

Atılım Pompalarını Fazla Eksprese Eden Flukonazole Dirençli *Candida albicans* Suşlarında Bu Genlerin Transkripsiyon Faktörlerindeki Mutasyonların Araştırılması*

Investigation of Mutations in Transcription Factors of Efflux Pump Genes in Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Strains Overexpressing the Efflux Pumps

Kemal Turan KALKANDELEN¹, Mine DOLUCA DERELİ²

¹ Çankırı Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Çankırı.

¹ Çankırı State Hospital, Microbiology Laboratory, Çankırı, Turkey.

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

* Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 2011.KB.SAG.061 sayı ile desteklenmiş ve 1. Ulusal Tıbbi Mikoloji Kongresi (24-26 Eylül 2014, Ankara)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 27.03.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 10.08.2015

ÖZ

Günümüzde, kanser kemoterapisi, organ nakli ve HIV enfeksiyonu gibi nedenlerle bağışık yanıtı bozulmuş hastaların sayısında önemli bir artış gözlenmekte ve buna paralel olarak klinikte karşılaşılan *Candida albicans* enfeksiyonlarının sıklığı artmaktadır. Flukonazol, bu tip hastalarda kullanımı kolay, yan etkisi az ve iyi tolere edilebilir olması nedeniyle, tedavi ve profilaksiste sıklıkla ilk tercih edilen antifungal ilaçtır. Özellikle uzun süreli ilaç kullanımı, dirençli suşların seçilmesine ve flukonazole direnç gelişimine neden olmaktadır. *C.albicans*'ta flukonazole direnç mekanizmaları arasında en sık görüleni, atılım pompaları ile ilacın hücre dışına çıkartılmasıdır. Bu işlemde görev alan başlıca pompalar *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genleri tarafından kodlanan *Cdr1*, *Cdr2* ve *Mdr1* pompalarıdır. Söz konusu pompaların aşırı ekspresyonuna, *CDR1*, *CDR2* ve *MDR1* genlerinin transkripsiyon faktörleri olan *Tac1p* ve *Mrr1p*'yi eksprese eden *TAC1* ve *MRR1* genlerinde görülen nokta mutasyonlarının neden olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada altısı flukonazole duyarlı, dördü kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı, beşi ise dirençli toplam 15 adet *C.albicans* suşu ile *Mdr1* atılım pompasını fazla eksprese ettiği ve *MRR1* gen bölgesinde buna yol açan P683H mutasyonunu içerdiği bilinen flukonazole dirençli bir adet (DSY292) ve flukonazole duyarlı ATCC 14053 *C.albicans* suşlarının *TAC1* ve *MRR1* gen bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu ve dizi

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Kemal Turan Kalkandelen, Çankırı Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kırkevler, Çankırı, Türkiye. Tel (Phone): +90 532 551 3802, E-posta (E-mail): tkalkandelen@hotmail.com

analizi ile mutasyonlar açısından incelenmesi amaçlanmıştır. Araştırmanın sonucunda çalışılan suşlardan flukonazole dirençli olup Cdr1 ve Cdr2 pompalarını aşırı eksprese ettiği gösterilen iki tanesinde, *TAC1* geninde aşırı ekspresyona neden olduğu bildirilmiş R673Q ve A736V mutasyonları saptanmıştır. Çalışılan suşlardan flukonazole dirençli olup Mdr1 pompasını aşırı eksprese ettiği bilinen bir tanesinin *MRR1* gen bölgesinde ise yine fazla ekspresyona neden olduğu saptanmış P683H mutasyonu belirlenmiştir. Sonuç olarak, çalışmamıza alınan flukonazole dirençli *C.albicans* suşlarında, atılım pompalarını kodlayan genlerin transkripsiyon faktörlerinde görülen nokta mutasyonlarının, flukonazol direncinde önemli rol oynadığı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Candida albicans*; flukonazol; direnç; atılım pompası; *MRR1*; *TAC1*; mutasyon.

ABSTRACT

In recent years, a significant rise in the number of immunocompromised patients have been observed due to cancer chemotherapy, organ transplantation and HIV infection. As a result of this, the frequency of *Candida albicans* infections in the clinics have been increased. Fluconazole, as being a well tolerated, easy to use drug with minor side effects, is often the first choice antifungal agent for this patient group, both for therapy and prophylaxis. Especially the long-term use of this drug, causes the selection of resistant strains and leads to the development of fluconazole resistance. The most frequently observed resistance mechanism against fluconazole in *C.albicans* strains is the transportation of the drug out of the cell via efflux pumps. The efflux pumps mainly involved are Cdr1, Cdr2 ve Mdr1 encoded by *CDR1*, *CDR2* and *MDR1* genes. It has been shown that, the overexpression of these efflux pump genes was caused by functional mutations in *TAC1* and *MRR1* genes which encode the transcription factors Tac1p and Mrr1p. This study was aimed to analyze *TAC1* and *MRR1* genes of 15 *C.albicans* strains which consist of six fluconazole-susceptible, four susceptible with trailing effect and five fluconazole-resistant isolates plus one resistant strain (DSY292), known to overexpress Mdr1 efflux pump due to P683H mutation in *MRR1* gene and one fluconazole-sensitive ATCC 14053 *C.albicans* strain in terms of mutations with polymerase chain reaction and sequence analysis. Two of the fluconazole-resistant isolates which had overexpression of Cdr1 and Cdr2 pumps known to have overexpression of *TAC1* gene, revealed R673Q and A736V mutations. A P683H point mutation, that overexpressed the Mdr1 pump was detected in a fluconazole-resistant strain, which was known to cause *MRR1* overexpression. In conclusion, mutations in the transcription factors of the efflux pump genes may play an important role in the resistance against fluconazole among our selected *C.albicans* strains.

Keywords: *Candida albicans*; fluconazole; resistance; efflux pump; *TAC1*; *MRR1*; mutation.

GİRİŞ

Son birkaç on yılda, bağışık yanıtı baskılanmış hastaların sayısının artmasına paralel olarak, fırsatçı mantar enfeksiyonlarının sıklığı da artmaktadır. Bu enfeksiyonlardan en sık sorumlu olan mantarlar *Candida* türleridir. Farklı çalışmalar, *Candida* türleri ile oluşan kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE) ve invazif enfeksiyonların mortalitesinin %30-50 olduğu göstermiştir¹⁻³. Bu enfeksiyonlardan en sık soyutlanan tür, son yıllarda diğer türlerde görülen artışa rağmen, *Candida albicans*'tır⁴. *C.albicans* enfeksiyonlarının önlenmesinde ve tedavisinde, oral kullanılabilmesi, yan etkilerinin az olması ve genellikle iyi tolere edilmesi gibi nedenlerle flukonazol, halen ilk ve en sık tercih edilen ajanlardan biridir. *C.albicans*'ta flukonazole direnç genel olarak nadir (%1-2.3) görülmekle beraber, uzun süreli ve sık kullanım sonrasında direnç gelişebildiği bildirilmiştir⁵⁻⁷.

C.albicans'ta flukonazole direnç gelişimi dört farklı mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. Bu mekanizmalar; Cdr1, Cdr2 ve Mdr1 pompalarının aşırı ekspresyonu ile antifungal moleküllerin hücre dışına atılması, ilacın hedefi olan lanosterol demetilaz enziminde değişim, bu enzimi sentezleyen *ERG11* geninin fazla ekspresyonu ve ilacın bloke ettiği metabolik yollara alternatif metabolik yolların kullanılması olarak sıralanabilir. Bu mekanizmalardan bir ya da fazlası beraber çalışabilmekte ve basamak tarzı bir direnç paterni göstermektedir^{5,6}. En sık görülen mekanizma olan ilacın hücre dışına atılmasına, *C.albicans*'ın sahip olduğu iki grup atılım pompasının aşırı ekspresyonu neden olmaktadır. Bunlar ATP bağlayan kaset tipindeki Cdr1 ve Cdr2 ile majör kolaylaştırıcı ailesi içinde yer alan Mdr1'dir. Araştırmalar, bu pompaların aşırı ekspresyonuna, pompaları kodlayan genlerin transkripsiyon faktörleri olan Tac1p ve Mrr1p'yi kodlayan, *TAC1* ve *MRR1*'deki fonksiyon kazandırıcı tipteki nokta mutasyonlarının neden olduğunu göstermektedir^{5,6,8,9}. Bu çalışmada, atılım pompalarını kodlayan *CDR1*, *CDR2* veya *MDR1* genlerini fazla eksprese ettiği belirlenen flukonazole dirençli *C.albicans* suşlarında, söz konusu genlerin transkripsiyon faktörlerini kodlayan *TAC1* ve *MRR1* bölgelerindeki mutasyonların polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve dizi analizi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, flukonazole duyarlılık kategorileri ile MİK değerleri ve ATCC14053 suşuna göre atılım pompalarını ekspresyon oranları daha önce gerçek zamanlı PCR ile belirlenmiş^{10,11}, farklı üniversitelerde çeşitli klinik örneklerden soyutlanmış altısı flukonazole duyarlı, dördü kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı, beşi ise dirençli toplam 15 adet *C.albicans* suşu ile Prof. Dr. D. Sanglard'dan sağlanan, *MDR1* atılım pompasını fazla eksprese ettiği ve *MRR1* gen bölgesinde buna yol açan P683H mutasyonunu içerdiği bilinen flukonazole dirençli bir adet (DSY292) ve flukonazole duyarlı ATCC 14053 suşları dahil edildi. Suşların duyarlılıkları CLSI M27-A3 standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi; duyarlılık kategorileri CLSI M27-S4 kriterlerine göre değerlendirildi^{12,13}. Suşların özellikleri Tablo I ve II'de gösterildi.

Suşlardan DNA izolasyonu, "PureLink Genomic DNA Mini Kit" K1820-01 (Invitrogen) spin kolon yöntemi ile yapıldı. Daha sonra DNA üzerindeki *TAC1* ve *MRR1* gen bölgelerini tanıyan öncüller hazırlandı. *TAC1* geni için ileri 5' ATGGACACTTCACTGTCCTACT 3', geri 5'-TTAAATCCCCAAATTATTGTCAA-3'; *MRR1* geni için ise ileri 5'-ATGTCRATTGCCAC-CACCC-3', geri 5'-TTAATTGGTAAAAAGTTGATCAAAA-3' öncül dizileri kullanıldı. Her iki gen ayrı ayrı, 95°C'de 5 dk ön denatürasyon, 94°C'de 1 dk, 54°C'de 1 dk, 72°C'de 6 dk şeklinde 10 döngü, 94°C'de 1 dk, 52°C'de 1 dk, 72°C'de 6 dk şeklinde 10 döngü, 94°C'de 1 dk, 50°C'de 1 dk, 72°C'de 6 dk şeklinde 10 döngü ve 72°C'de 10 dk son uzama şeklindeki 30 PCR döngüsü ile çoğaltıldı. PCR sonucunda elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezinde görüntüledikten sonra saflaştırılmak ve "Primer Walking" servisi ile dizi analizi yapılmak üzere Macrogen (Seul, Kore) firmasına gönderildi.

Dizi analizi sonuçları, BioEdit sürüm 7.0.9.0 programı kullanılarak değerlendirildi. Yazılım ile nükleotid dizileri hizalandı, aminoasit dizilerine çevrildi ve referans dizilerle karşılaştırılarak nokta mutasyonlar saptandı. Aminoasit değişikliğine neden olmayan ses-

Tablo 1. Çalışmaya Alınan *C.albicans* Suşlarının, Flukonazole Duyarlılık Kategorileri ve MİK Değerleri^{10,11}

No	Suş no	Kaynak	FLU duyarlılık kategorisi	FLU MİK (µg/mL)		
				MD	YEPDA/Etest*	CsA içeren YEPDA/Etest*
1	ATCC 14053	Kontrol	Duyarlı	-		
2	533	DEU	Duyarlı	0.500		
3	565	DEU	Duyarlı	0.500		
4	644	DEU	Duyarlı	0.250		
5	1221	DEU	Duyarlı	0.125		
6	1453	DEU	Duyarlı	0.250		
7	2157	DEU	Duyarlı	0.250		
8	348	DEU	Ki-Du	1024	0.500	0.500
9	1978	DEU	Ki-Du	1024	0.500	0.500
10	93-05	DEU	Ki-Du	1024	1.5	0.500
11	813	DEU	Ki-Du	> 1024	2	1.5
12	960	DEU	Dirençli	8		
13	H1	HU	Dirençli	64		
14	H2	HU	Dirençli	16		
15	H3	HU	Dirençli	32		
16	B	UU	Dirençli	32		
17	DSY292	DS	Dirençli	> 64	-	-

* Siklosporin A içeren (0.5 µg/ml) ve içermeyen YEPD agarda uygulanan Etest yöntemi sonuçları, suşların kısmi inhibisyon etkisinin gösterilmesi açısından belirtilmiştir.
CsA: Siklosporin A; DEÜ: Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi, Mikoloji Laboratuvarı; DS: Prof. Dr. Dominique Sanglard; FLU: Flukonazol; HÜ: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; Ki-Du: Kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı; MD: Mikrodilüsyon yöntemi; UU: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; YEPDA: Maya (yeast) ekstrakt-pepton dekstroz agar.

siz mutasyonlar dikkate alınmadı. Belirlenen mutasyonlar, hem literatürde bildirilenlerle, hem de flukonazol duyarlılık kategorilerine göre karşılaştırıldı ve sadece flukonazole dirençli suşlarda görülen mutasyonlar, olası direnç nedeni olarak değerlendirildi.

TAC1 genindeki mutasyonların saptanmasında flukonazole duyarlı ATCC14053 suşuna ait dizi, referans dizi olarak kabul edildi. *MRR1* genindekilerin belirlenmesinde, ATCC14053 *C.albicans* suşunun dizisi ve bu suşun dizi analizinde belirlenemeyen bölgeler olması nedeniyle, flukonazole duyarlı yabancı SC5314 *C.albicans*'a ait "Candida Genome Database"ten sağlanan dizi, referans olarak kabul edildi. Çalışılan suşların *MRR1* dizileri ayrıca DSY292 nolu suş ile de karşılaştırıldı.

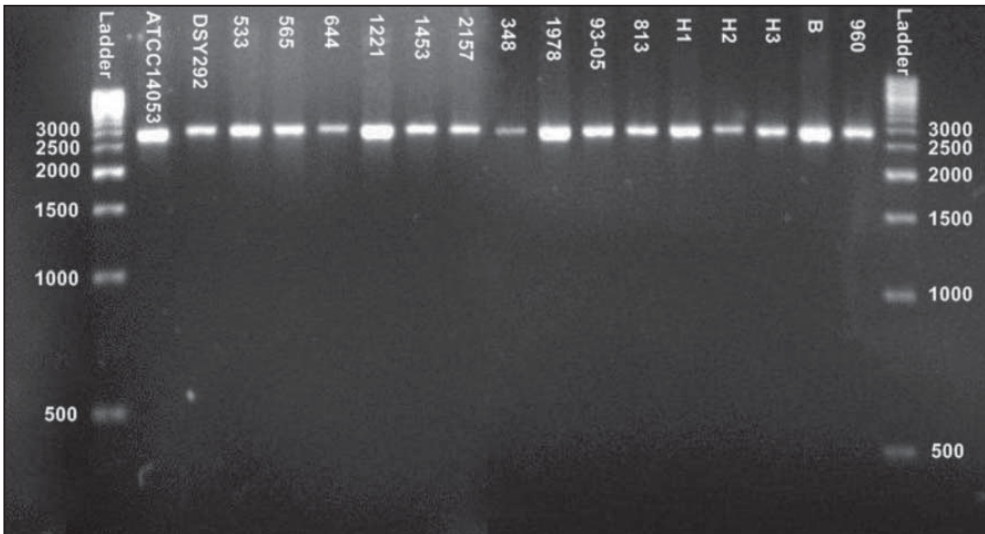
BULGULAR

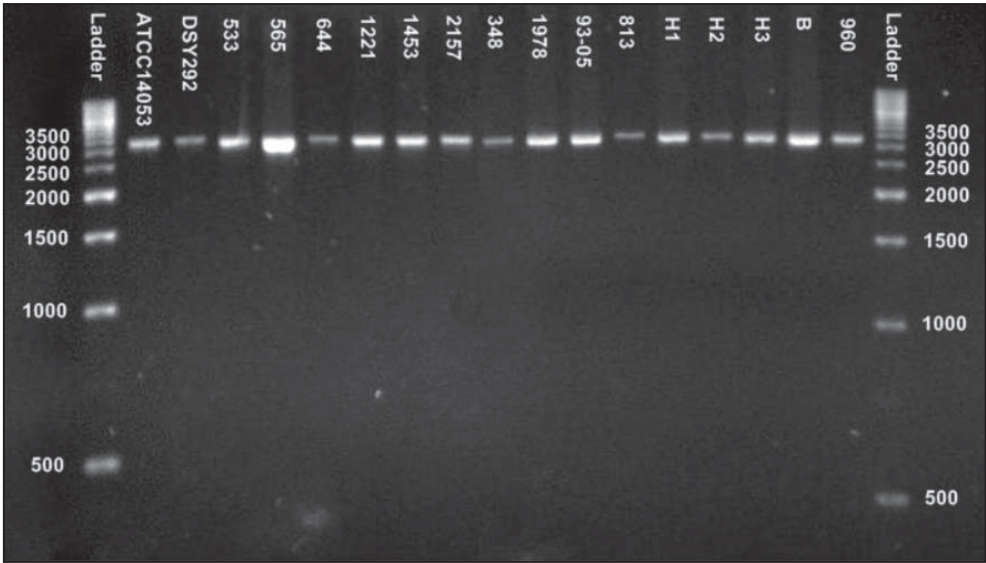
Çalışmaya alınan *C.albicans* suşlarının, çoğaltılan *TAC1* (2946 bç) ve *MRR1* (3327 bç) bölgelerine ait görüntüler Şekil 1 ve 2'de verilmiştir. Dizi analizi sonucunda, çalışılan 17 suştan 14'ünün *TAC1* gen bölgesine ait dizilerinin tamamı elde edilmiş, üçünde eksikler olmuştur. Her suş için 2946 bç uzunluğundaki *TAC1* gen dizisinin elde edilme oranı Tablo III'te gösterilmiştir.

Tablo II. İncelenen *C.albicans* Suşlarının ATCC14053 Suşuna Göre Atılım Pompalarının Ekspresyon Oranları¹¹

No	Suş no	FLU duyarlılık kategorisi	Ekspresyon oranı ± SS		
			CDR1	CDR2	MDR1
1	ATCC 14053	Duyarlı	1.0	1.0	1.0
2	533	Duyarlı	1.2 ± 0.3	2.6 ± 0.2	1.4 ± 0.2
3	565	Duyarlı	2.2 ± 0.6	2.6 ± 0.3	8.8 ± 1.6
4	644	Duyarlı	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0	0.2 ± 0
5	1221	Duyarlı	0.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1
6	1453	Duyarlı	4.2 ± 1.1	8.4 ± 0.6	4.7 ± 0.6
7	2157	Duyarlı	4.8 ± 0.8	7.1 ± 0.3	0.4 ± 0
8	348	Ki-Du	3.6 ± 1.5	2.7 ± 0.5	7.6 ± 0.7
9	1978	Ki-Du	2.9 ± 1.1	2.5 ± 0.5	3.5 ± 0.8
10	93-05	Ki-Du	1.8 ± 0.5	3.2 ± 0.8	5.7 ± 0.5
11	813	Ki-Du	5.0 ± 0.6	4.2 ± 0.1	103.9 ± 6.9
12	960	Dirençli	1.6 ± 0.4	2.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1
13	H1	Dirençli	4.6 ± 0.5	4.0 ± 0.1	33.3 ± 4.9
14	H2	Dirençli	4.0 ± 0.5	3.7 ± 0.2	1.7 ± 0.2
15	H3	Dirençli	28.4 ± 4.9	33.9 ± 2.3	1.0 ± 0.1
16	B	Dirençli	32.0 ± 5.7	47.2 ± 2.0	1.7 ± 0.3
17	DSY292	Dirençli	-	-	19.0 ± 1.5

FLU: Flukonazol; Ki-Du: Kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı; SS: Standart sapma.

**Şekil 1.** *C.albicans* suşlarına ait 2946 baz uzunluğundaki TAC1 gen bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri.



Şekil 2. *C. albicans* suşlarının 3227 baz uzunluğundaki *MRR1* gen bölgelerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri.

Tablo III. Dizi Analizi Sonucunda Çalışmaya Alınan *C. albicans* Suşlarının *TAC1* ve *MRR1* Gen Dizilerinin Elde Edilme Oranları

Suş no	Elde edilen <i>TAC1</i> nükleotid dizisi oranı (%)	Elde edilen <i>MRR1</i> nükleotid dizisi oranı (%)
ATCC14053	100	80.16
533	100	94.79
565	100	99.37
644	95.82	0
1221	100	96.24
1453	96.13	100
2157	100	85.53
348	100	0
1978	100	97.39
93-05	92.87	100
813	100	99.28
DSY292	100	79.80
H1	100	97.66
H2	100	96.05
H3	100	81.51
B	100	96.32
960	100	97.26

Flukonazole duyarlı *C.albicans* suşlarının *TAC1* bölgelerinde; K87N, S108N, M170V, M170I, N174D, F189S, S290C, A377V, N396S, I558V, N772K, D776N, S896N, P941L ve E945G mutasyonları saptanırken, kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı suşlara ait dizilerde L5R, F189S, T353S, N396S, I558V, N772K, D776N, T782A, Q829E, R869Q, T885K, S896N ve P941L mutasyonları belirlenmiştir. Flukonazole dirençli *C.albicans* suşlarının *TAC1* dizilerinde ise; F104V, S108N, L149I, M170V, N174D, F189S, N396S, A411V, I558V, R673Q, A736V, D776N, A790V, Q829E, S896N ve P941L mutasyonlarının bulunduğu görülmüştür. Bu mutasyonlardan birer suшта izlenen F104V, L149I, A411V, R673Q, A736V ve üç suшта belirlenen A790V mutasyonları çalışmaya alınan suşlardan yalnızca flukonazole dirençli olanlarda saptanmıştır.

İncelenen 17 *C.albicans* suşundan ikisine ait *MRR1* dizilerinin tamamı elde edilmiş, 13 suшта kayıplar olmuştur. İki suшта ait *MRR1* gen dizisi ise, iki defa PCR ürünü gönderildiği halde belirlenememiştir. Sonuçlar incelendiğinde; 491. nükleotidden sonra 1221 nolu suшта 24 nükleotidlik, 533, 565, 2157, 1978, 813, H1, H2, H3 ve B suşlarında ise 12 nükleotidlik insersiyon dizileri olduğu görülmüştür. Gen bankasına kayıtlı *MRR1* dizilerinde de, aynı pozisyonlarda benzer diziler bulunduğu için durum normal olarak değerlendirilmiştir. Her suшта ait *MRR1* gen dizisinin elde edilebilme oranları Tablo III'de gösterilmiştir.

Suşların nükleotid dizilerinin çevrildiği aminoasit dizileri, flukonazole duyarlı ATCC14053 *C.albicans* ve *C.albicans* SC5314 suşlarına ait dizilerle karşılaştırıldığında; flukonazole duyarlı *C.albicans* suşlarının *MRR1* bölgelerinde I3M, P19L, G75R, V127A, S168P, L171P, V341E, N514I, K531I, Y532N, I538M, L592F, N937K, F1032L, S1037L mutasyonları ile flukonazole kısmi inhibisyon etkisi gösteren duyarlı *C.albicans* suşlarının aynı bölgelerinde S16I, T73K, L171P, L592F mutasyonları saptanmıştır. Flukonazole dirençli *C.albicans* suşlarının *MRR1* dizileri, aynı referans diziler ile karşılaştırıldığında ise; G75R, S168P, H574R, P683H, N937K, F1032L, S1037L, S1039F, S1041L, T1065R, P1066A, A1068D, L1069F ve N1071K mutasyonları belirlenmiştir. Bu mutasyonlardan iki suшта belirlenen H574R ve birer suшта izlenen P683H, S1039F, S1041L, T1065R, P1066A, A1068D, L1069F ve N1071K mutasyonları, çalışmaya alınan suşlardan yalnızca flukonazole dirençli olanlarda görülmüştür.

Dirençli suşlar, flukonazol MİK değerleri, ATCC14053 suşuna göre atılım pompalarının ekspresyon oranları ve sadece bu suşlarda saptanan mutasyonlar Tablo IV'te gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Sayısı her geçen gün artan AIDS, kanser kemoterapisi ve organ transplantasyonu hastalarında önemli mortalite nedeni olan *C.albicans* enfeksiyonlarında görülen flukonazol direnci, ciddi bir sorun oluşturmaktadır¹⁻³. *C.albicans* türünde flukonazole direnç gelişimi, en sık olarak Cdr1-2 ve Mdr1 atılım pompalarının aşırı ekspresyonu sonucunda ilacın hücre içinde birikiminde azalma ile meydana gelmektedir. Bu pompaları kodlayan genlerin, promotor bölgelerindeki mutasyonların, fonksiyon kaybına yol açtığı bununla beraber promotor bölgeler üzerinde saptanan DRE, BRE gibi çeşitli yanıt elemanlarının transkripsiyon faktörleri ile uyarılmasının ise, pompaların aşırı ekspresyonuna neden olduğu bildirilmiştir¹⁴⁻¹⁸. Pompa genlerinin regülasyonunu düzenleyen birçok transkripsi-

Tablo IV. Flukonazole Dirençli Suşların MİK Değerleri, ATCC14053 Suşuna Göre Atılım Pompalarını Ekspresyon Oranları ve Saptanan Mutasyonlar

Suş no	Flukonazol MİK değeri (Mikrodilüsyon yöntemi ile) (µg/ml)	Ekspresyon oranı ± SS			Saptanan mutasyonlar	
		CDR1	CDR2	MDR1	TAC1	MRR1
DSY292	> 64	-	-	19.0 ± 1.5	L149I A411V A790V	P683H
H1	64	4.6 ± 0.5	4.0 ± 0.1	33.3 ± 4.9	A790V	H574R
H2	16	4.0 ± 0.5	3.7 ± 0.2	1.7 ± 0.2	A790V	H574R
H3	32	28.4 ± 4.9	33.9 ± 2.3	1.0 ± 0.1	F104V A736V	-
B	32	32.0 ± 5.7	47.2 ± 2.0	1.7 ± 0.3	R673Q	-
960	8	1.6 ± 0.4	2.6 ± 0.2	1.2 ± 0.1	-	S1039F S1041L T1065R P1066A A1068D L1069F N1071K

yon faktörü tanımlanmış olup; bunlardan flukonazol direncinde doğrudan rol oynadığı net olarak gösterilen Tac1p, CDR1 ve CDR2 genlerine, Mrr1p ise MDR1 genine özgündür. Atılım pompalarının fazla ekspresyonu ile ortaya çıkan flukonazol direncinde, bu transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerde heterozigotluğun kaybı ile birlikte fonksiyon kazandırıcı tipteki nokta mutasyonlarının rol oynadığı gösterilmiştir^{9,14-18}. Çeşitli araştırmalarda TAC1 ve MRR1 genlerinde değişik pozisyonlarda sırasıyla 23 ve 14 adet fonksiyon kazandırıcı nitelikte nokta mutasyonu tanımlanmıştır^{14-17,19,20}.

Çalışmamızda, Cdr1, Cdr2 ve Mdr1 atılım pompalarını eksprese etme düzeyleri bilinen, beşi flukonazole dirençli, 15 *C. albicans* suşuna ait TAC1 ve MRR1 gen bölgeleri, flukonazol direncine neden olabilecek nokta mutasyonları açısından araştırılmış ve sadece dirençli suşlarda saptanan mutasyonlar Tablo IV'de gösterilmiştir. Mdr1 pompasını fazla eksprese eden DSY292 suşunun MRR1 gen bölgesinde, bu suшта var olduğu bilinen ve Dunkel ve arkadaşları¹⁵ tarafından aşırı ekspresyona neden olduğu gösterilmiş olan P683H mutasyonu saptanmıştır. Bu bulgu, çalışmanın yöntemini doğrulaması açısından kıymetlidir. DSY292 suşunda CDR1/2 aşırı ekspresyonu olmadığı için TAC1 genindeki mutasyonlar üzerinde durulmamıştır. H1 ve H2 suşlarının her ikisinin de TAC1 genlerinde A790V mutasyonu saptanmış; ancak her iki suş da CDR1/2'yi aşırı eksprese etmediği için söz konusu mutasyon dikkate alınmamıştır. Aynı iki suşun MRR1 genlerinde ise H574R mutasyonu saptanmış, ancak aynı mutasyona sahip iki suştan yalnız birinde (H2) MDR1 aşırı ekspresyonu görüldüğü için, saptanan mutasyon, aşırı ekspresyon ile ilişkilendirilmemiştir.

CDR1, CDR2 aşırı ekspresyonu gösteren H3 suşunun ilgili TAC1 geninde F104V ve A736V mutasyonları belirlenmiştir. Bu mutasyonlardan A736V'nin, TAC1 geninde hiperaktiviteye ve flukonazol direncine neden olduğu literatürde gösterilmiştir¹⁷. Diğer taraftan F104V mutasyonu, aynı araştırmacıların daha önceki bir yayınında¹⁶ belirlenmiş bir

varyasyon olup, flukonazol direnci ile ilişkilendirilmemiştir. *CDR1*, *CDR2* aşırı ekspresyonu gösteren diğer bir suş olan B suşunun *TAC1* geninde, R673Q mutasyonu belirlenmiş ve olası hiperaktivasyon nedeni olarak değerlendirilmiştir. Bu bulgumuz, söz konusu mutasyonun fonksiyon kazandırıcı nokta mutasyonu olarak bildirildiği makalelerin verileri ile uyumludur^{19,20}. S1039F, S1041L, T1065R, P1066A, A1068D, L1069F ve N1071K mutasyonları arka arkaya pozisyonlarda, 960 nolu suşun *MRR1* geninde gözlenmiştir. Ancak söz konusu suşun *MDR1* ekspresyonunun yüksek olmaması ve incelenen yayınlarda ve bu çalışmada değerlendirilen diğer suşlarda *MRR1* gen bölgesinde bu şekilde aşırı değişken bir bölge görülmemesi nedeniyle, bu mutasyonlara kuşku ile yaklaşılmış ve bunlar, aşırı ekspresyona neden olan mutasyonlar olarak değerlendirilmemiştir.

Bulgularımız ışığında, çalışmaya alınan flukonazole dirençli klinik izolatlarımızdan, *CDR1* ve *CDR2* genlerini diğerlerine göre büyük fazla eksprese ettiği saptanmış H3 ve B'de görülen aşırı ekspresyona, *TAC1* genlerinde saptanan A736V ve R673Q mutasyonlarının neden olduğu söylenebilir. Diğer taraftan, *MDR1* genini aşırı eksprese eden H2 suşunda görülen aşırı ekspresyonunun sebebi belirlenememiştir. Söz konusu suшта, aminoasit dizisinin ilk 26'sı değerlendirilememiş, ancak bugüne kadar *MRR1* geninin bu kısmında tanımlanmış fonksiyon kazandırıcı bir mutasyon bildirilmemiştir. Bu bilgiler ışığında, söz konusu suшта flukonazol direncinden, izlenemeyen 26 aminoasitlik bölgede görülen bir mutasyonun sorumlu olma olasılığı düşük olarak değerlendirilmiştir. Bu suшта görülen *MDR1* aşırı ekspresyonuna, genin henüz tanımlanmamış *Mrr1* dışındaki transkripsiyon faktörlerinin ya da pompa geninin transkripsiyon faktörüne gerek duymaksızın aşırı eksprese olmasının neden olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak, çalışmamıza alınan flukonazole dirençli *C.albicans* suşlarında, atılım pompalarını kodlayan genlerin transkripsiyon faktörlerinde görülen nokta mutasyonlarının, flukonazol direncinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 2011; 11(2): 142-51.
2. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2007; 48(1): 1-12.
3. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp. among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis* 2010; 14(11): e954-66.
4. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(1): 133-63.
5. Pemán J, Cantón E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7(4): 453-60.
6. Kanafani Z, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* 2008; 46(1): 120-8.
7. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol* 2012; 50(11): 3435-42.
8. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res* 2009; 9(7): 1029-50.

9. Morschhäuser J, Barker KS, Liu TT, et al. The transcription factor Mrr1p controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2007; 3(11): e164.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, 3rd ed, 2008. CLSI Document M27-A3. CLSI, Wayne, PA.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Fourth Informational Supplement, 2012. CLSI Document M27-S4. CLSI, Wayne, PA.
12. Gülat S, Doluca Dereli M. Flukonazole dirençli *Candida albicans* izolatlarında atım pompa ekspresyonlarının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(2): 325-34.
13. Manastır L, Ergon MC, Yücesoy M. Investigation of mutations in Erg11 gene of fluconazole resistant *Candida albicans* isolates from Turkish hospitals. *Mycoses* 2011; 54(2): 99-104.
14. Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell* 2004; 3(6): 1639-52.
15. Dunkel N, Blass J, Rogers PD, Morschhäuser J. Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol* 2008; 69(4): 827-40.
16. Coste A, Turner V, Ischer F, et al. A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating CDR1 and CDR2, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* 2006; 172(4): 2139-56.
17. Coste A, Selmecki A, Forche A, et al. Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates. *Eukaryot Cell* 2007; 6(10): 1889-904.
18. Rognon B, Kozovska Z, Coste AT, Pardini G, Sanglard D. Identification of promoter elements responsible for the regulation of MDR1 from *Candida albicans*, a major facilitator transporter involved in azole resistance. *Microbiology* 2006; 152(Pt 12): 3701-22.
19. Coste AT, Crittin J, Bauser C, Rohde B, Sanglard D. Functional analysis of cis- and trans-acting elements of the *Candida albicans* CDR2 promoter with a novel promoter reporter system. *Eukaryot Cell* 2009; 8(8): 1250-67.
20. Siikala E, Rautemaa R, Richardson M, Saxen H, Bowyer P, Sanglard D. Persistent *Candida albicans* colonization and molecular mechanisms of azole resistance in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) patients. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(12): 2505-13.