR Green yöntemiyle elde edilen sonuçlar, konvansiyonel yöntemlerle elde edilen sonuçlarla benzer bulunmuştur. 14 örneğin 12'sinde (% 85.7) CaSIT1 primeri ile pozitif sonuçlar elde edilmiştir. CaSIT1 primerleri (forward ve reverse) kullanıldığı için *C. tropicalis* ve *A. niger* kontrol suşlar olarak kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre; belirlenen standart değerler doğrultusunda (St. 1.03 E1< St. 1.14 E1< St. 1.28 E1< St. 1.52 E1< St. 1.85 E1< St. 4.59 E1) bir standart eğri elde edilmiş ve bu standart eğri esas alınarak diğer örneklerdeki sidA gen ifadesi miktarı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler: *Candida*, *Aspergillus*, siderofor.**

## 8. SUMMARY

### **Demonstrating Presence of Siderophore In Some Fungi**

The aim of this study, was to demonstrate the presence of siderophores in *Candida* and *Aspergillus* strains, by using several mediums and molecular methods. For demonstrating siderophores by using mediums, we used three mediums; CASAD medium, CAS/ MEA medium and O-CAS medium, respectively. We couldn't recognize any CAS reaction in CAS/ MEA medium, in which we realised %33.3 percentage positive results in CASAD medium. We obtained % 75 percentage positive results in O-CAS medium. So in comparison with other two mediums, O-CAS medium was more simple, more sensitive, economic and more successful. Demonstrating presence of siderophores by molecular methods, was the second step of this study. We verified this step by using Real-Time PCR-SYBR Green method, which is more economic and gives results in shorter time than TaqMan® Probe. We operated this step by CaSIT1 primers (forward and reverse), with fourteen samples (*Candida* and *Aspergillus* strains). Results obtained from nonnuclear methods and Real-Time PCR SYBR Green method was similar. By this method, we obtained positive results in twelve (% 87.5) of fourteen samples. As we used CaSIT1 primers (forward and reverse) *C. tropicalis* and *A. niger* was used as negative control strains. According to the results of this study, we defined some standard values (St.  $1.03 \times 10^1$  < St.  $1.14 \times 10^1$  < St.  $1.28 \times 10^1$  < St.  $1.52 \times 10^1$  < St.  $1.85 \times 10^1$  < St.  $4.59 \times 10^1$ ) and obtained a standard curve. Due to this standard curve we defined, *sidA* gene expression amounts of the other samples.

**Key word: *Candida*, *Aspergillus*, siderophore.**

## 9. KAYNAKLAR

1. Sixt N, Dalle F, Lafon I, Aho S, Couillault G, Valot S, et al. Reduced fungal contamination of the indoor environment with Plasmair™ system (Airinspace). J Hosp Inf 2007; 65: 156-162.
2. Calderone RA, Blas GS. Pathogenic fungi; host interactions and emerging strategies for control; virulence factors that protect the fungus from elimination. England: Caister Academic Press; 2004.
3. Filler SG. Candida-host cell receptor-ligand interactions. Curr Opin Microbiol 2006; 9: 333-339.
4. Johnson L. Iron and siderophores in fungal-host interactions. Mycol Res 2008; 112 (2): 170-183.
5. Renshaw RJ, Halliday V, Robson GD, Trinci PJ, Wiebe MG, Livens FR, et al. Development and application of an assay for uranyl complexation by fungal metabolites, including siderophores. Appl Env Microbiol 2003; 69 (6): 3600-3606.
6. Howard DH. Acquisition, transport and storage of iron by pathogenic fungi. Clin Microbiol Rev 1999; 12 (3): 394-404.
7. Bozkaya E. Tıbbi Mikrobiyoloji I; Mantarlar Hakkında Genel Bilgi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.
8. Kuştimur S. Candida patogenezi etkileyen faktörler. Mikrobiyol Bül 1994; 28: 175-181.

9. Ainsworth GC. Introduction to the history of medical and veterinary mycology. Cambridge University Press: 1986
10. Bilgehan H. *Candida* ların tarihçesi, ekolojisi ve dağılımı. içinde Tümbay E, editör. *Candida* ve İnfeksiyonları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları 6. basım, Bilgehan Basımevi; 1986. s.1-8
11. Kwon-Cung KJ, Bennet JE. Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. Med Mycol 1998; 36 (3): 165-168.
12. Yücel A. Tıp mikolojisinin dünü bugünü. içinde. Tumbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş. editörler. 1. Ulusal mantar hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Tutanaklar. İzmir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları; 1999. s.3-15
13. Tümbay E. Mantarların Yapıları, Üreme Özellikleri ve Sınıflandırılması. içinde: Ustaçelebi Ş, editörler. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. içinde. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999. s.1015-1021
14. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. Tıbbi Mikrobiyoloji. Küçüker M, Tümbay E, Anđ Ö, Erturan Z. (Çev), 9. Basım, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002. s.352-356.
15. Brandt ME, Warnock DW. Laboratory aspects of medical mycology. içinde: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, editorler. Clinical Mycology. Oxford: University Press; 2003. s.3-22.
16. Temizkan G. Mayaların kullanım alanlarına genel bakış. içinde. Ağaçfidan A, Erturan Z. editörler. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre

kitabı. XXXIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi; 2008 21-25 Ekim; Bodrum, Türkiye. İstanbul: Birmat Matbaacılık; 2008.

17. Gordon D. Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans. *Cell Microbiol* 2005; 7: 471-479.

18. Vetvicka V.  $\beta$ -glucans as immunomodulators. *JANA* 2001; 3: 4-7.

19. Kalkancı A. Mantar-Kanser ilişkisi. içinde Ağaçfıdan A, Erturan Z. editörler. XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre kitabı. XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi; 2008 21-25 Ekim; Bodrum, Türkiye. İstanbul: Birmat Matbaacılık; 2008.

20. Walker GM. Yeast physiology and biotechnology. John Wiley and sons. 1998. s. 5-9

21. Tümbay E, İnci R, editörler. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. Tutanaklar; Türk Mikrobiol Cemiyeti yayınları. 36. İzmir: Ege Üniversitesi basımevi; 1999.

22. Kevin J. Kliss V, Kliss FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* 2006; 60: 5-15.

23. Guerinot ML. Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48: 743-772.

24. Howard DH. Acquisition, transport and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12 (3): 394-404.

25. Riquelme M. Fungal siderophores in plant-microbe interactions. *Microbiologia* 1996; 12: 537-546.

26. Telford JR, Raymond KN. Siderophores. içinde. Latwood J, Davis JED, MacNicol DD, Vogtle F. editörler. *Comprehensive supramolecular chemistry*. 1st ed. Oxford: Elsevier; 1996. s.245-266.

27. Howard DH. Iron gathering by zoopathogenic fungi. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 40: 95-100.
28. Martinez JL, Delgado-Iribarren A, Baquero F. Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. FEMS Microb Rev 1990; 75: 45-56.
29. Byers BR ve Arceneaux JEL. Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms. Met Ions Biol Syst 1998; 35: 37-66.
30. Haas H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores n iron uptake and storage. Appl Microbiol Biotechnol 2003; 62: 316-330.
31. Baillie GS, Douglas LJ. Iron-Limited Biofilms of Candida albicans and Their Susceptibility to Amphotericin B. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42 (8): 2146-2149.
32. Payne SM. Detection, isolation and characterization of siderophores. Methods Enzymol 1994; 235: 329-344.
33. Merz WG, Roberts GD. Algorithms for detection and identification of fungi. içinde: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC. editörler. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington: ASM Press; 2003: s.1669-85.
34. Persing DH. Moleküler Mikrobiyoloji. 1. Basım. Ankara: Palme Yayınevi; 2006: s.71
35. Temizkan G, Arda N. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2004: s.101-120.
36. Hayden RT. In vitro Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri. 1. Baskı. Ankara: Palme Yayınevi; 2006: s.43-69
37. Applied Biosystems. Real- Time PCR vs. Traditional PCR. s.1-15

38. Günel T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR". Türk Klin J Med Sci 2007; 27: 763-767
39. Milagres MF, Machuca A, Napoleao D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. J Microbiol Methods 1999; 37: 1-6.
40. Machuca A, Milagres AMF. Use of CAS- agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. Lett Appl Microbiol 2003; 36: 177-181.
41. Lesuisse E, Knight SAB, Camadro JM, Dancis A. Siderophore uptake by *Candida albicans*: effect of serum treatment and comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 2002; 19: 329-340.
42. Hu CJ, Bai C, Zheng XD, Wang YM, Wang Y. Characterization and functional analysis of the Siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. J Biol. Chem. 2002; 277 (34) : 30598-30605.
43. Knight SAB, Vilaire G, Lesuisse E, Dancis A. Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. Inf Immun 2005; 37 (9): 5482-5492.
44. Fratti RA, Belanger PH, Ghannoum MA, Edwards JE, Filler SG. Endothelial cell injury caused by *Candida albicans* is dependent on iron. Inf Immun 1998; 66 (1) : 191-196.
45. Heymann P, Gerads M, Schaller M, Dromer F, Winkelmann G, Ernst JF. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (sit1p/ arn1p) mediates uptake of ferrichrome- type siderophores and is required for epithelial invasion. Inf Immun 2002; 70 (9): 5246-5255.
46. Ismail A, Bedell GW, Lupan DM. Siderophore production by the yeast, *Candida albicans*. Biochem Biophys Res Com 1985; 130 (2): 885- 891.

47. Illmer P, Buttinger R. Interactions between iron availability, aluminium toxicity and fungal siderophores. *Biometals* 2006; 19: 367-377.
48. Sweet SP, Douglas LJ. Effect of iron concentrations on siderophore synthesis and pigment production by *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 80: 87-92.
49. Eisendle M, Schretti M, Kragl C, Müller D, Illmer P, Haas H. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination and sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukar Cell* 2006; 5 (10): 1596-1603.
50. Baakza A, Vala AK, Dave BP, Dube HC. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *J Exper Marine Biol Ecol* 2004; 311: 1-9.
51. Holzberg M, Artis WM. Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens. *Infect Immun* 1983; 40 (3): 1134-1139.
52. Schretti M, Bignell E, Kragl C, Sabiha Y, Loss O, Eisendle M, Wallner A, et al. distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLOS Pathogens* 2007; 3 (9): 1195-1207.
53. Shin SH, Lim Y, Lee SE, Yang NW, Rhee JH. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *J Microbiol Methods* 2001; 44: 89-95.
54. Miranda SP, Cabirol N, Tellez RG, Rivera LSZ, Fernandez FJ. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods* 2007; 70: 127-131.
55. Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 1987; 1: 47-56.

56. Fekete FA, Chandhoke V, Jellison J. Iron -binding compounds produced by wood- decaying basidiomycetes. Appl Environ Microbiol 1989; 55: 2720- 2722.
57. Smith MJ, Shoolery JN, Schwyn B, Holden I, Neilands JB. Rhizobactin, a structurally novel siderophore from *Rhizobium meliloti*. J Am Chem Soc 1985; 107: 1739-1743.
58. Arnow LE. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine - tyrosin mixtures. J Biol Chem 1937; 118: 531-537.
59. Csaky TZ. On the determination of bound hydroxylamine in biological material. Acta Chem Scand 1948; 2: 450- 454.
60. Zhao X, Oh SH, Yeater KM, Hoyer LL. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. Microbiology 2005; 151: 1619-1630.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel Bilgiler**

**Adı:** Ayşe

**Soyadı:** Seyer

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Bostancı/ KKTC - 12.08.1986

### **Eğitimi**

2009 - Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Mikrobiyoloji ABD

2007 - Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

2003 - Güzelyurt Türk Maarif Koleji

### **Yabancı Dili**

İngilizce- İyi düzey

### **Bilgisayar Bilgisi**

Word, Excell, Power point

### **Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar**

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

### **Burslar**

FEMS Bursu- Update on Molecular Methods- LAMMB University di Siena/  
İtalya (Haziran 09- Temmuz 09)

## 11. TEŞEKKÜR

Bilimsel bir çalışma, bilgi ve eğitimin yanı sıra; emek, sabır, uyumlu çalışma ortamı, yardımlaşma ve dayanışmanın da önemli roller üstlendiği bir süreçti.

Eğitimim süresince destek ve ilgilerini esirgemeyen, değerli bilgilerinden yararlandığım Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı, *Sayın Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR' a*;

Tez konumun belirlenmesinde, tezimin çalışma aşamasında, her sorunun yanıtını benimle birlikte heyecanla bekleyen, bilgi ve deneyimleri ile her zaman yardımcı ve yanımda olan, ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli tez danışman hocam *Sayın Doç. Dr. Ayşe KALKANCI' ya*;

Bilimsel çalışma yardımlaşma ve dayanışma demektir; değerli bilgi, yardım ve destekleri için *Araş. Gör. Gülşah BİTER , Araş. Gör. Burçe YALÇIN ve Araş. Gör. Feyza DEMİR'e*;

Araştırma süreci işbirliği gerektiriyordu; yardıma ihtiyacım olan her an yanımda olan, emeğini, desteğini esirgemeyen, çalışma sürecinde hafta sonlarını benimle birlikte geçiren çok değerli arkadaşım *Ali FOUAD' a* ;

Uyumlu çalışma ortamı bu sürecin bir parçasıydı; manevi desteklerini eksik etmeyen, her aşamanın sonucunu benimle birlikte heyecanla bekleyen çok değerli arkadaşlarım, Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencileri *Songül TÜRK , Seda USTA , Melek YAMAN, Melda MERAL ve Duygu KAHRAMAN ile* Doktora öğrencisi *Vet. Hek. Esra JABBAN 'a* ;

Huzur belki de bu aşamanın en önemli unsurlarından biriydi ; bana huzurlu bir ev ortamı sağlayan, bu zorlu süreçte her türlü anlayış, sabır ve desteği eksik etmeyen çok değerli ev arkadaşım, dostum *Fatoş ŞEKERCİLER 'e* ;

Yaşamım boyunca her türlü maddi ve manevi desteği esirgemeyen, her zaman yanımda olan, bu zorlu süreci benimle birlikte yaşayan sevgili aileme çok teşekkür ediyorum.

*Bio. Ayşe SEYER*