

TÜBERKÜLOZDA MİKOBAKTERİYEL PERSİSTANS MEKANİZMALARI

Doç. Dr. Nuran ESEN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,
İzmir

Tüberküloz bilinen en eski enfeksiyon hastalıklarından olmasına rağmen günümüzde önemini koruyan bir halk sağlığı sorunudur. Bu büyük sağlık tehdidine karşı korunma ve tedavi hala sınırlıdır. Son 40 yılda birincil seçenek yeni bir ilaç ortaya konamamış, etkin güvenli bir aşı hala bulunamamıştır. Bu kısıtlılıklar; konak-patojen etkileşimlerini düzenleyen hücresel ve moleküler mekanizmaların açıklanması ve patolojik temelini daha iyi anlaşılmasını gerektirmektedir. Mikobakteriyel virulans faktörleri ve konağın bağışıklık sistemi arasında ömür boyu süren ilişkiyle değişen belirtiler veren tüberküloz patogenezi oldukça karmaşıktır. Bağışık yanıtın başlatılarak bakteri üremesinin durdurulması ve ağır semptomatik hastalığın engellenmesi de tehlikesiz değildir. Bu lezyonlar içinde mikobakteriler yıllarca canlı kalabilirler. Daha sonraki yıllarda bağışıklık sisteminin baskılanması bakterilerin lezyondan kaçarak yeniden çoğalmaya (reaktivasyon) neden olur. Reaktivasyonda bulaştırıcılık ve doku hasarı primer TB'dan farklı değildir. Risk faktörü olmayan M. tuberculosis ile enfekte kişilerde reaktivasyon gelişme olasılığı hayat boyu %2-23 iken, HIV (+) olanlarda bu oran her yıl için %5-10'dur.

Bakteri ve makrofajlar arasındaki ilk etkileşim hem yardımcı T (CD4+) hem de sitotoksik T (CD8+) hücre yanıtına neden olur. Her ne kadar enfeksiyonun kontrol altına alınmasında iki tip T hücre yanıtları arasında farklılıklar olsa da her ikisi de konak savunmasına katkıda bulunmaktadır. M.tuberculosis fagositler içinde çoğaldığından CD4+ T hücrelerinin antikor üretimini uyarması yararsızdır. Fakat salgılamaya neden olduğu IFN-, enfeksiyonun başlangıcında makrofaj aktivasyonunu uyarmaktadır. IFN- endotel hücrelerini de uyarır, böylece T hücrelerine bağlanmasını sağlayarak damar içinden komşu dokuya geçmesini ve enfekte bölgeye yönelmesine neden olur. Daha az IFN- salgılamaya neden olan CD8+ T hücreleri ise bakteriyi yok edemeyen enfekte fagositleri öldürür. Böylece

serbest kalan bakteriler aktif makrofajlar tarafından alınarak öldürölür. Makrofaj ve dendritik hücreler; M.tuberculosis'in ilk enfeksiyonunda doğal immun yanıtta rollerine ek olarak hem yayılmayı sağlayan hem de konak dokularının yıkımına katkıda bulunan TH1 tarafından yönetilen, kuvvetli hücresel bağışıklık yanıtı sağlar. Sağlıklı bir erişkin göreceli olarak düşük sayıda bakteriye maruz kaldığında aktif makrofajlar akciğerlerde belirgin hasar olmadan erken dönemde enfeksiyonu durdurur. Bu kişilerde deri testi pozitifleşir fakat semptomatik tüberküloz gelişmez. Bebek ya da hızlı ve etkin T hücre yanıtını başlatamayan erişkinlerde ise aktif makrofajlar hastalığın daha geç süreçlerine kadar belirmediklerinden bakteriler akciğer makrofajlarında çoğalmaya devam ederler. Fagositik hücrelerin enfeksiyonu temizleyememesi nedeniyle T hücreler, PMNL ve makrofajlar bakterilerin ürediğı bölgelere yönelmeye devam ederler. Bakterilerin çevresindeki makrofajlar dev hücre oluşturmak üzere birleşirler. Bakteri içeren hasarlı dokunun oluşturduğu üreme odağının çevresinde makrofaj ve T hücreleri bir katman oluştururlar. Bazı olgularda fagositler bakteriyi öldüremese de T hücre ve makrofajlar üreme odağını tüberkül adı verilen kalın fibrin tabakayla kapatırlar. Tüberküller sonunda kalsifiye olurlar ve akciğer radyografilerinde görünür lezyonlar oluştururlar. Oluşan tüberküller makroskopik olarak granulomlara benzediğinden tüberküllerin oluşumuna neden olan hücresel yanıtı granulomatöz yanıt denir.

Tüberküloz granulomu mikobakteriyel enfeksiyonda gerekli olsa da her zaman mikroorganizmayı ortadan kaldıramayabilir. Bu nedenle konak için yararlı olduğu fakat bağışık yanıt nedeniyle etkinliğinin yetersiz olabileceğı düşünölmektedir. Mikobakterilerin RD1 lokusları, bilinmeyen mekanizma ile virulansı arttıran özelleşmiş gizleme sistemini kodlamaktadır. Enfeksiyon sürecini gerçek zamanlı olarak takip etmek için şeffaf zebra balığı embriyosu kullanılmış, RD1'den yoksun bakterinin enfekte makrofaj içinde üreyebilme yeteneğine rağmen etkin bir granulom yapamadığı saptanmıştır. Virulan mikobakterilerle enfekte makrofajların RD1'e bağımlı sinyal ürettiğı böylece makrofajların granulom oluşturmak üzere bir araya toplandıkları gösterilmiştir. Mikobakteriler tarafından indüklenen makrofaj agregasyonu hücreler arasında bakteriyel yayılım ve bakteri sayısının artışı ile sıkı ilişki içindedir.

M. tuberculosis'in reaktif olmadan enfekte kişinin akciğerinde yıllarca canlı kalabilmesini sağlayan persistans faktörleridir. Latent enfeksiyon sırasında bakterinin nerede olduğu tam olarak belirlenememektedir. Birçok bilim adamı akciğerlerdeki tüberküller içinde veya akciğerlerle ilişkili lenf düğümlerinde olduğunu söylerken, bazıları akciğer dışı organlarda da reaktivasyon olduğunu savunmaktadır. Bu hipotez, latent bakterinin akciğerler dışında da gizlenebilme olasılığını arttırmaktadır.

Bu kadar süre bakterinin nasıl canlı kaldığı da bilinmeyenlerdendir. Mikobakteriler spor oluşturmaları da latent dönemde, spor gibi metabolik olarak inaktif oldukları fakat aktif forma dönüşebildikleri kabul edilmektedir. M. tuberculosis'te bulunan bazı genler Streptomyces türlerinde sporulasyonu düzenleyen genlerle benzerlik göstermektedir. Spor hipotezine uygun olarak M. tuberculosis'te de sigma faktörünü kodlayan sigF duraklama fazında eksprese edilmektedir. Bunun karşısında olan hipotez ise bakterinin metabolik aktif fakat sayısının düşük oluşudur. Antibiyotiklerin sadece metabolik olarak aktif bakterilere etkili olduğu varsayıldığında tedavi ile reaktivasyon olasılığının azalması bu hipotezi desteklemektedir.

Tüberküloz reaktivasyonu için 1950'li yıllarda bir hayvan modeli geliştirilmiştir. M. tuberculosis'e çok duyarlı olan farelerde de insanlardakine benzer akciğer lezyonları gelişmektedir. M. tuberculosis inoküle edilen farelere verilen tedavi 12 hafta sonunda kesilmiş, tedavinin verilmediği ilk dört haftada iyileştikleri gözlenmiştir. Bu dönemde organlarda görülemeyen mikobakteriler PCR ile saptanmıştır. Ardından 8 haftalık tedavisiz geçen dönemde hayvanların 1/3'ünde reaktivasyon meydana gelmiş ve ölümlerine neden olmuştur. Hayvanlarda reaktivasyon modeli, bakterinin persistansı için önemli görünen sigF ile beraber iki genin de tanımlanmasını sağlamıştır. Bunlardan kristalin adı verilen proteini kodlayan acr geni, öncelikle duraklama fazında eksprese edilerek şaperonu kodlamaktadır. Bu gendeki bozukluk bakterinin persistansını azaltmaktadır. Diğer gen ise gliksilat döngüsünde yer alan enzimlerden izositrat liyazdır. Bu gendeki bozukluk da hayvan modelinde persistans fenotipinde kayba neden olmaktadır.

M. tuberculosis tüm organ ve dokularda hastalık oluşturabilmesine rağmen hücresel yönelimi makrofajlar, monositler ve dendritik hücreler gibi mononükleer fagositlerdir. Tüberküloz patogenezinde esas olarak *M. tuberculosis* ile makrofajlar arasındaki etkileşim rol oynamaktadır. Fagozomun bakterisidal fagolizozoma olgunlaşması makrofajlar ve fagositik lökositlerde doğal bağışık yanıtın esas mekanizmasıdır. Fagolizozom zarla çevrili kapalı bir bölüm oluşturarak aktif makrofajların antimikrobial yanıtlarının yoğunlaşmasını sağlarken sitotoksik ürünlerin konağın bileşenlerine erişimini kısıtlamaktadır.

Fagolizozom olgunlaşmasının engellenmesiyle mikobakteriler makrofajların doğal yanıtından kurtulurlar. Mikobakterilerin engellediği fagozom olgunlaşmasının hücre içi sinyal iletim sistemi ile düzenlendiği ileri sürülmektedir. Bu konuda yapılan deneysel çalışmalar, kullanılan mikobakteri türü ve makrofajların elde edildiği canlı türünden etkilenmektedir. Bağışıklık sistemi sağlıklı kişiler için patojen olmayan *Mycobacterium bovis* BCG ve *M. tuberculosis*'den daha az virulan olan *Mycobacterium avium* intracellulare makrofajlar tarafından öldürülürken *M. tuberculosis* canlı kalmakta ve hücre içinde çoğalmakta, böylece enfekte makrofajlar parçalanmaktadır. Fare ve sıçanlardan elde edilen makrofajların tersine kobay ve tavşanlardan elde edilenlerin virulan *M. tuberculosis* ile etkileşimi insan makrofajları ile benzerlik göstermektedir. Tüberkülozun patogenezinde rol oynadığı düşünülen hücre içi sinyal iletim sisteminin değerlendirilmesinde bazı kriterler aranmaktadır. Bunlar; normal koşullarda fagozom olgunlaşması ve antimikrobial aktivite için gerekli spesifik yolun gösterilmesi, virulan *M. tuberculosis*'le enfekte insan makrofajında bu yolun engellendiğinin gösterilmesi ve *M. tuberculosis*'in neden olduğu fagozom olgunlaşması inhibisyonunun ortadan kaldırılması için sinyal iletim yolunun deneysel olarak inhibe edilmesinin gösterilmesidir. Mikobakterilerin makrofajda Ca^{2+} sinyal iletim sistemini engellemesinin bu üç kritere de uyduğu saptanmıştır. Bazal değeri 50-100 nM olan stoplazmik Ca^{2+} , kompleman veya antikor ile opsonize olmuş organizmaların alınmasıyla 500-1000 nM düzeylerine çıkmasına neden olur. Bu Ca^{2+} sinyal iletimi fagositoz için değil, solunum patlaması ve fagozom olgunlaşması gibi doğal bağışıklık sisteminin sonraki basamaklarında etki eden mekanizmalarda gereklidir.

M. tuberculosis, sfingozin kinazı (SK) inhibe ederek makrofajdaki Ca^{2+} sinyalini durdurmaktadır. Makrofaj yüzey reseptörlerine bağlanan ölü tüberküloz basilleri, konak hücrede SK aktivasyonuna neden olur. SK, sfingozini sfingozin 1 fosfata (S1F) dönüşmesini katalize eder. S1F ise endoplazmik retikulumdaki hücre içi depolardan Ca^{2+} salınmasına neden olur. Bu da makrofajlardaki Ca^{2+} düzeyini yükseltir. Buna karşın canlı M. tuberculosis, makrofajda SK aktivasyonunu ve fagozomal translokasyonu inhibe eder. S1F'in oluşmaması ve sitoplazmik Ca^{2+} düzeyinin yükselmemesi sonucunda fagozom olgunlaşması engellenerek M. tuberculosis hücre içinde canlı kalır.

Hücre içermeyen deneylerde mikobakterilerin engelleme etkisinde, SK'nın mikobakterilerin doğrudan hedefi olduğu öne sürülmüştür. Birçok hücre tipinde protein tirozin kinaz (PTK) aracılığı ile sfingozin kinaz aktivasyonu meydana gelirken bu yol tirozin fosfataz (TF) ile fizyolojik veya patolojik olarak engellenmektedir. Birçok hücre içi patojenin patogeneğinde TF kullanılmaktadır. M. tuberculosis'in hücre duvar yapısında bulunan lipoarabinomannan (LAM) konak TF'ini etkinleştirir. Eğer ölü M. tuberculosis'in fagositozu sırasında TK aracılığı ile SK etkinleşirse, LAM aracılığı ile TF uyarılarak SK'nın durdurulmasına neden olmaktadır.

M. tuberculosis, Ca^{2+} 'e bağımlı fagozom olgunlaşmasını engellemektedir. Ölü M. tuberculosis içeren fagozomun fagolizozoma olgunlaşmasında sitoplazmik Ca^{2+} düzeylerindeki artış kalmoduline (CaM) bağlanması ile saptanmaktadır. Bunun sonunda Ca^{2+} -CaM fagozom membranına doğru yer değiştirir. Ca^{2+} -CaM kompleksi inaktif CaMKII'yi aktif fosforile forma dönüştürmektedir. Ca^{2+} /CaM/CaMKII sinyal ileten kaskat fosfotidilinositol'e (PI) özgü PI 3-kinaz fagozom membranının dış yaprağında PI 3 F'a dönüşmesini katalize eder. Kesedeki füzyonda düzenleyici olan erken endozomal antijen-1 (EEA-1) PI 3-F'a bağlanarak fagozom olgunlaşmasını arttırarak asidik bakterisidal fagolizozoma dönüştürmektedir. Buna karşın makrofajda Ca^{2+} sinyal iletiminin canlı M. tuberculosis ile engellenmesi sonucu sitoplazmik CaM fagozom membranında toplanamayacak ve hücre içi sinyal iletimi gerçekleşemeyecektir. Sonuç olarak fagozom olgunlaşmasının engellenmesi insan makrofajlarında M. tuberculosisin canlı kalmasına katkıda bulunacaktır.

M. tuberculosis hücre duvarının başlıca yapısını mikolik asit oluşturmaktadır. Birçok çalışma mikolik asitin açıl zincirlerindeki fonksiyonel grupların patogeneze ve persistansta önemli olduğunu göstermektedir. Mikolik asitte değişiklikten sorumlu olan en az üç mikolik asit siklopropan sentaz enzimi bulunmaktadır. Üçlü kompleksin yapısı mikolik asit substratının bağlanma bölgelerini göstermektedir. Dikkatle incelendiğinde aktif bölgelerin bikarbonat iyonuna bağlı olarak elektron yoğun olduğu gösterilmiştir. Bu yapılar, genel olarak bikarbonat iyonlarının etkilediği enzimlerin karboksasyon yoluyla metiltransferazı kataliz ettiği hipotezini desteklemektedir. Ayrıca enzim yapılarının karşılaştırılması ile substrat özgüllüğünün olası mekanizması gösterilmektedir. Bu yapılar persistans bakterilere etkili yeni inhibitörlerin geliştirilmesine öncülük edecek rasyonel ilaç tasarımının alt yapısını sağlayacaktır.

M. tuberculosis'in latent enfeksiyonlarında persistansın mprA-mpb düzenleyici sistemlerdeki ekspresyona bağımlı olduğu da görülmüştür. MprA ve MprB'nin önceden iki kısımlı sinyal sistemi ile fosfotransfer reaksiyonlarında yer aldığı gösterilmiştir. Özellikle MprA tarafından düzenlenen genetik determinantların tanımlanmasının *M. tuberculosis*'in latent kalmasıyla ilgili mekanizmalara ait bilgileri arttıracığı düşünülmektedir.

Mikobakteriyel araştırmalarda esas yapılması gereken; hem deneysel olarak tanımlanan hem de biyo-informatik araçlarla öngörülen protein fonksiyonlarının açıklanmasıdır. Transkriptomik ve proteomiklerin birleştiği güçlü post-genomik teknolojiler, mikobakteriyel patogeneze için gerekli çok önemli protein işlevlerinin tanımlanmasında kritik rol oynayacaklardır. *M. tuberculosis* genomunun saptanmasından sonra mikobakteriyel araştırmalarda olağanüstü ilerlemelerin olması, gelecekteki araştırmalar ve bulguların patojenik mikobakterilerle oluşan tüberküloz ve diğer hastalıkların tanı, korunma ve tedavisinde yeni ve gelişmiş aletlere dönüşeceği inancımızı kuvvetlendirmektedir.

KAYNAKLAR:

1. Mycobacterium tuberculosis inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 2004;172:6272-80.
2. The Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 2003;71:4487-97.
3. Identification and characterization of a regulatory sequence recognized by Mycobacterium tuberculosis persistence regulator MprA. *J Bacteriol.* 2005;187:202-12.
4. Crystal structures of mycolic acid cyclopropane synthases from Mycobacterium tuberculosis. *J Biol Chem.* 2002;277:11559-69.
5. Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clin Immunol.* 2005; 114:239-47.
6. TB tools to tell the tale-molecular genetic methods for mycobacterial research.. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:54-68.
7. Mycobacterium tuberculosis subverts the differentiation of human monocytes into dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2002;32:3050-8.
8. Prolonged toll-like receptor signaling by Mycobacterium tuberculosis and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages. *Infect Immun.* 2004;72:6603-14.
9. Salyers AA, Whitt DD. Tuberculosis. In: *Bacterial patogenesis, a molecular approach.* 2nd Edition, ASM Press, Washington DC, 2002, 291-310.
10. Volkman HE, Clay H, Beery D, Chang JC, Sherman DR, Ramakrishnan L. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. *PLoS Biol.* 2004;2:1946-56.