

TÜBERKÜLOZ BASİLİNİN KAYNAĞI VE EVRİMİ

Prof Dr Fatih KÖKSAL

Ç.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ADANA

Tüberküloz tüm dünyada insan sağlığını tehdit eden en önemli enfeksiyonlardan birisidir. Yaklaşık olarak 60 milyondan fazla kişinin enfekte olduğu, her yıl 8 milyon kişide aktif enfeksiyon geliştiği ve yaklaşık olarak 3 milyona yakın kişinin de tüberküloz sebebi ile öldüğü Dünya Sağlık Örgütü tarafından bildirilmektedir. Ailede bir ferden tüberkülozlu olması halinde diğer fertlerde tüberküloz gelişme riskinin %30 olduğu da bildirilmektedir. Son yıllarda HIV epidemisi ile yeniden önem kazanan tüberküloz epidemisinde bir diğer önemli problemde çoklu ilaç direnci gösteren suşların popülasyondaki artışıdır. İlk insanla birlikte var olduğu düşünülen tüberküloza ait deliller M.Ö. 4000 ila 2400'lü yıllarda eski Mısır'da Firavunlar döneminden kalma Thebes bölgesinde bulunan 85 mumyadan alınan organik materyalden ARB, PCR ve IS6110- RFLP ile ispatlanmış, spoligotipleme ile de suş tayini yapılabilmektedir. Yine bu döneme ait kemik kalıntılarında tüberküloza ait Pott's hastalığına bağlı kemik lezyonlarının gösterilmesi, vazo ve testi gibi sanat eserleri üzerinde ki figürlerde kemik lezyonlu hastaların tanımlanması bu dönemde tüberkülozun yaygınlığı hakkında fikir vermektedir. Hipokrat M.Ö. 460'lı yıllarda "fitizis"i klinik olarak tanımlamış ve eski Yunan literatürüne tüberkülozu yerleştirmiştir.

Amerika'da precolombian dönemde tüberkülozun sık görüldüğü Peru'da izotopkarbon analizi ile yaklaşık 1000 yaşından daha büyük olduğu tahmin edilen spontan olarak mumyalaşmış bir kadına ait akciğer dokusundaki lezyonda IS6110 ile M.tuberculosis'in varlığı gösterilmiştir. Asya'da egemen olan M.tuberculosis Beijing suşunun 13. yy 'da Moğol istilası ile yayıldığı ileri sürülmüştür. Ancak Kuzey Amerika'ya mikobakterilerin Bering boğazından geçen insanlar ve hayvanlarla taşındığını ileri süren iddialarda mevcuttur. Bu taktir de Asya'daki tüberküloz suşlarının yaklaşık 100.000 yıl önce Afrika'dan çıkan 2. insan göçü ile Asya'ya ulaştığı söylenebilir.

Eski Avrupa'da da son derece yaygın olduğu düşünülen tüberkülozun 15-17

yy.larda Avrupa toplumunun % 25'ini enfekte ettiği Litvanya'da toplanan ve tuberk loza ait kemik lezyonları olan insan kemik ve diş örneklerinde IS6110 RFLP yöntemi ile M.tuberculosis kompleksine ait bakterilerin varlığının gösterilmesi ile ispatlanmıştır. Dişlerdeki lezyonlarında o dönemde hastalığın sıklıkla bakteriyemiye sebep olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Multiplikasyon süresi 24 saat olan mikobakterilerin bu sebeple kronik enfeksiyonlar oluşturduğu söylenebilir. Ancak M.tuberculosis suşları arasındaki klonal oluşumlar, konak spesifitesini yaratan fenotipik özelliklerin genetik karşılığı, antimikotiklere direnç, bağışıklık ve asemptomatik taşıyıcılığın sebepleri gibi tüberküloz kontrolünde önemli olan soruların cevaplanması, popülasyon bazlı genetiğe dayalı epidemiyolojik ve filogenetik çalışmalarla verilebilir. Oysa kompleks içerisinde yar alan suşlar arasında striktürel genlerdeki %99.9 oranına ulaşan konservatif yapı, otolog genlerdeki çok düşük oranlarda görülen ve protein sentezini etkilemeyen sessiz polimorfizm ve identik olan 16S rRNA geni bu soruların cevabını güçleştirmektedir. İnsanlarda ciddi enfeksiyon hastalıklarına sebep olan salmonella , stafilokok veya koliform basiller gibi major bakteriyel patojenlerde klonal farklılaşma için otolog genlerde en az %1'lik polimorfizm beklenirken M.tuberculosis kompleksinde yer alan bakterilerde sinonim polimorfizm %0.0038-0.0047 gibi son derece düşük oranlardadır.İşte bu stabil yapı M.tuberculosis kompleksi bakterilerle oluşan enfeksiyonları anlamamızı güçleştirirken bu mikroorganizmalarında klonal farklılaşmalarını on binlerce yıl önce tamamlamış olduklarını veya muhtemel mutasyonlara karşı tamir mekanizmalarının çok güçlü çalıştığını düşündürmektedir.Ancak mikobakterilerde genetik mutasyonlar iki şekilde devam etmektedir.Bunlardan ilki fenotipe yansayan sonuçlar doğurmaktan öte klonal farklılıklara yol açan insersiyon segmentleri veya hareketli , random tekrarlanan dizilerde görülen polimorfizm,diğer de antibiyotiklere direnci sağlayan nokta mutasyonlarıdır.Diğer bakterilerden farklı olarak mikobakterilerde antibiyotik direncinin plazmidler yerine kromozomda kodlanıyor olması ve bakterinin gerekli g rd ğu halde nokta mutasonları ile antibiyotiklere direnç geliştirmesinin mümkün olması M.tuberculosis kompleksinde yer alan mikroorganizmalarda bu tip nokta mutasyonlarının sonsuza kadar süreceğini göstermektedir. Nitekim M.tuberculosis'de mutasyonların % 95'i antibiyotik direncine sebep olan nokta mutasyonları şeklinde dir.Fakat filogenetik

olarak tuberküloz basillerinde striktürel genlerde meydana gelen en son atasal değişiklik nedir ve bu hangi konakta yaşanmıştır, konak spesifitesini yaratan genetik olay nedir gibi tüberküloz patojenitesini ve epidemiyolojisini aydınlatacak ve hastalığın yayılımında geleceğe yönelik stratejilerin tespitinde son derece önemli olan sorular yakın bir geçmişe kadar büyük ölçüde cevaplanamamıştı.

M. tuberculosis H37Rv genom analizinin yapılması dünya genelinde izole edilen suşlardaki biyolojik farklılıkların anlaşılmasını ve karşılaştırılmasını kolaylaştırmıştır. Nitekim fenotipik özellikler ve konak spektrumundaki genişlik dikkate alınarak M. tuberculosis kompleksinin atası olarak kabul edilen ve birbirinin benzeri olan gen allelelerinde bu iddiaya delil olarak gösterilen M. bovis teoremi BCG suşu, M. tuberculosis H37Rv suşu ve M. bovis AF2122/97 suşu genomlarının karşılaştırılması ve delesyonel mutasyonların daha iyi anlaşılmasından sonra tartışılır hale gelmiştir. Son yıllarda geliştirilen moleküler metodlarla popülasyon genetiğine yönelik daha inandırıcı çalışmaların mümkün olması ve antik dönemlere ait bol miktarda biyomateriyalin bu yöntemlerle değerlendirilmesi gerek epidemiyolojik takip gerekse mikobakterilerin evrimi ve klonal farklılaşmanın tarihi hakkında değerli bilgilere ulaşmamıza sebep olmuştur. Bu çalışmalarda, direkt tekrarlayan bölgelerin (DR) polimorfizmi ve DR-RFLP kalıpları, DR bölgeleri arasındaki spacer oligonucleotide dizilerinin polimorfizmi (spoligotipleme), double-repetitive elementlerin- polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması (DRE-PCR) ve IS6110-RFLP-prohibridizasyon yöntemi, polimorfik GC-zengin dizilerin RFLP kalıpları ve major polimorfik tandem tekrarlar gibi moleküler epidemiyoloji ve mikobakterilerin filogenetik özelliklerinin yapılandırılmasına çalışılmıştır.

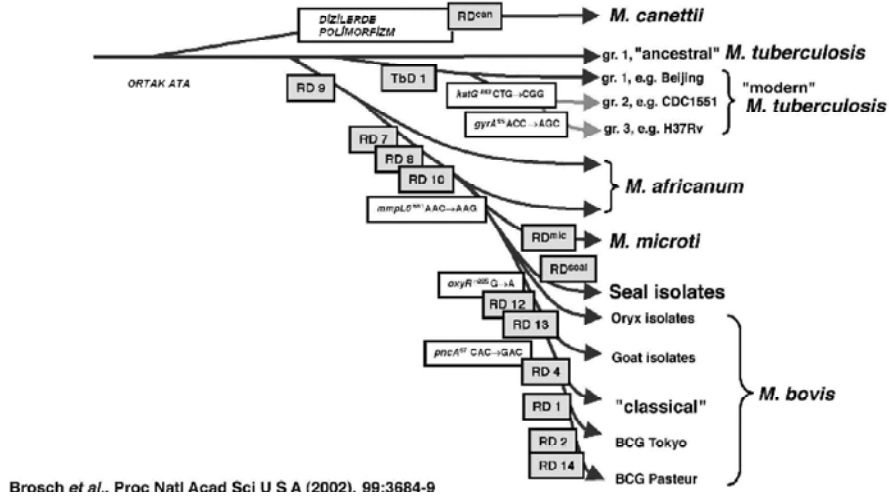
Tüberkülozun moleküler epidemiyolojisini tespit için en sık kullanılan yöntem IS6110 bölgesini RFLP yöntemi ile kesilip uygun proplarla hibridize edilmesi yöntemidir. IS6110 M. tuberculosis kompleksinde yer alan suşlar için spesifik olup gendeki dağılımları ve sayıları suşlar arasında farklılıklar göstermekle birlikte sayıları 30-0 arasında değişen 1335 bp uzunluğundaki dizilerdir. Ancak suş içerisindeki sayı ve yerleri son derece stabildir. Bu stabilite IS6110'u moleküler epidemiyoloji için güvenli bir marker haline getirmektedir. IS3 ailesi segmentleri içerisinde yer alan IS6110 kullanılan tekniğe bağlı zorluk, standardizasyonsuzluk

ve zamana bağılı sonuç yaratmak gibi önemli dezavantajların yanı sıra diğer IS taşıyan bakterilerde görüldüğü üzere sadece klonal ilişkisi olan birbirine yakın epidemiyolojik öneme sahip sonuçlar üretebilmektedir. Buda popülasyon epidemiyolojisi için olmasa bile filogenetik ilişkisizliği ortaya koymada yetersiz mi sorusunu akla getirmektedir.

Filogenetik ilişkilerin tespitinde kullanılan bir diğer genetik marker da DR bölgesi ve onu sınırlandıran spacer bölgelerdir. DR bölgeleri *M.tuberculosis* kompleksi bakterilerin genomunda yerleşen ve 36-41 bp uzunluğunda özel spacer dizilerle bir birlerinden ayrılmış 36 bp uzunluğunda tekrarlayan polimorfik lokuslardır. Bir DR ve takip eden spacer dizi DVR olarak tanımlanan bir dizi kümesini oluştururlar. İşte IS6110 da olduğu gibi suşlara arasında bu DVR'lerin yeri sayıları ve büyüklükleri değişir yani polimorfizm gösterir. Özellikle spacer bölgelerdeki polimorfizmi hedef alan spoligotipleme hem epidemiyolojik hemde filogenetik öneme sahip bir genetik markerdir. DVR'lerdeki polimorfizmin sebebi uzak veya yakın lokuslardaki homojen rekombinasyonlarla izah edilmektedir ki bu da filogenetik olarak anlamını azaltmaktadır.

Mikobakterilerde evrim süreci ve filogenetik ilişkilerin izahı *M.tuberculosis* H37Rv suşunun gen haritasının çıkartılması ve *M. bovis* AF2122/97 suşunun gen haritası ile karşılaştırılması ile netlik kazanmıştır. *M.tuberculosis* H37Rv genomunda moleküler büyüklükleri 2 ila 12.7 kb arasında değişen delesyona açık 14 değişken bölge (region different –RD1-14), H37Rv için spesifik 5 değişken bölge (RvD1-5) ve *M.tuberculosis* için spesifik olan bir değişken bölge (TbD1) olmak üzere toplam 20 değişken delesyona açık bölge gösterilmiştir. Bu bölgelerde evrimsel öneme sahip 3 farklı delesyon şekillenmektedir. Bunlardan ilkinde mobil elementler olan, phiRv1 (RD3) ve phiRv2 (RD11) profajlar ile insersiyon dizileri IS1532 (RD6) ve IS6110 (RD5)'de delesyonel mutasyonlar şekillenir. İkinci tip delesyonel mutasyonlar ise bitişik insersiyon elementleri (IS6110) arasındaki homolog rekombinasyonlar sonucu ortaya çıkar. Burada arada *M.tuberculosis* için spesifik DNA dizilerinin (RvD2, RvD3, RvD4, ve RvD5) bir veya bir kaçının kaybı söz konusu olur. Bu mutasyonlar da suşlar arasında değişkenlik gösterirler. Öncü mutasyon tipide genel anlamda tekrarlayan dizileri etkilemeyen dizilerin uç kısımlarında görülen delesyonel mutasyonlardır. Sonuçta ucu kesilmiş genler oluşur ki bunlar

M.tuberculosis kompleksinin diğer suşlarında intaktır. Bu tip delesyonlara neyin yol açtığı hala kesin değildir. DNA polimeraz enzimindeki kaymaların kesik uçlu delesyonlara yol açtığı düşünülmektedir. İşte bu delesyonel elementler (RD1-14, Rv1-5 ve Tbd1) ve ortaya çıkan delesyonel mutasyonlar *M.tuberculosis* kompleksinde yer alan suşların evrimsel ve filogenetik özelliklerinin tespitinde yol gösterici olmuştur. Bu tespitler ışığı altında *M.tuberculosis* için spesifik olan TbD1 bölgesinin bütün *M.tuberculosis* suşlarında olmadığı, bu bölgeyi taşıyan suşların atasal-eski-*M.tuberculosis* suşları, bu bölgeleri delesyona uğramış suşlarında modern *M.tuberculosis* suşları olarak tanımlanması gerektiği ve eski *M.tuberculosis* suşunun *M.tuberculosis* kompleksinin atası olduğu ileri sürülmüştür. TbD1 mutasyonu olmayan bu suş orjinaldir ve hiçbir delesyone mutasyona uğramamıştır. Atasal *M.tuberculosis* suşuna son derece yakın olan *M.canettii* sadece bu suşlarda görülen RDcan mutasyonu sebebi ile Modern *M.tuberculosis* suşlarındaki genetik kırılma meydana gelmeden çok önce atasal suşun mutasyonu ile ortaya çıkmıştır. Yine atasal/eski *M.tuberculosis* suşundan mutasyonla TbD1 kırılması olmadan önce RD9 ve müteakiben RD7, RD8, RD10, RD12, RD13, RD1, RD2 ve RD14 bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar sırası ile *M.africanum*, *M.microti* ve *M.bovis* suş ve subtiplerinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Yani eski *M.tuberculosis*, *M.bovis*'inde atasıdır. Nitekim *M.bovis*in genomu delesyonlar sebebi ile atasal *M.tuberculosis* suşunun genomundan daha küçüktür. Çünkü kompleksin diğer üyelerinde görülen RD1, RD2, RD4, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13 ve RD14 gibi değişken bölgeler coğrafi bölge ve fenotipik özellik dağılımı göstermeksizin tüm *M.tuberculosis* suşlarında korunmuştur. *M.tuberculosis* suşlarında sadece profaj phiRv1 (RD3) ve profaj phiRv2 (RD11) ile IS1532 (RD6) ve IS6110 (RD5) gibi insersiyon segmentlerinde homojen rekombinant veya delesyonel mutasyonlar görülebilir. Bu mutasyonlarda genomun büyüklüğünü *M.bovis*'deki kadar etkilemez. *M.tuberculosis* suşlarında en sık mutasyonlar *M.tuberculosis* için spesifik olan TbD1 ve RvD bölgelerinde görülür. Yukarıda da bahsedildiği gibi Haarlem, Beijing, ve Afrika subtipleri olarak tanımlanan modern *M.tuberculosis* suşların tamamında, mmpS6 ve mmpL6 olarak tanımlanan ve bir membran proteininin kodlayan, TbD1 spesifik bölgesi delesyona uğramıştır. Ayrıca RvD2 ve RvD3 bölgeleri Beijing suşlarında delesyona uğramış RvD2 yerine RvD5 gelmiştir. (Şekil:1)



Şekil 1: M. tuberculosis kompleksi bakterilerinin evrimi

M.tuberculosis kompleksinde yer alan suşların striktürel genlerde, özelliklede oxyR, pncA, katG, ve gyrA gen dizilerinde görülen sinonim ve non sinonim nokta mutasyonlarında evrimsel gelişim ile ilgisi vardır. Sreevatsan S. ve arkadaşları katG kodon 463 (katG⁴⁶³) ve gyrA kodon 95 (gyrA⁹⁵)’deki dizi polimorfizmi dikkate alarak M.tuberculosis kompleksi içerisinde yer alan basilleri 3 gruba ayırmışlardır.

Grup 1 içerisinde : katG⁴⁶³ CTG (Leu), gyrA⁹⁵ ACC (Thr);
 Grup 2 içerisinde : katG⁴⁶³ CGG (Arg), gyrA⁹⁵ ACC (Thr);
 Grup 3 içerisinde: katG⁴⁶³ CGG (Arg), gyrA⁹⁵ AGC (Ser) nokta mutasyonuna sahip suşlar bu gruplara yerleştirildi. Bu şemaya göre TbD1 delesyonu olan modern suşlardan Beijing’ler grup 1’de ,Harlem ve Afrika grubu grup 2 de, H37Rv ve H37Ra da 3. grupta yer almaktadır.İlginç olan TbD1 delesyonu olmayan suşlar tüm atasal suşlarda olan katG⁴⁶³’de leucine (CTG) yer alıyordu ki bu da atasal suşların grup 1 de yani TbD1 taşıyan suşlar içerisinde yer alması gerektiğini ortaya koymaktadır.Tabi bu sonuç Sreevatsan S. ve arkadaşlarının kompleksin tespit edilebilen en eski atası M.bovis’tir önermesi ile de çalışmaktadır. Evrimsel süreçle ilgili bir diğer dikkate alınması gereken iddia da Gutierrez MC ve arkadaşlarının doğu Afrika’daki Djibouti’de yaşayan veya yaşamış pulmoner veya ekstrapulmoner tüberkülozlu hastadan izole ettikleri yuvarlak tüberküloz basillerinin yapısal genlerini diğer kompleks üyelerinin otolog genleri ile kıyasladıkları çalışmaya dayattıkları prototüberküloz basiline ait teoridir. Bu grup izole ettikleri yuvarlak

mikobakterilerin *M.tuberculosis* kompleksi üyesi olduğunu 3.387 bp uzunluğundaki *katG*, *gryB*, *gryA*, *rpoB*, *hsp65* ve *sodA* striktürel genler ile 16S rRNA homolojisini dikkate alarak belirlemişler, daha sonra bu genler ile mobil elementler olan DR lokusu ve IS, özellikle IS1081 genlerindeki mutasyonları karşılaştırmışlardır. Sonuçta TbD1 ve RD bölgelerinde mutasyonu bulunmayan bu yuvarlak suşların insanlarda nadiren enfeksiyon oluşturan *M.canettii* suşlarının atası olduğunu, *M.canettii*'de RD12cam mutasyonunun ilk evrimsel kırılmayı oluşturduğunu bunu peş peşe gelişen mutasyonel delesyonlarla ortaya çıkan kompleksin diğer suşlardaki kırılmaların izlediğini belirtmişlerdir. *M.prototuberculosis* olarak tanımladıkları bu yuvarlak suşlardan mutasyonlarla ortaya çıkan kırılmalarında en az 2.5 veya 3 milyon yıl önce başladığını belirtmişlerdir.

Sonuç olarak *M.tuberculosis* kompleksinde yer alan suşların filogenetik özellikleri konak mikroorganizma ilişkisinin özelliklerinin belirlenmesi ve geleceğe yönelik tüberküloz kontrol programlarının düzenlenmesinde son derece önemlidir. Mevcut moleküler epidemiyolojik yöntemler gerek evrimsel ilişkinin tespiti gerekse popülasyon bazlı epidemiyolojik çalışmalar için duyarlı sonuçlar üretebilecek yetenektedir. Ancak striktürel genlerdeki polimorfizm, mobil elementlerdeki delesyonel mutasyonlar ve fenotipik karakterleri esas alan mevcut bulgulara dayanarak *M.tuberculosis* kompleksin filogenetik ilişkileri hakkında kesin hükme varmak mümkün görülmemektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, et al. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 9869–9874(1997)
- 2- Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. PLoS Pathog 1(1): e5(2005)
- 3- Buikstra JE. Paleoepidemiology of tuberculosis in the Americas. In: Palfi G, Dutour O, Deak J, Hutas I, editors: Tuberculosis: past and present. Szeged, Hungary: Golden Book Publisher Ltd.; 1999. p. 479-94.

- 4- Ortner DJ. Paleopathology: implications for the history and evolution of tuberculosis. In: Palfi G, Dutour O, Deak J, Hutás I, editors. Tuberculosis: past and present. Szeged, Hungary: Golden Book Publisher Ltd; 1999. p. 255-61.
- 5- Zink, A., C. J. Haas, U. Szeimies, U. Reischl, and A. Nerlich. Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *J. Med. Microbiol.* 50:355-366, 2001
- 6- Baker, L., Brown, T., Maiden, M.C., and Drobniewski, F. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1568-1577, 2004.
- 7- Sola, C., I. Filliol, C. Gutierrez, I. Mokrousov, V. Vincent, and N. Rastogi. An update of the Spoligotype database of *Mycobacterium tuberculosis*: analysis of the biogeographical distribution of shared-types and epidemiological and phylogenetical perspectives. *Emerg. Infect. Dis.* 7:390-396. 2001.
- 8- Sola, C., I. Filliol, E. Legrand, I. Mokrousov, and N. Rastogi. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. *J. Mol. Evol.* 53:680-689, 2001.
- 9- Igor Mokrousov , Ho Minh Ly , Tatiana Otten (et.al) Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: Clues from human phylogeography *Genome Research* 15:1357-1364, 2005
- 10- Banu, S., Gordon, S.V., Palmer, S., Islam, M.R., Ahmed, S., Alam, K.M., Cole, S.T., and Brosch, R.. Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Bangladesh and prevalence of the Beijing strain. *J. Clin. Microbiol.* 42: 674-682, 2004