

FUNGAL HASTALIKLARDA GENOMİK VE PROTEOMİKLERİN YERİ VE ÖNEMİ

Sevtaç ARIKAN

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA
sevtaç.arikan@gmail.com

ÖZET

Mantar hastalıkları, önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olarak insan sağlığındaki önemini korumaktadır. Bir yandan yüzeysel mikozlar ve allerjik mantar hastalıkları en az eskisi kadar sık görülmeye devam ederken, öte yandan, fırsatçı mikozlar, immün sistemi baskılanmış olguların artması ve tanı ve tedavideki sorunlar nedeniyle daha da önemli bir grup olarak karşımıza çıkmaktadır. Mantarların genomik ve proteomik analizlerinin yapılmaya başlanması çok yeni olup, bu çalışmaların, yeni tanı yöntemlerinin ve yeni antifungal ilaçların geliştirilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Fırsatçı mikoz etkenleri içerisinde en sık saptanan cinsler olan *Candida* ve *Aspergillus* dikkate alındığında, genomik ve proteomik çalışmalarının konak-parazit ilişkilerinin ve antifungal direncin daha iyi anlaşılmasına yardım ettiği ve yeni ve potansiyel antifungal hedefleri ve tanı belirteçlerini belirleyebildiği görülmektedir. Genomik ve proteomik çalışmaları sonucunda geliştirilmiş bir antifungal ilaç ya da fungal tanı testi henüz mevcut değilse de, bu yöntemler, fungal tanı ve tedaviye katkı yönünden gelecek için ümit vericidir.

Anahtar sözcükler: *Aspergillus*, *Candida*, genomik, proteomik

SUMMARY

Utility and Significance of Genomics and Proteomics in Fungal Diseases

Fungal diseases remain as one of the significant causes of morbidity and mortality in humans. While superficial mycoses and allergic fungal diseases are at least as dominant as before, opportunistic mycoses now have even greater impact, due primarily to the increase in the number of immunosuppressed patients and the continuing difficulties in diagnosis and treatment. Fungal genomic and proteomic analysis are just emerging and may be helpful and facilitate the development of new diagnostic markers and novel antifungal targets. So far and considering *Candida* and *Aspergillus* as the most common causes of opportunistic mycoses, genomic and proteomic analysis appear to provide better understanding of the host-parasite relationship and antifungal resistance, and may determine new, potential antifungal targets and diagnostic markers. While none of these approaches have yet led to the development of novel antifungal drugs or new diagnostic tools, they remain promising for future contributions.

Keywords: *Aspergillus*, *Candida*, genomics, proteomics

Fungal hastalıklar insan sağlığındaki önemini günümüzde çeşitli nedenlerle korumaktadır. Bir yandan mantarlara bağlı gelişen yüzeysel enfeksiyonlar, yaşamı tehdit etmeyen ama yaşam kalitesini etkileyen ve halk sağlığı sorunu oluşturan özellikleriyle süregelmekte, öte yandan bağışıklık sistemi baskılanmış olgu sayısındaki artışla birlikte, yaşamı tehdit eden sistemik fırsatçı mantar enfeksiyonları giderek önem kazanmaktadır⁽⁶⁾.

Mantar enfeksiyonlarının tanısı zor ve sorunludur⁽⁴⁾. Erken tanı ve uygun tedavi, klinik

yanıtı olumlu yönde etkileyebileceğinden, özellikle fırsatçı mikozlar için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, bu enfeksiyonlar, erken tanıya yardımcı olabilecek yeni yöntemlerin ve yeni ilaçların araştırıldığı enfeksiyon gruplarından biridir. Öte yandan, mantar enfeksiyonlarının patogenezi ve konak-parazit ilişkileri ile ilgili bilgiler sınırlı olup, bu konuda da ayrıntılı verilere gereksinim bulunmaktadır. Bu yazıda, fırsatçı mikozların en sık görülen iki etkeni olan *Candida* (özellikle *Candida albicans*) ve *Aspergillus* (özellikle *Aspergillus fumigatus*) ile ilgili genom

ve proteom çalışmalarına değinilmiş, bu konu ile ilgili güncel bilgiler özetlenmiştir.

CANDIDA

Candida, tüm dünyada en sık görülen fırsatçı mikoz etkenidir. Nötropenik, hematolojik malignansisi olan olguların yanı sıra, yoğun bakım ünitelerinde tedavi görmekte olan hastalar, sistemik *Candida* infeksiyonlarının gelişmesi açısından risk altındadır. *Candida* infeksiyonlarının konvansiyonel tanısı zor ve sorunludur. Bu infeksiyonların tedavi seçenekleri de, bazı tür/suşlarda saptanan primer/sekonder antifungal direnç nedeniyle sınırlanmaktadır^(15,21).

Antifungal ilaç direncinin araştırılmasında ve yeni antifungal ilaç hedeflerinin saptanmasında genomik ve proteomik kullanımı

Genomik çalışmaları, *Candida* suşlarında antifungal direncin ve direncin moleküler temellerinin ortaya konmasında önemli ipuçları sağlamaktadır. Bu çalışmalar daha çok 'ATP-binding cassette' (ABC) ve 'Major facilitator super family' (MFS) efluks pompa genlerindeki ve ERG11 gibi hedef enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonların gösterilmesine yönelik olmuştur. Flukonazole dirençli bir grup *C.albicans* suşunun proteom analizi sonuçları, bazı proteinlerin (Grp2p, Ifd1p, Ifd4p, Ifd5p, Erg10p) azol direnci ile ilişkili olarak eksprese edildiğini göstermiş, bunlardan Erg10p'nin ergosterol sentezinin ilk basamağında rol alan enzim oluşu dikkati çekmiştir⁽⁹⁾.

Bu çalışmaların sonuçları antifungal direncin daha iyi anlaşılmasına hizmet ediyorsa da, günümüzde klinikteki önemleri sınırlıdır. Bunun nedeni antifungal direncin kliniğe yansıyan şeklinin moleküler olarak gösterilmesinin zor ve karmaşık oluşudur^(20,21). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, genomik çalışmalarının daha çok yeni antifungal ilaç hedeflerinin ortaya çıkmasında ve böylece gelecekte yeni ilaçların geliştirilmesinde yararlı olabileceği görüşü yaygınlık kazanmaktadır. Bu potensiyel hedeflerin, mantarlarda korunan, mantarın canlılığı için gerekli olan ve insanda bulunmayan bölgeler olması gerekmektedir⁽¹⁴⁾. Mantar hücre duvarı, bu özelliklere uygun olup, mantar hücre duvarının yapısının ve proteomik özelliklerinin anla-

şılması yeni çalışmalara öncülük etmektedir^(7,21).

Konak-patojen ilişkilerinin araştırılmasında ve *Candida* infeksiyonlarının tanısında genomik ve proteomik kullanımı

C.albicans ile ilgili proteomik çalışmaları 1980'li yılların başından beri yapılmakta ise de, bu çalışmaların *Candida* için yoğunlaşması ve kullanılmaya başlanması, *C.albicans*'ın genom sekansının belirlenmesi ve kütle spektrometresi teknolojileri ile ilgili gelişmeler sonucunda ve son beş yıl içinde gerçekleşmiştir. Genom sekans verileri bazı diğer *Candida* türleri için de belirlenmiş durumdadır⁽²¹⁾. *Candida*, hem normal florada bulunabilen, hem de uygun konak koşullarında sistemik, mortalitesi yüksek infeksiyonlara yol açabilen bir mikroorganizmadır. *Candida*'nın, kommensal ve patojen şekilleri arasındaki dengeyi, hem konak hem de mantara ilişkin faktörler belirler. Son dönemlerde yapılan proteomik çalışmaları, *Candida* infeksiyonlarının patogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak bilgiler de getirmiştir.

Candida için yapılan genomik çalışmaları, infeksiyon gelişimi sırasında bu patojenin virulans genlerini düzenlediğini ve önemli olarak bu seyir sırasında konak faktörlerine göre metabolizmasını ve stres yanıtlarını ayarladığını göstermektedir⁽⁶⁾.

Candida için konak-patojen ilişkileri yönünden proteomik çalışma alanları aşağıdaki başlıklarda özetlenebilir:

1. Hücre duvarı analizi: Bu amaçla yapılan çalışmalarda, *C.albicans*'ın maya ve hif formlarında hücre duvarında bulunan proteinlerdeki kalitatif ve kantitatif değişiklikler araştırılmıştır. Bu çalışmalarda, hücre duvarından, birçok protein (ısı şoku proteinleri-Hsp90p ve Ssa1p, translasyon elongasyon faktörleri ve glikolitik enzimler) izole edilirken, kovalen bağlı hücre duvarı proteinlerinin muhtemelen gerçek oranlarının altında saptandığı dikkati çekmiştir. Bu sonuçun, kovalen bağlı proteinlerin, heterojen glikozilasyon paternleri nedeniyle iki boyutlu poliakrimid jel elektroforezi (2D-PAGE) yöntemi ile uyumsuz olmasına ve saptanamamasına bağlı olabileceği düşünülmüştür⁽¹⁹⁾. Bu çalışmayı, *C.albicans*'ın hücre duvarındaki kovalen bağlı proteinlerin başka yöntemlerle gösterilmesinin

başarıldığı bir başka çalışma izlemiştir⁽⁵⁾.

2. Antifungal ilaç etkisi ile ortaya çıkan değişiklikler: Bu amaçla CA444 *C.albicans* suşu ile ve ekinokandin ve azol etkisini araştıran çalışmalar yapılmış, sonuçların bu iki grup antifungal için farklılık gösterdiği dikkati çekmiştir. Bu da, proteomiklerin, mantarın farklı mekanizmalarla işlev gören antifungal ilaçlara verdiği yanıtı birbirinden ayırt edebileceğini göstermiştir. Bu çalışmalar sırasında, Mvp1p'nin (ERG19)'un ekinokandin etkisi ile azalırken, azol etkisi ile arttığı gözlenmiştir. Bu bulgu, ekinokandine maruz kaldıktan sonra *C.albicans*'ın membranındaki ergosterol miktarının neden düşük bulunduğunu açıklamaktadır⁽¹⁾. Bu bulgular, genomik ve proteomik çalışmalarının, yeni bir antifungalın etki mekanizmasının anlaşılmasında önemli ipuçları sağlayabileceğini de göstermektedir⁽²¹⁾.

3. Sistemik *Candida* infeksiyonlarına immünoreaktif yanıt ve tanı: Bu amaçla, 2D-PAGE ve "immunoblot" yöntemleri kullanılarak, fare ve insan serumunda, infeksiyon sırasında ortaya çıkan proteinler ve bununla bağlantılı olarak aşı için ya da tanısal belirteç olarak aday olan proteinler araştırılmıştır. İnfeksiyon sırasında saptanan immünoreaktif proteinlerin büyük bir kısmının, glikolitik enzimler ve ısı şoku proteinleri olduğu görülmüştür^(16,17).

Mantar hücre duvarında bulunan ve sistemik kandidozu olan olgularda antikor oluşumuna yol açan proteinlerin araştırıldığı çalışmalarda, birçok immünoreaktif protein saptanmış, beta-1,3-glukozidaza karşı oluşan antikorların bu olguların serumlarında bulunduğu ve dolayısıyla sistemik kandidoz tanısında kullanılabilir bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür. Aynı zamanda, hücre duvarı enolazının invazif infeksiyona karşı koruyucu olduğundan ve tedavi yanıtının tahmininde kullanılabilir yeni bir prognostik belirteç olabileceğinden söz edilmiştir^(16,18). Henüz klinik önemi açık olmamakla birlikte, genomik çalışmalarla saptanmış hife ilişkili bazı moleküllerin (Hwp1) de tanısal rolü olabileceğine ilişkin veriler mevcuttur⁽¹³⁾.

4. Mayadan hife geçiş sırasında ortaya çıkan değişiklikler (dimorfizm): Bu konu ile ilgili olarak 2D-PAGE ile yapılan çalışmalarda

maya ve hif formları arasında proteinler yönünden çok küçük farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, 2D-PAGE'nin, baskın olarak çok miktarda bulunan proteinleri saptadığını, az miktarda bulunan ya da farklı biyokimyasal özellikleri olan proteinleri ise gösteremediğini düşündürmüştür⁽²⁾.

5. *C.albicans*'ın konak proteinlerine bağlanması: Bu çalışmalar, *C.albicans* adezinleri üzerine yoğunlaşmış, ilk olarak Hwp1p'nin konak dokusuna kovalen olarak bağlandığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, *C.albicans*'ın plazminojene bağlanan proteinleri 2D-PAGE yöntemi ile ayrıştırılmış⁽³⁾, *C.albicans*'ın enolazının da plazminojene bağlanabildiği gösterilmiştir⁽¹⁰⁾.

ASPERGILLUS

Aspergillus cinsi ile ilgili genomik çalışmaların geçmişi *Candida*'dan daha da kısa olup, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus clavatus* ve *Aspergillus terreus* gibi farklı türlerin genomları için sekans çalışmaları yapılmıştır. *Aspergillus* için proteomik çalışmaları ise henüz gerçekleşmektedir. Bu çalışmaların sonucunda, hücre yüzeyi ve başlıca metabolik yollarla ilişkili olan proteinlerin yanı sıra, *Aspergillus*'un ekstraselüler olarak salgılandığı proteinler de belirlenmektedir⁽¹¹⁾.

Bugüne dek, aspergillomlu ve allerjik bronkopulmoner aspergillozlu olguların serumlarında mevcut olan ve antikor yanıtına yol açan, *Aspergillus* ile ilişkili bazı allerjen proteinler belirlenmiştir. Bu allerjenlerin tanısal değeri araştırılmaktadır. Ayrıca, *A.fumigatus* ile yapılan proteom analizlerinde, mantarın stres durumunda ürettiği bazı gen ürünlerinin olduğu belirlenmiştir. Bunlardan birisi, tiyoredoksin peroksidaz AspF3 olup, bu proteinin potansiyel bir antijen olarak tanıda kullanılabilirliğinin değerlendirilmesinin gerektiği düşünülmektedir⁽¹²⁾.

Aspergillus'un proteom profilinin ortaya çıkıyor olmasının, hücre duvarı morfogenezinin daha iyi anlaşılmasına yardım etmesi ve gelecekte potansiyel antifungal hedeflerin ve tanısal antijenlerin saptanmasına yol göstermesi ümit edilmektedir^(11,12).

SONUÇ

Fungal genomik ve proteomik ile ilgili yapılan çalışmalar, antifungal direnç ve konak parazit ilişkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamakta, yeni antifungal ilaç hedefleri ve yeni tanısal belirteçlerle ilgili ufuklar açmaktadır. Ancak, bu çalışmaların geçmişi henüz çok kısa olup, elde edilen sonuçların klinik önemi ve uygulanabilirliği de henüz birçok yönden belirsizdir. Fungal genomik ve proteomik'in tanı ve tedaviye katkılarını, önümüzdeki yıllardaki gelişmeler belirleyecektir.

KAYNAKLAR

1. Bruneau JM, Mailet I, Tagat E et al: Drug induced proteome changes in *Candida albicans*: comparison of the effect of beta (1,3) glucan synthase inhibitors and two triazoles, fluconazole and itraconazole, *Proteomics* 2003;3(3):325-36.
2. Choi W, Yoo YJ, Kim M, Shin D, Jeon HB, Choi W: Identification of proteins highly expressed in the hyphae of *Candida albicans* by two-dimensional electrophoresis, *Yeast* 2003;20(12):1053-60.
3. Crowe JD, Sievwright IK, Auld GC, Moore NR, Gow NA, Booth NA: *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins, *Mol Microbiol* 2003;47(6):1637-51.
4. Cuenca-Estrella M, Bernal-Martinez L, Buitrago MJ et al: Update on the epidemiology and diagnosis of invasive fungal infection, *Int J Antimicrob Agents* 2008;32(Suppl 2):S143-7.
5. de Groot PW, de Boer AD, Cunningham J et al: Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesions, *Eukaryot Cell* 2004;3(4):955-65.
6. Fradin C, De Groot P, MacCallum D et al: Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood, *Mol Microbiol* 2005;56(2):397-415.
7. Gozalbo D, Roig P, Villamón E, Gil ML: *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy, *Curr Drug Targets Infect Disord* 2004;4(2):117-35.
8. Groll AH: Invasive opportunistic mycoses: clinical trials review, 2007-2008, *Curr Infect Dis Rep* 2008;10(6):451-3.
9. Hooshdaran MZ, Barker KS, Hilliard GM, Kusch H, Morschhäuser J, Rogers PD: Proteomic analysis of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(7):2733-5.
10. Jong AY, Chen SH, Stins MF, Kim KS, Tuan TL, Huang SH: Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells, *J Med Microbiol* 2003;52(Pt 8):615-22.
11. Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR: The state of proteome profiling in the fungal genus *Aspergillus*, *Brief Funct Genomic Proteomic* 2008;7(2):87-94.
12. Kniemeyer O, Lessing F, Brakhage AA: Proteome analysis for pathogenicity and new diagnostic markers for *Aspergillus fumigatus*, *Med Mycol* 2008;24:1-7 (Epub ahead of print).
13. Naglik JR, Fostira F, Ruprai J, Staab JF, Challacombe SJ, Sundstrom P: *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease, *J Med Microbiol* 2006;55(Pt 10):1323-7.
14. Odds FC: Genomics, molecular targets and the discovery of antifungal drugs, *Rev Iberoam Micol* 2005;22(4):229-37.
15. Picazo JJ, González-Romo F, Candel FJ: Candidemia in the critically ill patient, *Int J Antimicrob Agents* 2008;32(Suppl 2):S83-5.
16. Pitarch A, Abian J, Carrascal M, Sánchez M, Nombela C, Gil C: Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies, *Proteomics* 2004;4(10):3084-106.
17. Pitarch A, Díez-Orejas R, Molero G: Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model, *Proteomics* 2001;1(4):550-9.
18. Pitarch A, Jiménez A, Nombela C, Gil C: Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses, *Mol Cell Proteomics* 2006;5(1):79-96.
19. Pitarch A, Sánchez M, Nombela C, Gil C: Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome, *Mol Cell Proteomics* 2002;1(12):967-82.
20. Sanglard D, Odds FC: Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences, *Lancet Infect Dis* 2002;2(2):73-85.
21. Weig M, Brown AJ: Genomics and the development of new diagnostics and anti-*Candida* drugs, *Trends Microbiol* 2007;15(7):310-7.

Panel 2 sunuları

VENTİLATÖR İLİŞKİLİ PNÖMONİ

Yöneten: **Nuran SALMAN**

- Çocuk yoğun bakımda komplikasyonlar
Agop ÇITAK
- Çocuklarda ventilatör ilişkili pnömoni etkenleri ve direnç
Nezhat GÜRLER
- Çocuklarda ventilatör ilişkili pnömoni tedavisi
Solmaz ÇELEBİ