TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Mycobacterium tuberculosis SUŞLARINDA EFLÜKS POMPASINI OLUŞTURAN GEN EKSPRESYONLARININ ÇOKLU İLAÇ DİRENÇ GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Mustafa Kerem ÇALGIN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet KIYAN

ANKARA

2012

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Mycobacterium tuberculosis SUŞLARINDA EFLÜKS POMPASINI OLUŞTURAN GEN EKSPRESYONLARININ ÇOKLU İLAÇ DİRENÇ GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Mustafa Kerem ÇALGIN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet KIYAN

Bu tez, TÜBİTAK tarafından 108S247 Proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
2012

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

Mycobacterium tuberculosis Suşlarında Eflüks Pompasını Oluşturan Gen Ekspresyonlarının Çoklu İlaç Direnç Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması başlıklı, Dr. Mustafa Kerem ÇALGIN' a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/01/2012

Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mehmet KIYAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı

Doç. Dr. Fikret ŞAHİN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye

ÖNSÖZ

Eflüks pompalarının *Mycobacterium tuberculosis'* te çoklu ilaç direnci gelişmesi üzerindeki rolünün araştırıldığı bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 108S247 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince bana gösterdiği eşsiz sabırdan ve inançtan dolayı ve gerek bilimsel, gerekse hayat görüşü konularında bana sayısız bilgi ve destek veren ve yetişmemde büyük emeği olan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet Kıyan' a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını ve dostluğunu esirgemeyen, desteğini sürekli hissettiğim, her konuda bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren Doç. Dr. Fikret Şahin' e, laboratuvar çalışmalarımda değerli yardımlarından dolayı Djursun Karasartova' ya, örnek sağlama konusundaki yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Melike Atasever ve Doç. Dr. Deniz Köksal' a, eğitimim boyunca destek ve anlayışlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' nın değerli öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve personeline, başarılarımın esas kaynağı olan ve bu günlere gelmem için her türlü fedakarlığı yapan sevgili anneme, babama ve kardeşlerime, destek ve sabırları için sevgili eşim Ülkü' ye teşekkür ederim.

Dr. Mustafa Kerem ÇALGIN

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay i
Önsöz ii
İçindekiler iii
Simgeler ve Kısaltmalar viii
Şekiller Dizini xi
Tablolar Dizini xii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Tarihçe 4
2.2. Epidemiyoloji 5
2.3. Mikrobiyoloji 5
2.3.1. Morfoloji 6
2.3.2. Hücre Duvarı 8
2.3.2.1. Plazma membranı 9
2.3.2.2. Orta tabaka 9
2.3.2.3. Pepdidoglikan yapı 10
2.3.2.4. Arabinogalaktan 10
2.3.2.5. Mikolik asitler 11
2.4. Tedavi ve Direnç 12
2.4.1. Mikobakteriyel İntrinsik Rezistom 17
2.4.2. Çoklu İlaç Direnç Eflüks Pompaları 18
2.4.2.1. Sekonder çoklu ilaç taşıyıcıları 20
2.4.2.2. ABC tipi çoklu ilaç taşıyıcılar 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 23
3.1. *M. tuberculosis* Suşları 23
3.2. Eflüks Pompa Genleri 24
3.3. Gereçler 25
3.3.1. Besiyerleri 25
3.3.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler 25
3.3.3. Sarf Malzemeleri 25

3.3.4. Araçlar....26
3.3.5. Jel Elektroforez İşleminde Kullanılan Solüsyonlar....26
3.4. *M. tuberculosis* Suşlarından RNA Ekstraksiyonu....27
3.5. Elde Edilen RNA' ların Spektrofotometre ile Ölçümü....28
3.6. cDNA Sentezi....28
3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)....29
3.7.1. Örneklerin Hazırlanması....29
3.7.2. Primerlerin Seçilmesi....29
3.7.3. DNA Amplifikasyonu....31
3.7.4. PZR Ürünlerinin Saptanması....31
3.7.5. Duyarlı ve Dirençli Suşlar Arasındaki Ekspresyon Farkı Ölçümü....31
3.7.6. İstatistiksel değerlendirme....31
3.8. Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme....32
3.8.1. PZR Yöntemi ile Rv1410c ve Rv2333c Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme....32
3.8.2. PZR Yöntemi ile *drrA, drrB, iniA* ve *mmpL7* Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme....34
3.8.3. PZR Yöntemi ile Rv1258c Geninin Logaritmik Artış Fazını Belirleme....36
3.8.4. PZR Yöntemi ile Rv1273c, Rv1687c, Rv3000, *mmpL4*, Rv1250, Rv1634, Rv0783c ve Rv0037c Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme....38
3.9. Multipleks PZR çalışmaları....41
3.9.1. Rv1410c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu....41
3.9.1.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması....42
3.9.1.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü....42
3.9.2. Rv2333c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu....43
3.9.2.1 PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması....44
3.9.2.2 Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü....44
3.9.3. *drrA* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu....44
3.9.3.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması....45
3.9.3.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü....45
3.9.4. *drrB* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu....46
3.9.4.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması....47

3.9.4.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....47
3.9.5. *iniA* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....47
3.9.5.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması.....48
3.9.5.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....48
3.9.6. *mmpL7* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....49
3.9.6.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması.....50
3.9.6.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....50
3.9.7. Rv1258c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....50
3.9.7.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması.....51
3.9.7.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....51
3.9.8. Rv1273c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....52
3.9.8.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması.....53
3.9.8.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....53
3.9.9. Rv1687c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....53
3.9.9.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması.....54
3.9.9.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....54
3.9.10.Rv3000 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....55
3.9.10.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması.....56
3.9.10.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....56
3.9.11.*mmpL4* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....56
3.9.11.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması.....57
3.9.11.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....57
3.9.12.Rv1250 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....58
3.9.12.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması.....59
3.9.12.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....59
3.9.13.Rv1634 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....59
3.9.13.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması.....60
3.9.13.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....60
3.9.14.Rv0783c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....61
3.9.14.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması.....62
3.9.14.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....62
3.9.15.Rv0037c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....62

3.9.15.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması.....63
3.9.15.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü.....63
3.10.*M. tuberculosis* Standart Suşlarında Multipleks PZR ile Genlerin Amplifikasyonu.....64
3.10.1.PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Saptanması.....64
4. BULGULAR.....65
4.1. Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme.....65
4.1.1. PZR Yöntemi ile Rv1410c ve Rv2333c Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme.....65
4.1.2. PZR Yöntemi ile *drrA, drrB, iniA* ve *mmpL7* Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme.....66
4.1.3. PZR Yöntemi ile Rv1258c Geninin Logaritmik Artış Fazını Belirleme.....68
4.1.4. PZR Yöntemi ile Rv1273c, Rv1687c, Rv3000, *mmpL4*, Rv1250, Rv1634, Rv0783c ve Rv0037c Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme.....69
4.2. Multipleks PZR Çalışmaları.....73
4.2.1. Rv1410c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....73
4.2.2. Rv2333c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....74
4.2.3. *drrA* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....76
4.2.4. *drrB* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....78
4.2.5. *iniA* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....79
4.2.6. *mmpL7* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....81
4.2.7. Rv1258c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....82
4.2.8. Rv1273c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....84
4.2.9. Rv1687c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....85
4.2.10.Rv3000 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....87
4.2.11.*mmpL4* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....89
4.2.12.Rv1250 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....90
4.2.13.Rv1634 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....92
4.2.14.Rv0783c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....93
4.2.15.Rv0037c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu.....95
4.3. *M. tuberculosis* Standart Suşlarında Multipleks PZR ile Genlerin Amplifikasyonu.....96

4.4. Duyarlı, Çoklu Dirençli ve Standart suş Gruplarında Genlerin Rölatif Ekspresyon Profilleri 100
5. TARTIŞMA 102
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 112
ÖZET 114
SUMMARY 115
KAYNAKLAR 116

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
A	Adenin
ABC	ATP-bağlayıcı kaset
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin trifosfat
β	Beta
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
C	Sitozin
CCCP	carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone
cDNA	Complementary deoksiribonükleik asit
CIP	Siprofloksasin
ÇİD-TB	Çok ilaca dirençli tüberküloz
ddH_2O	Çift distile su
dH_2O	Distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTT	Ditioerithritol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EMB	Etambutol
F	Forward
G	Guanin
HIV	Human immunodeficiency virus
IK	İnternal kontrol
INH	İzoniazid
LJ	Lowenstein-Jensen
M	Moleküler büyüklük belirteci
MAC	*Mycobacterium avium* complex

MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MDR	Multiple Drug Resistance
MDR-TB	Multi-drug resistant tuberculosis
MFS	Major Facilitator superfamily
$MgCl_2$	Magnezyum klorid
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
µg	Mikrogram
µl	mikrolitre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
nm	Nanometre
OFL	Ofloksasin
oligo dT	Oligodeoxythymidylic acid
PAS	Paraminosalisilik asid
pmol	Pikomol
PZA	Pirazinamid
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
R	Dirençli
R	Reverse
RIF	Rifampisin
RNA	Ribonükleik asit
RNAse	Ribonükleaz
RND	Resistance nodulation cell division
rpm	Devir/dakika
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RT reaction mix	Reverse transcriptase reaction mixture
RT-PZR	Reverse transcription polimeraz zincir reaksiyonu
S	Duyarlı
SMR	Small multidrug resistance
sn	Saniye
STR	Streptomisin
T	Timin

Taq	*Thermus aquaticus*
TB	Tüberküloz
TBE	Tris/Borate/EDTA
TET	Tetrasiklin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	Ultraviyole
WHO	World Health Organisation
XDR-TB	Extensive drug resistant tuberculosis
YİD-TB	Yaygın ilaç dirençli tüberküloz
^{o}C	Santigrat derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mikobakteri hücre duvarı

Şekil 4.1. Rv1410c ve Rv2333c genleri 34. ve 35. döngülerdeki PZR görüntüsü

Şekil 4.2. *drrA, drrB, iniA* ve *mmpL7* genleri 27., 30. ve 33. döngülerdeki PZR görüntüsü

Şekil 4.3. Rv1258c geni 26., 29. ve 33. döngülerdeki PZR görüntüsü

Şekil 4.4. Rv1273c, Rv1687c, Rv3000 ve *mmpL4* genlerinin 29, 33 ve 37. döngülerdeki PZR görüntüsü

Şekil 4.5. Rv1250, Rv1634 *ve* Rv0783c genlerinin 29, 33 ve 37. döngülerdeki PZR görüntüsü

Şekil 4.6. Rv0037c geninin 29, 33 ve 37. döngülerdeki PZR görüntüsü

Şekil 4.7. Rv1410c geni 33 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.8. Rv2333c geni 32 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.9. *drrA* geni 26 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.10. *drrB* geni 26 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.11. *iniA* geni 26 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.12. *mmpL7* geni 26 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.13. Rv1258c geni 25 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.14. Rv1273c geni 29 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.15. Rv1687c geni 30 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.16. Rv3000 geni 37 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.17. *mmpL4* geni 29 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.18. Rv1250 geni 28 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.19. Rv1634 geni 28 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.20. Rv0783c geni 29 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.21. Rv0037c geni 34 döngü PZR fotoğrafı

Şekil 4.22. Tüm genlerin *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618 suşundaki PZR fotoğrafı

Şekil 4.23. Tüm genlerin *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 suşundaki PZR fotoğrafı

Şekil 4.24. Tüm genlerin *M. tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşundaki PZR fotoğrafı

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Çeşitli anti - TB ilaçlara dirençle ilişkili genler

Tablo 2.2. *M. tuberculosis* ilaç direncinde rol oynadığı gösterilmiş olan eflüks pompa genleri ve taşıyıcılar

Tablo 3.1. Çalışmaya alınan MDR suşların primer anti - TB ilaçlara direnç fenotipleri

Tablo 3.2. Çalışmada araştırılan eflüks pompalarının özellikleri

Tablo 3.3. PZR' de kullanılan primerler

Tablo 4.1. Rv1410c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.2. Rv2333c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.3. *drrA* geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.4. *drrB* geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.5. *iniA* geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.6. *mmpL7* geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.7. Rv1258c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.8. Rv1273c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.9. Rv1687c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.10. Rv3000 geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.11. *mmpL4* geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.12. Rv1250 geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.13. Rv1634 geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.14. Rv0783c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.15. Rv0037c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu

Tablo 4.16. Tüm genlerin rölatif ekspresyon profilleri

1. GİRİŞ

Tüberküloz (TB), insanlık tarihinin en eski ve en çok korkulan hastalıklarından biridir. Sebebinin bilinmesine, son 50 yıldır tedavisinin mümkün olmasına ve korunulabilir bir hastalık olmasına karşın, dünyada en yaygın ve ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir (Kıyan, 1999; Kılıçaslan, 2007).

Geçtiğimiz yüzyılın 2. yarısında tedavide etkili yeni ilaçların bulunmasıyla, endüstrileşmiş ülkelerde TB morbidite ve mortalitesinde devamlı bir düşüş olmuştur. Ancak 1985' den beri bu düşüş durmuş ve 1985-95 yılları arasındaki olgu sayısında yaklaşık %12' lik bir artış olmuştur. HIV' in yaygınlaşmaya başlamasından itibaren TB insidansında büyük bir artış olmuştur (Anğ, 1997).

Günümüzde TB tedavisinde birinci seçenek ilaçlar izoniazid, rifampin, pirazinamid, etambutol ve streptomisindir. Sikloserin, etionamid, tiasetazon, kanamisin, kapreomisin ve paraminosalisilik asid (PAS) gibi ilaçlar ise ikinci seçenek ilaçlardır (Otkun, 2001).

TB' daki yeni tehlike, çoğul dirençli (MDR) *M. tuberculosis* suşlarının artmasıdır. Bu durum, direnç sorununu da gündeme getirmiş ve hastalığın kontrol altına alınması için tüberküloz olgularının vakit geçirmeden tanımlanması ve tedaviye mümkün olduğunca çabuk başlanması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Anğ, 1996; 1997).

Günümüzde kullanılmakta olan ilaçlara karşı gelişen direnci en aza indirmek ve yeni antitüberküloz ilaçlar geliştirebilmek için, basilin yapısı ve direnç mekanizmaları daha iyi incelenerek, ilaçların etki edebileceği yeni hedef moleküller araştırılmalıdır.

M. tuberculosis tüm birincil antitüberküloz ilaçlara ve çoğu ikincil ilaçlara karşı direnç geliştirmiştir. Bununla birlikte, *M. tuberculosis* düşük geçirgenliğe sahip, lipidden zengin yapıda, nadir gözlenen bir hücre duvarına sahiptir ve bu nedenle intrinsik olarak çoğu antibiyotiğe de dirençlidir. Eflüks pompaları (tek bir antibiyotikten, değişik çok çeşitli kimyasal ve yapısal maddelere kadar hücre dışına

çıkarmaya kabiliyetli, enerji bağımlı membran proteinleri), ilaç direncinin artmasında hücre duvarı geçirgenlik bariyeri ile sinerjik çalışır. Mikobakterilerde çeşitli eflüks pompaları rapor edilmiş ama birçoğu hala iyi bir şekilde karakterize edilememiştir. Florokinolonlar, aminoglikozidler, tetrasiklinler, rifampin ve muhtemelen izoniazid ve etambutol gibi çeşitli antibiyotiklerin transportunda bu pompaların görev aldığı gösterilmiştir (Pasca, 2005; Piddock, 2006; Ramon-Garcia, 2007).

Efflüks pompalarının oluşması ve çalışmasında rol aldığı belirtilen genlerin mikobakterilerdeki eşdeğerleri veya benzerlerinin varlığı ve ilaç atılımı ile çoklu ilaç direnci gelişimi üzerindeki rolleri ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Özellikle klinik suşlarda bu genlerin ekspresyonlarındaki farklılıkları konu alan çok az çalışma vardır.

Bu çalışmada, mikobakterilerde eflüks pompalarının oluşumunda rol aldığı belirlenmiş olan; Rv1410c (p55), Rv2333c, *drrA, drrB, mmpL4, mmpL7,* Rv1258c, *iniA* (Rv0342), Rv0037c, Rv0783c, Rv1250, Rv1273c, Rv1634, Rv1687c ve Rv3000 gen ekspresyonlarının, direkt klinik olarak elde edilmiş olan çoklu ilaç direnci gösteren *M. tuberculosis* suşlarında multipleks RT - PZR yöntemi kullanılarak çalışılması ve sonuçların direnç göstermeyen suşlardaki ekspresyon miktarları ile kıyaslanarak iki grup arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu şekilde çoklu ilaç direnci gösteren grupta rol alan gen veya genlerin belirlenmesi ve direnç mekanizmasının anlaşılması yanında özellikle çoklu ilaç direnci gösteren suşlar ile ortaya çıkan tüberküloz hastalığının tedavisinde yeni bir hedefin ortaya konması yanında bu genlerin ekspresyon miktarlarının, *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşlarında da araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmamızın *M. tuberculosis'* te bulunan eflüks pompalarının bir çok üyesini aynı anda araştırması ve klinik örneklerden izole edilmiş MDR fenotipi bulunduran suşlarla çalışılması açısından bu konuda mevcut literatür bilgilerine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tüberkülozla ilgili ilk klinik ve patolojik gözlemler; hastalıktan ölen kişilerin akciğerlerinde kaviter lezyonlar olduğunu bildiren Vesalius (1478) ile başlamaktadır. Sonraki yıllarda Sylvius tarafından tüberküller tanımlanmış, Marton (1689) hastalık için, bitme tükenme anlamına gelen, verem tabirini kullanmıştır (Kıyan, 1999).

Robert Koch' un 24 Mart 1882' de Berlin Fizyoloji Derneği' nde tüberküloz basilini keşfettiğini bildirmesi, tüm dünyada duyulmuş ve daha sonraki ilerlemeler yakından izlenmiştir. Koch basilinin bulunuşunu 1921' de Fransız araştırmacılar Albert Calmette ve Camille Guerin' in tüberküloz aşısını (BCG) geliştirmeleri izlemiş, 1944' de Selman Abraham Waksman ve meslektaşı Albert Schatz, New Jersey' deki Rutgers Üniversitesi' nde ilk tüberküloz ilacı olan streptomisini bulmuştur. Bundan sonraki önemli gelişmeler arasında, Gerhard Domagk' ın Almanya' da tiosemikarbazonlarla yaptığı çalışmalar sonucu, izoniazidin bulunmasına da yol açan öncü çalışması (ki izoniazidi aynı zamanda New Jersey' de Dr. Herbert Fox da tanımlamıştır) ve 1946' da İskandinavyalı Jorgen Lergen Lehmann' ın PAS' ı bulması sayılabilir. Hastalığın bulaşıcı karakterde olduğu hakkındaki kuşkular ilk defa 16. yüzyıl başlarında Fracastorius tarafından ileri sürülmüş, 1865' de Fransız hekimi Villemin infekte materyalin inokülasyonu ile hastalığı hayvanlara geçirebilmiş, Robert Koch 1884' de patolojik maddelerden kültürünü yapmayı başarmış ve bu kültür bakterileriyle deney hayvanlarında tüberküloz oluşturulabileceğini göstermiştir. 1896' da sığır tüberküloz basili *M. bovis* ayrı bir tür olarak Th. Smith tarafından ortaya çıkarılmış, 1937' de tarla farelerinde fare tüberküloz basili *M. microti* İngilizler tarafından izole edilmiştir. Robert Koch tüberküloz allerjisini, bu hastalıktaki özel immüniteyi ve tüberkülini tanımlayarak bu konudaki değerli çalışmalarını yayınlamış ve böylece hekimlikte yeni bir çağın öncüsü olmuştur (Kıyan, 1999; Saniç, 1999).

2.2. Epidemiyoloji

Tüberküloz insidansı sosyoekonomik özelliklere bağlı olarak ülkeden ülkeye değişmektedir. Gelişmiş ülkelerde tüberküloz insidansının çok düşük olmasına karşın, geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde hız çok yüksektir. Hindistan' da tüberküloz insidansı 100.000 kişide 450' den daha fazla tahmin edilmekte iken, İngiltere' de bu rakam 12.2/100.000, Hollanda' da ve Avustralya' da yaklaşık 5/100.000'tir (Lin, 1986; Göçmen, 1992).

1950'li yıllarda tüberküloz yurdumuzda birinci derece ölüm nedeni iken, yapılan mücadele sonucu günümüzde ölüm nedenleri arasında daha alt sıralarda yer almaktadır. 1950 yılında % 0.25 oranında olan aktif tüberküloz sıklığı 1976' ya kadar % 0.1' e inmiştir (Bilgiç, 1991).

Yıllar içinde tüberkülozla mücadelede önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmakla birlikte, Türkiye halen orta insidansa sahip ülkeler arasında yer almaktadır. Buna ilave olarak, antitüberküloz ilaçlara direnç oranları da oldukça dikkat çekici boyutlardadır. Ulusal direnç durumunu yansıtacak veri olmamakla birlikte, farklı illerden yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde başlangıç ve kazanılmış çoğul ilaca direnç oranlarının sırasıyla % 1.3 - 4.8 ve % 4.4 - 16.6 arasında değiştiği görülmektedir. En az bir ilaca karşı primer ve sekonder direnç oranları ise sırasıyla % 18 - 26.6 ve % 28 - 53.4 arasında değişmektedir (Tahaoğlu, 1994; Yolsal, 1998; Bilgiç, 2003).

2.3. Mikrobiyoloji

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri nedeniyle birbirleriyle yakın ilişkili türler, "kompleks" başlığı altında toplanmaktadırlar. "*M. tuberculosis* kompleks" *M. tuberculosis, M. bovis, M. microti, M. africanum* ve *M. bovis BCG'* yi içermektedir. Klinik açıdan bakıldığında hastalık yapma potansiyeli ve halk sağlığı ile yakın ilişkisi nedeniyle *M. tuberculosis* cinsin en önemli üyesidir ve günümüzde insanlarda görülen tüberkülozun esas nedenidir. Çok az sayıda (% 1 - 2) olguda *M. bovis* ve *M.*

africanum etken olarak saptanır. *M. microti* ise kemiriciler için patojen olup insanlarda hastalık yapmaz (Murray, 2005).

M. tuberculosis kompleks dışındaki mikobakterilere "tüberküloz dışı mikobakteriler" veya "atipik mikobakteriler" denmektedir. Bunlar doğada, toprakta, suda bolca bulunurlar, insandan insana geçişleri çok enderdir ve çoğu patojen değildir. Bu grubun üyeleri ender olarak hastalık oluştururlar (Murray, 2005).

Son derece özelleşmiş olan hücre duvar yapıları ile her türlü saldırıya karşı korunarak kronik enfeksiyonlara yol açabilen mikobakteriler, tarihin ilk çağlarından beri korku ve ilginin odağında yer almışlardır. Özellikle *M. tuberculosis* kompleksi içerisinde yer alan *M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. canettii, M. pinnipedii, M. shottsii* ve *M. microti* ile *M. lepra* gibi yavaş üreyenler başta olmak üzere, mikobakteriler hücre duvarı komplekslerinin düşük permeabilite ve hidrofobisite gibi özellikleri nedeni ile bazı yararlı metabolitleri kullanabilme güçlüklerine karşılık, hidrofilik antibiyotikler, metal iyonları ve dezenfektanlar gibi kimyasal toksik ajanlar, oksijen radikalleri gibi hücresel toksinlere, asit (pH: 5 - 6) ve alkali ortama ve alanin boyalara karşı intrinsik dirence sahiptirler. Bu özellikleri ile kendilerini hücre içi ve hücre dışı zararlılara karşı koruyan mikobakteriler, hücre duvarlarında taşıdıkları bazı yapı elemanları ile konağın immun cevabını da etkileyerek asemptomatik taşıyıcılıktan, kronik granülomatöz, tedaviye cevap vermeyen yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlara kadar değişen klinik tablolara yol açarlar (Köksal, 2003).

2.3.1. Morfoloji

Mikobakteriler silindir şeklinde, uçları yuvarlak, 0.3 - 0.6 µm en ve 1 - 4 µm boyunda, düz veya hafif kıvrık, ince bir basildir. Hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdür. Eski kültürlerde ve uygunsuz koşullarda üreyen bakterilerin daha uzun, ipliksi ya da daha kısa hatta koklara benzer değişik şekilleri ortaya çıkabilmektedir. Balgam ve diğer hastalık maddelerinden yapılan preparatlarda tek ya da ikili üçlü gruplar halinde ve birbirlerine paralel ya da uçlarından birbirlerine

yaklaşarak X, V, L harfi oluşturacak biçimde bir arada bulunabilirler. Hücre duvar yapısının büyük bölümünü oluşturan lipidlerin hidrofobik özelliklerinden dolayı bakteriyolojik boyalarla zor boyanırlar. Yeni lezyonlardan ve genç kültürlerden gram ile hazırlanan preparatlarda bazen çok zayıf ve düzensiz olarak boyanabilirse de gram boyanma özelliklerinden bahsedilemez. Mikobakteriler aside alkole dirençlidirler. Bakterinin aside dirençli boyanma özelliği, fiziki bütünlüğü yanında hücre duvarındaki mikolik asit ve lipid bariyer sisteme bağlıdır. Bazik fuksin boyası ile bir kez boyandıklarında, % 3 asit - alkolün dekolorizasyonuna direnç gösterirler. Bu kuvvetli aside dirençlilik özellikleri tüm mikobakteriyel hastalıkların laboratuar tanısında kullanılan en önemli özellikleridir (Gedikoğlu, 1997; Kıyan, 1999; Bilgehan, 2000).

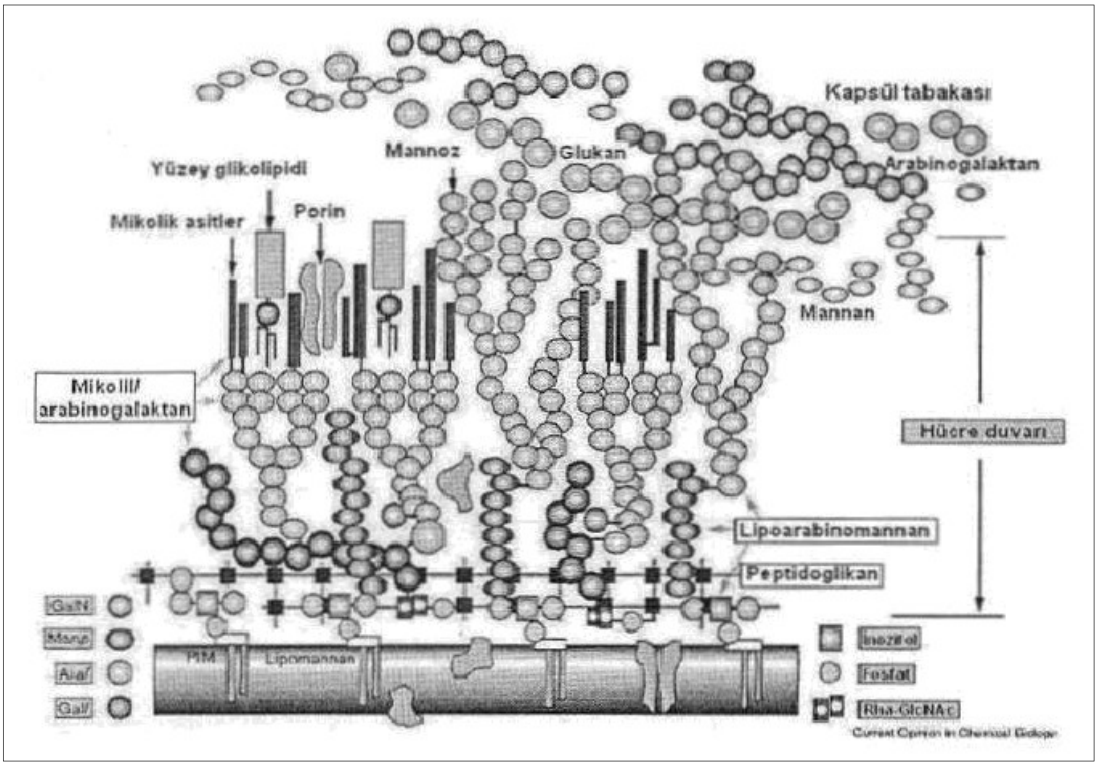
Son yıllarda özellikle, gelişmiş toplumlarda doğumsal veya HIV, lösemiler, diabet, alkol ve uyuşturucu bağımlılığının yarattığı kazanılmış immun yetmezliği olan kişilerin sayısının artışına bağlı olarak *M. avium* kompleksinde yer alan mikobakterilerin de katılımı ile akciğer tüberkülozu insidansının tekrar artma trendine geçişi, *M. tuberculosis* suşları arasında çoklu ilaç direnci gösteren izolatların artması ve bu suşlarla oluşan enfeksiyonların % 70' inin 4 - 6 hafta gibi daha kısa bir sürede ölümle sonlanması mikobakterilerle ilgili çalışmaların yeniden hız kazanmasına neden olmuştur. Mikobakterilerde 1960' lı yıllarda 2 ilaca karşı % 1 - 2 oranında olan direnç, 1991 yılında 4 ilaca karşı % 13 gibi yüksek oranlara ulaşmıştır. Bu nedenle çalışmaların odağını daha etkili, özellikle bakterisidal yeni antibiyotikler ve koruyucu immun cevabı uyarabilecek yeni potent aşılar geliştirmek oluşturmaktadır. Bu amaçlara ulaşabilmek için de mikobakteri hücre duvarı elemanlarının yapısı, fizyolojik ve kimyasal özellikleri ve biyosentez mekanizmalarının çok iyi analiz edilmesi gereklidir (Köksal, 2003).

2.3.2. Hücre Duvarı

Mikobakterilerin hücre duvarı yapısı alışılagelmiş gram negatif veya gram pozitif bakteri hücre duvarlarından oldukça farklı, kompleks bir yapıdır. Bu komplekste en iç tabaka diğer bakterilerde de görülen plazma membranıdır. Orta tabakanın koru ve duvarın iskeleti, pepdidoglikan arabinogalaktan' ın mikolik asit esterinden oluşan *mycolylarabinogalaktan pepdidoglikan* tarafından oluşturulur. Mikolik asitlerin dışında çok sayıda farklı polar veya apolar yapıda nonkovalent bağlı lipid ve glikolipidler hücre duvarında yer alır. Ökaryot hücreler için biyolojik aktif olan bu lipidler ve glikolipidlerin bolluğu ve asimetrik dizilişleri hücre duvarına aşırı derecede hidrofobisite kazandırır. Non kovalent bağlı lipidler arasında, α,α' trehalose dimycolates ve α,α' trehalose monomycolates gibi açillenmiş trehalozlar, glycerol monomycolates ve fosfolipidler önemlidir (Chatterjee, 1997; Brennan, 2003).

Mikobakterilerin en dışında ise özellikle enfekte makrofajlardan hazırlanan preparatlarda açık olarak gösterilebilen ağırlıklı olarak polisakkarit ve proteinlerden az miktarda da lipidleri içeren kapsül yer almaktadır. Bu yapılar içerisinde alfa-1,4 glukan, bir arabinomannan ve mannan içeren lipomannan ve lipoarabinomannan gibi kapsüler polisakkaritler, son derece önem arz eder. Mikobakterilerin hücre duvarında gram negatif bakterilerde görülen porin proteinleri de bulunur. Mikobakterilerin olağanüstü hücre duvarı yapıları bu bakterileri diğer bakterilerden ayırt eden, intrasellüler yaşam ve kronik enfeksiyon yapma, asit ve alkali ortama direnç, antibiyotiklere direnç, dezenfektan, enzimler, serbest radikaller gibi kimyasal toksik maddelere direnç ve ekmek kırıntısı gibi toplu kümeler halindeki kuru kolonileri oluşturma özelliğini kazandırmaktadır (Köksal, 2003).

Mikobakteri hücre duvar yapısı Şekil 2.1' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Mikobakteri hücre duvarı (21. yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu kitabından).

2.3.2.1. Plazma membranı

Mikobakterilerin plazma membranları diğer bakterilerin plazma membranları ile benzer özelliklere sahiptir. Membran tipik olarak protein ve fosfolipidlerden oluşan çift katmanlı bir yapıdadır. Kuramsal olarak bir periplazmik boşluk sayesinde orta tabaka yani pepdidoglikandan ayrılır (Chatterjee, 1997).

2.3.2.2. Orta tabaka

Hücre duvarının orta tabakasında pepdidoglikan, arabinogalaktan, mikolik asitler, acyl trehaloselar, oligosakkarid içeren lipidler ve fosfatidilinositol' ün glikozil derivatları yer almaktadır. Bu yapılara antijenik özelliğe sahip glikoproteinler ile porin yapılar da katılmaktadır (Köksal, 2003).

2.3.2.3. Pepdidoglikan yapı

Mikobakterilerde hücre duvarının en önemli karakteristiği kemotip - IV pepdidoglikan yapıdır. Klasik bakteriyel pepdidoglikandan farklı olan bu yapı *N-acetyl- glocosamine* ve *N-glycosylmuramic asit'* in, beta glikozid ve fosfodiester bağlarla bağlanmasından oluşan bir heteropolimerdir. Muramik asidin glikolik asit ile glikozillenmiş residülerinin yaklaşık olarak % 10 - 12' sinde 6. pozisyonda yer alan *L-alanyl-D-isoglutaminy-meso-diaminopimelyl-D-alanin*' den oluşan bir tetrapepdit yan zincir yardımı ile fosfodiester bağlarla bağlanmışlardır. Diğer bakterilerin pepdidoglikanlarından farklı olarak mikobakteri pepdidoglikanında, bir başka ifade ile kemotip - IV pepdidoglikanda iki önemli farklılık görülmektedir. Bunların ilki muramik asidin asetillenmiş yapısı yerine glikolik asitle glikozillenmiş formunun yapıda yer alması, diğeri de tetrapeptid yan zincirlerde diaminopimelik asidin yer almasıdır. Tetrapeptid köprüler arasındaki bağlantıda yer alan pentapeptid zincirler bir tetrapeptid zincirin diaminopimelik asidi takip eden zincirin D-alanin' i arasında bağlantı kurmaktadır. *N-acetyl- glocosamine* ile *N-glycosylmuramic asit* arasındaki kros bağlanmada görülen transglikolizasyon ve transpepdidasyon işlemleri Penisilin Bağlayan Protein olarak tanımlanan bir dizi enzim tarafından yönetilir (Chatterjee, 1997).

Pepdidoglikan yapı bakteriye şeklini verir, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandırır. Tetrapepdit yapıda yer alan diaminopimelik asit nedeni ile lizozimlere karşı dirençlidir ve kesin deliller olmamakla beraber muramik asit rezidündeki N-glycosyl gruplar organizmayı degradasyona karşı korur (Köksal, 2003).

2.3.2.4. Arabinogalaktan

Arabinogalaktanın yapısı ile ilgili 50 yılı aşkın süredir yapılan çalışmalar bu polimer yapının *D-galactofuranos'* lar ve *D-arabinofuranos'* lardan oluştuğunu göstermiştir. Bunlar doğada son derece nadir görülürler ve yapısal olarak diğer bakterilerde görülen polisakkaritlerden oldukça farklıdırlar. Bu polisakkarit polimerlerinde bazı yapısal motif farklılıkları görülmekle beraber tekrarlayan birimlere rastlanmaz. Gerek arabinogalaktanda gerekse lipoarabinomannanda arabinanın yapısı benzerdir ve muhtemelen arabinanın kaynağı β-D-Ara_f-monophosphodecaprenol' dür.

Arabinogalaktanın homogalaktan rezidüleri, ki bunlar *M. tuberculosis*' de yaklaşık olarak 30 üniteden oluşur, peptidoglikan yapıdaki muramik asidin C-6 pozisyonuna, diglycosylphosphoryl köprü, Rhap(13)D-GlcNac-L-P ile bağlanır. Arabinan (Ara_f) genel olarak 5 halkadan oluşur. Bu halkalar daha sonra 3 - 5 halkalı yan dallara ayrılırlar ($Ara_{f\text{-}\alpha}$). Arabinanın 3. halkası da homogalaktan zincire indirgeyici ucu ile bağlanır. Mikolik asitlerin farklı türleri arabinan zincirin son pentarabinofuranosyl ünitinin üzerindeki uçların yaklaşık olarak 2/3' üne mycolylarabinogalaktanı oluşturmak üzere 4' lü gruplar halinde bağlanır (Brennan, 2003).

2.3.2.5. Mikolik asitler

Mikolik asitler α dallanma gösteren β hidroksillenmiş büyük yağ asitleridir. Doğada polisakkaritlere esterleşmiş yapılar halinde bulunurlar. Mikobakteri hücre duvarı içerisinde de arabinogalaktanın arabinan parçası üzerinde tetramycolpentarabinofuranosyl esteri şeklinde pepdidoglikana dik olarak yerleşirler. Mycolylarabinogalaktan pepdidoglikan dışında hücre duvarında mikolik asitler trehalosla esterleşmiş şekilde trehalose monomycolates ve trehalose dimycolatesda, mikolatfosfolipidler ve diğer mikolatlanmış lipidler halinde bulunurlar. Mikolik asitler mikobakterilerde tüm hücre duvarı kuru ağırlığının % 50' si ile hücre lipidlerinin de % 60' ını oluşturlar. Trehalose monomycolates ve trehalose dimycolates dışında hücre duvarına non kovalent bağlarla bağlanmış asimetrik dağılım gösteren lipid fraksiyonları ile birlikte hücre duvarında hidrofobik bir bariyer oluştururlar. Mikobakterilerde mycolylarabinogalaktan pepdidoglikan kompleksinde iki farklı mikolik asit türü görülür. Bunlardan ilki oksitlenmiş grupları içermeyen 60 karbon büyüklüğündeki α-mikolik asitlerdir. Bu yapıda bir çift bağ veya siklopropan halka yer alır. *M. tuberculosis* de dahil olmak üzere bir çok mikobakteri türünde görülen major mikolik asitler olup tüm mikolik asitlerin % 25' den fazlasını oluştururlar. Diğer mikolik asit türü de α-mikolik asit zincirine oksitlenmiş fonksiyonel gruplar eklenmiş meromikolik asitlerdir (Chatterjee, 1997).

Meromikolat üzerindeki fonksiyonel grupların mikobakterilerin virulansı ve konakla ilişkisi üzerine önemli etkileri görülür. *M. kansasii* ve *M. tuberculosis* gibi patojen mikobakterilerde siklopropan halka, çift bağların yerini almıştır. Buna karşılık hızlı

üreyen apatojen *M. smegmatis'* de siklopropan görülmez. Ketomikolatlar *M. tuberculosis'* in makrofaj içerisinde yaşamasına yardım eder. İnvivo şartlarda üretimleri 5 kat artan ketomikolatların yokluğu makrofaj benzeri fagositik hücrelerde mikobakterilerin ölümünü kolaylaştırır. *M. tuberculosis'* in akciğerlerde en çok havalanan bölgeye yerleşmelerinin nedenlerinden biri olarak mikolik asit üretiminin oksijen bağımlılığı gösterilebilir. Mikolik asitlerin aside dirençli oluşu fagolizozomal füzyonda vakuol içerisindeki asit ortamda mikobakterilerin hayatta kalmasını sağlar. Ancak fonksiyonel gruplara sahip meromikolatlar, yüksek hidrofobisite nedeni ile hücre duvarı permeabilitesini azaltarak zararlı kimyasal toksik maddeler, enzimler, hidrofilik antibiyotikler ve serbest radikaller gibi katyonik bileşiklere karşı ciddi bir bariyer olan mikolik asitler ve diğer hücre duvarı lipidleri arasında, bulundukları bölgelerde hücre duvarına esneklik kazandırarak hidrofilik maddeler ve özellikle hidrofilik antibiyotikler için geçiş alanları oluştururlar (Köksal, 2003).

2.4. Tedavi ve Direnç

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar ikiye ayrılırlar: 1) Kabul edilebilir düzeydeki toksisite profili ile birlikte en efektif olan "birinci sıra" ilaçlar, 2) Genellikle daha az etkili, daha pahalı ve daha çok toksisitesi olan "ikinci sıra" ilaçlar. Birinci sınıfta bulunanlar; başta izoniazid olmak üzere, rifampisin, etambutol, streptomisin ve pirazinamid (ve onun türevi morfozinamid)' dir. Tüberkülozlu hastaların büyük çoğunluğu bu ilaçlarla başarılı bir şekilde tedavi edilebilirler. İkinci sınıfta etionamid, paraminosalisilik asid, tiasetazon (amitiozon), sikloserin, siprofloksasin, ofloksasin ve streptomisin dışı aminoglikozidler olan viomisin, kapreomisin, kanamisin ve amikasin bulunur. Son 20 yılda AIDS olgularının artması ve bu hastalığın ileri döneminde olguların yaklaşık 1/3' ünde *Mycobacterium avium* kompleksi (MAC) bakterilere bağlı dissemine atipik tüberküloz enfeksiyonu gelişmesi yukarıdaki sınıflandırmaya "MAC türü mikobakterilere karşı kullanılan" ilaçlar sınıfının eklenmesini gerektirmiştir. MAC mikobakterileri yukarıda belirtilen birinci sınıftaki ilaçlara ve ikinci sınıftakilerin çoğuna dirençlidir. Bu üçüncü sınıfta bulunan ilaçlar rifabutin, makrolid antibiyotikler olan klaritromisin ve azitromisin,

fluorokinolon türevleri olan siprofloksasin ve ofloksasin, aminoglikozitlerden amikasin ve bir lepra ilacı olan klofazimin' dir (Çilli, 2003).

1944 yılında streptomisinin keşfi tüberküloz tedavisinde altın çağı açmıştır. Bunu 1952 yılında izoniazidin, 1965 yılında rifampinin ve 1968 yılında etambutolün bulunuşu izlemiştir. 1970'li yıllarda rifampinin, 1980'li yıllarda ise pirazinamidin tedaviye eklenmesiyle, tüberküloz tedavisi sırasıyla dokuz ve altı aylık sürelere kısalmıştır. Günümüzde de tüberküloz tedavisi için DSÖ' nün önerdiği "çok ilaçlı, kısa süreli" tedavi uygulanmaktadır. Bu protokolün etkin bir tedavi sağlamasına karşın tüberküloz olgularında artış bildirilmektedir. Özellikle son yıllarda dirençli suşların ortaya çıkışı, hastalığın kontrolünü güçleştirmektedir (Sarıbaş, 2006).

Mycobacterium tuberculosis plazmid içermediğinden, ilaç direnci gen transferi ile kazanılmaz ve bu bakteride genomik DNA transferi şimdiye kadar gösterilememiştir. Direnç *M. tuberculosis'* in genlerindeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonlar, çok düşük oranlarda ortaya çıkmaktadır. Bir bakteri için bir hücre bölünmesindeki mutasyonların, rifampisin için 3.32×10^{-9} ve izoniazid için 2.56×10^{-8} olduğu gösterilmiştir (Zainuddin, 1990; Özkara, 2007).

Tedavinin yeterli sayıda ilaç içermemesi ve düzensiz olması gibi nedenlerle bu düşük orandaki dirençli suşlar seçilerek hakim suş haline gelmekte ve hastanın o ilaçlara dirençli olmasına yol açmaktadır. Dirençli basillerin belirgin oranlara çıkmasından sonra, bu hastanın bulaştırdığı kişiler de aynı ilaçlara dirençli hale gelmektedir. Yani, klinikteki ilaç direnci sorunu, kötü tedavinin, kötü TB programının bir sonucudur ve insan ürünüdür (Özkara, 2007).

Dirençli TB' de daha uzun süreli, daha çok yan etkisi olan ve daha pahalı bir tedaviye gerek duyulmaktadır. Dirençli hastada düzensiz ve kötü tedavinin sonucu ise "tedavi edilemez" TB hastalarının ortaya çıkmasıdır. Bu hastalar nadiren ortaya çıkmakla birlikte, toplumda kendi basillerini yaymayı sürdürmeleri nedeniyle toplum için büyük bir tehdit oluştururken, hastaların da bir süre sonra kaybedilmesine yol açmaktadır. TB hastalığındaki ilaç direnci şu gruplara ayrılabilir;

Yeni olguda ilaç direnci: Bir aydan daha kısa süre tedavi görmüş ya da hiç tedavi görmemiş hastadaki ilaç direncidir. Bu tanım daha önce "primer ilaç direnci" olarak adlandırılıyordu.

Tedavi görmüş olguda ilaç direnci: Bir aydan daha uzun süre tedavi görmüş hastadaki ilaç direncidir. Bu ilaç direnci, ilk tedaviden önce varsa "primer", eğer başlangıçta yok ve tedavi sonrası gelişti ise "sekonder" ilaç direnci olabilir.

Çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD - TB) [multi drug resistant tuberculosis (MDR - TB)]: İzoniazid ve rifampisine dirençli TB' dir. Bu iki ilaca ek başka ilaç direnci de olabilir.

Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİD - TB) [extensive drug resistant tuberculosis (XDR - TB)]: İzoniazid, rifampisine direnç ve bir kinolona direnç ve de parenteral kullanılan ilaçlardan (kanamisin, kapreomisin, amikasin) birisine direnç olması olarak tanımlanmaktadır (Özkara, 2007).

INH, RIF, PZA, EMB gibi çeşitli ilk seviye anti - TB ilaçlara ve 2. seviye ilaç sınıflarına (Florokinolonlar, aminoglikozidler, tionamidler, peptidler ve sikloserin) olan direnç, hedef genlerdeki veya regülatör bölgelerdeki spesifik mutasyonlara dayandırılmaktadır (Tablo 2.1). Bu nedenle spesifik gen değişiminin (mutasyon, insersiyon veya delesyon) hedef proteinin yapısını değiştirdiğine inanılmaktadır. Dolayısıyla bu da ilacın duyarlılık seviyelerini etkilemektedir (Viveiros, 2003; Louw, 2009). Örneğin *katG* geni, INH' nın aktif formuna dönebilmesi için gereken katalaz ve peroksidaz enzimlerini kodlamaktadır. *katG* genindeki mutasyonlar katalaz aktivitesinde bir azalma sağlayarak daha az INH aktivasyonuna ve *M. tuberculosis'* in INH' ya daha yüksek seviyede dirençli olmasına neden olur. Bunun aksine, *inhA* geninin regülatör veya yapısal bölgelerindeki mutasyonlar düşük seviye INH direnci ile sonuçlanmaktadır (Heym, 1995; 1999; Ramaswamy, 2003). İlginç bir şekilde *inhA*' nın promotor ve kodlama bölgelerindeki mutasyonların ethionamid direncine de neden olduğu bulunmuştur. Bu da aynı genler veya regülatör bölgelerdeki

mutasyonların farklı ilaçlara karşı direnç fenotiplerine neden olabileceğini göstermektedir (Baulard, 2000; Morlock, 2003; Louw, 2009).

Tablo 2.1. Çeşitli anti - TB ilaçlara dirençle ilişkili genler (Louw, 2009).

İlaç	**İlaç aktivitesi**	**Gen**	**Hedef Enzim**	**Dirençle ilgili mutasyon yüzdesi**
İzoniazid	*Hücre duvar sentezi inhibitörü*	*katG*	Katalaz peroksidaz	30-60
		InhA	Yağ asit enoil açil taşıyıcı protein redüktaz A	70-80
		ahpC	Alkil hidroperoksidaz redüktaz	Bilinmiyor
		kasA	B-ketoaçil-ACP sentaz	Bilinmiyor
		ndh	NADH dehidrojenaz	9.5
Rifampin	*RNA sentez inhibitörü*	*rpoB*	RNA polimeraz B subünitesi	95
Streptomisin	*Translasyon inhibitörü*	*rpsL*	Ribozomal protein S12	65-67
		rrs	16S rRNA	
		gidB	7-Metilguanozin metiltransferaz	33
Etambutol	*Hücre duvarı sentez inhibitörü*	*embCAB*	Arabinozil transferaz	70-90
Pirazinamid	*Plazma membranını ve enerji metabolizmasını bozar*	*pncA*	Pirazinamidaz	≥70
		IS*6110* insersiyonu		Bilinmiyor
Etionamid	*Hücre duvar biyosentezini bozar*	*InhA*	Yağ asit enoil açil taşıyıcı protein redüktaz A	≥60
		ethA	Flavin monooksijenaz	≥60
		ethR	Transkripsiyonel represör	Bilinmiyor
Florokinolonlar	*Süpersarmal oluşumunu önler*	*gyrA*	DNA giraz	42-85
		gyrB		

Bununla birlikte, bir kısım klinik *M. tuberculosis* izolatındaki direnç, yukarıda anlatılan klasik gen mutasyonları ile açıklanamamaktadır. Örneğin yaklaşık % 20 - 30 klinik INH dirençli suşta, INH direncine neden olarak bilinen hiçbir gende mutasyon yoktur. Benzer şekilde yaklaşık % 5 klinik RIF dirençli *M. tuberculosis* izolatı, *rpoB* geninin RIF direncini belirleyen bölgelerinde mutasyona sahip değildir. Bu nedenle, çok açık bir şekilde henüz tanımlanmamış daha başka mekanizmalar da, ilaç direncinde rol oynayabilmektedir (Telenti, 1993; Ramaswamy, 1998; 2003).

Mikobakterilerdeki ilaç direncine katkıda bulunan ek mekanizmalar da bulunmaktadır. Bunlar, ilaç modifiye veya inaktive edici enzimlerin üretimi, düşük hücre duvarı geçirgenliği ve eflüks bağımlı mekanizmalardır. Mikobakteriler bazı ilaçları degrade veya modifiye ederek inaktivasyonuna neden olan enzimler üretmektedirler. Örneğin, *M. smegmatis rpoB* geninde hiçbir mutasyon olmamasına rağmen doğal olarak RIF' e dirençlidir. Bu bize RIF direncinde alternatif mekanizma veya mekanizmaların rol oynadığını göstermektedir (Quan, 1997; Telenti, 1997; Lomovskaya; 2001; Louw, 2009). 1995' de, *M. smegmatis* DSM43756 suşunun riboz halkasını RIF'e kovalent olarak bağlayıp ribozilasyonla RIF molekülünü inaktive ettiği gösterilmiştir. Yapılan gen çalışmalarında ribozilasyon yoluyla RIF inaktivasyonunun, *M. smegmatis*' in RIF direncine asıl katkıyı sağladığı açıklanmıştır. Buna rağmen *M. tuberculosis'* te degrade ve modifiye edici enzimlerin varlığı hakkında çok az bilgi vardır. Aminogilikozidlere karşı gelişen bakteriyel direncin fosfotransferazlar, nükleotidiltransferazlar ve asetiltransferazlarla aminogilikozidlerin enzimatik olarak inaktivasyonu ile sağlandığı daha önceden raporlanmıştır (Dabbs, 1995; Davies, 1997; Quan, 1997). Mikobakterilerde asetiltransferaz aac(2')-Ic ve Rv3225c tarafından kodlanan fosfotransferazın, aminoglikozidlere dirençle sonuçlanan aminoglikozid modifiye edici aktiviteleri olduğu gösterilmiştir. Bu mekanizmalar yalnız başlarına klinik dirence katkıda bulunamamakla birlikte, diğer direnç mekanizmaları ile etkileşerek yüksek düzey dirence neden olabilirler (Draker, 2003; Huitric, 2006).

Yeni anti - TB ilaçların dizaynı ve daha yeni tanısal araçların geliştirilmesi için, dirence neden olarak bilinen hedef genlerdeki klasik mutasyonların dışında, mekanizmaların daha derin kavranması önemlidir. Birçok birinci ve ikinci grup anti - TB ilaca giderek daha dirençli olan *M. tuberculosis* gibi patojen mikobakteriler için bu, daha da fazla önem taşımaktadır (Louw, 2009).

2.4.1. Mikobakteriyel İntrinsik Rezistom

İntrinsik rezistom herhangi bir bakteri türünün antibiyotiğe maruz kalması sonucu zamanla kazanmadığı intrinsik direnç olarak tanımlanmaktadır. İntrinsik direnç genellikle bakteriyel zarfın azalmış geçirgenliğinin ve çoklu ilaç atım pompa aktivitelerinin bir sonucudur. Bu, intrinsik direnç bileşenlerinin ana fizyolojik rolünün, hücre geçirgenliğini sınırlayarak toksik metabolitlerin hücre içine girişini önlemek ve toksik bileşenleri veya bunların metabolitlerini aktif olarak hücre dışına atmak olduğunu göstermektedir (Nikaido, 2001; Fajardo, 2008).

Mikobakterilerde toksik bileşenlerin hücre içine girişi, kompleks hücre duvar yapısı ve lipid tabaka tarafından önemli bir şekilde kısıtlanmıştır. Bu balmumu gibi, lipidden zengin hücre duvarı, antibiyotiklerin hücre içine girişini engelleyen önemli bir bariyer ortaya koyan pepdidoglikan, arabinogalaktan ve mikolik asit gibi 3 kovalent bağlı molekül içerir. Membran geçirgenliğindeki azalma, ilaçların hücre içine girişinin azalmasına neden olur ve böylece intrasellüler ilaç birikiminde de bir azalma meydana gelir (Brennan, 1995; Niederweis, 2003; Viveiros, 2003; Pasca, 2005).

DNA sekanslama çalışmaları, *M. tuberculosis* H37Rv genomunun birçoğu daha karakterize edilememiş 150’ ye yakın eflüks proteinini kodladığını göstermiştir. Bu eflüks pompa mekanizmalarının fizyolojik rolleri, muhtemelen basili toksik moleküllerin yüksek intrasellüler seviyelerine karşı korumaktır. Ek olarak hücresel homeostazda ve ekstrasellüler ortamdan toksin veya metabolitlerin transportunda fizyolojik dengeyi sağlarlar. Son zamanlardaki bulgular mikobakterilerin aktif eflüks sistemleri ile birçok ilacı ihraç ettiğini göstermektedir. Bu pompaların

tanımlanmasındaki deneysel işlemler, eflüks pompalarını aşırı eksprese eden laboratuarda indüklenmiş mutantlarla yapılan çalışmalarla sınırlıdır. Klinik izolatlarda çok az çalışma yapılmıştır. Bu nedenle, eflüks pompa genlerinin ekspresyonlarının sıkı bir şekilde düzenlendiği bilindiği halde, bu pompaların indüklenmesi için gerekli spesifik koşullar henüz bilinmemektedir. Bu, fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirmek için gerek duyulduğunda hücre tarafından eflüks pompa genlerinin kullanılabilir olduklarını kesinleştirmektedir (Ainsa, 1998; Viveiros, 2003; Ren, 2006; Louw, 2009).

2.4.2. Çoklu İlaç Direnç Eflüks Pompaları

Çoklu ilaç direnç eflüks pompaları, doğaları gereği birden çok antibiyotiğin intrasellüler konsantrasyonlarını subinhibitör düzeylere düşürmektedirler ve dolayısıyla birçok ilaca birden direnç meydana gelmesine neden oldukları düşünülmektedir (Lomovskaya, 2001; Marquez, 2005). Mevcut kanıtlar *M. tuberculosis'* in farklı antibiyotikleri atabilen birden fazla eflüks pompası içerdiğini göstermektedir (Tablo 2.2). Çoklu ilaç direnç eflüks pompaları ve taşıyıcılar, regülatör bölgelerdeki mutasyonlar nedeniyle overeksprese olabilirler. Başka bir seçenek olarak antibiyotikler, regülatör sistemlerle etkileşime girerek çoklu ilaç direnç eflüks pompalarının ekspresyonlarını indükleyebilirler. Sözü edilen bu mekanizmaların her ikisi de ilaç direnç seviyelerinde artışa yol açarlar. Bu nedenle eflüks pompalarının inaktive edilmeleri veya susturulmaları ilaç direncini kontrol altına almada muhtemel mekanizma olabilir. Bu da bakteriyi daha duyarlı hale getirerek TB tedavisinde kullanılan ilaçların daha düşük dozlarda etki edebilmesini sağlayabilir (Roberts, 1996; Nikaido, 2001; Louw, 2009).

Tablo 2.2. *M. tuberculosis* ilaç direncinde rol oynadığı gösterilmiş olan eflüks pompa genleri ve taşıyıcılar (Louw, 2009).

Gen	İhraç ettiği muhtemel ilaç(lar)	Taşıyıcı ailesi	Fonksiyon	Protein ürünü
pstB	INH, RIF, EMB, Siprofloksasin	ABC	İnorganik fosfatın aktif importu ve ilaç ihracı	Fosfat transport ATP bağlayıcı protein
Rv2686c	Siprofloksasin (CIP)	ABC	İlaçların aktif transportu	İntegral membran ABC taşıyıcı
Rv2687c	CIP	ABC	Yüksek hidrofobik ilaçların ihracı	Antibiyotik transport integral protein
Rv2688c	CIP	ABC	Toksik bileşik ihracı	Antibiyotik transport ATP bağlayıcı protein
Rv1747	INH	ABC	Membrandan ilaç transportu	Korunmuş transmembran ATP bağlayıcı protein
drrA	Tetrasiklin(TET), STR, EMB	ABC	Hücre duvarından antibiyotik ihracı	ATP bağlayıcı protein DrrA
drrB	TET, STR, EMB	ABC	Hücre duvarından antibiyotik ihracı	ATP bağlayıcı protein DrrB
drrC	TET, STR, EMB	ABC	Hücre duvarından antibiyotik ihracı	ATP bağlayıcı protein DrrC
Rv1348	Çoklu ilaç	ABC	İlaçların membrandan aktif ihracı/translokasyonu	Muhtemel ilaç taşıyıcı transmembran ATP bağlayıcı protein
Rv1456c	Belirsiz	ABC	Antibiyotiklerin membrandan aktif ihracı	İntegral membran protein
Rv1463	Belirsiz	ABC	Membrandan aktif transport	Muhtemel korunmuş ATP bağlayıcı protein
Rv1258c	INH, RIF, EMB, Ofloksasin(OFL)	MFS	İlaç ihracı	Korunmuş membran proteini
Rv2994	Belirsiz	MFS	İlaç ihracı	Korunmuş membran proteini
Rv1877	TET, eritromisin	MFS	İlaç ihracı	Korunmuş membran proteini
Rv1634	Belirsiz	MFS	İlaç ve şeker ihracı	İlaç ihraç membran proteini
efpA	Muhtemelen INH	MFS	İlaç ihracı	İntegral membran ihraç proteini
Rv2333c	TET	MFS	İlaç ihracı	Korunmuş integral membran transport proteini
Rv2459c	İlaçlar	MFS	Substrat transportu	Korunmuş integral membran transport proteini
Rv3239c	İlaç veya şeker	MFS	İhraçla ilişkili olabilir	Korunmuş transmembran transport proteini
Rv3728	İlaç veya şeker	MFS	İhraçla ilişkili	Korunmuş 2 bölgeli membran proteini
mmpL7	INH	RND	Antibiyotik ihracı	Transmembran transport proteini
emrB	Belirsiz	SMR	Çoklu ilaç ihracı	İntegral membran ihraç proteini
mmr	Eritromisin	SMR	Çoklu ilaç ihracı	İntegral membran ihraç proteini
whiB7	RIF	Regülatör protein	Transkripsiyonel regülasyon	Transkripsiyonel regülasyon proteini ve efektör gen
Rv2989	Belirsiz	Transkripsiyonel regülatör	Transkripsiyonel mekanizma	Transkripsiyonel regülatör protein
iniA	INH, EMB	Membran proteini	İlaç transportu	INH-indükleyici protein IniA
iniB	INH	Membran proteini	İlaç transportu	INH-indükleyici protein IniB
iniC	INH	Membran proteini	Transkripsiyonel mekanizma	INH-indükleyici protein IniC
Rv1002c	Belirsiz	Membran proteini	Fonksiyonu bilinmiyor	İntegral membran proteini
Rv3806c	Belirsiz	Membran proteini	Fonksiyonu bilinmiyor	İntegral membran proteini
Rv3679	Belirsiz	ATPaz	Anyon ihracı	Muhtemelen anyon taşıyıcı

2.4.2.1. Sekonder çoklu ilaç taşıyıcıları

Sekonder çoklu ilaç taşıyıcıları, ilaçları hücreden ihraç etmek için protonların veya sodyum iyonlarının transmembran elektrokimyasal akımını kullanırlar. 4 aileye ayrılırlar: Major Facilitator superfamily (MFS), Small multidrug resistance family (SMR), Resistance nodulation cell division family (RND) ve Multidrug and toxic compound extrusion family. Çoğu RND proteini çoklu ilaç taşıyıcılarıdır ve çoğunlukla gram negatif bakterilerde bulunurlar. SMR proteinleri katyonik, lipofilik antibiyotikleri bağlarlar ve proton değiş tokuşu ile membrandan dışarı taşırlar. MFS ve RND ailelerinin taşıyıcılarının ekspresyonları regülatör kontrollere bağımlıdırlar (Ainsa, 1998; Kumar, 2005; Marquez, 2005; De Rossi, 2006).

2.4.2.2. ABC tipi çoklu ilaç taşıyıcılar

ATP bağlayıcı kaset (ABC) tipi çoklu ilaç taşıyıcılar, ilaçları hücre dışına pompalamak için ATP hidrolizi ile açığa çıkan serbest enerjiyi kullanırlar. ABC taşıyıcılar *M. tuberculosis* genomunun % 2,5' unu kapsarlar ve substratlarının translokasyon yönlerine dayanarak içe aktarıcı veya dışa ihraç edici olarak sınıflandırılabilirler. İsimlerinden de anlaşılacağı gibi, ihraç edici moleküller substratları sitoplazmadan dış ortama çıkarırlarken, içe aktarıcı olanlar ekstrasellüler moleküllerin hücreye girişi ile ilgilidirler (Louw, 2009).

M. smegmatis' in INH' ya, *M. tuberculosis'* den 300 kat daha dirençli olması, eflüksle ilgili mekanizmaların önemli bir kanıtıdır. *M. tuberculosis mmpL7* geninin *M. smegmatis'* te overekspresyonu, INH' ya karşı yüksek düzey direnç sağlar. Eflüks pompası inhibitörleri olan reserpin, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), *ortho*-vana-date ve verapamilin eklenmesi ile *M. smegmatis'* te INH direnç düzeyleri azalır. Bu sonuçlar *mmpL7*' nin INH' nın enerji bağımlı ihracı ile ilgili olduğunu gösterir. Yapılan çalışmalar, *M. tuberculosis'* in INH' ya uzamış maruziyetinin eflüks sistemlerini indükleyebileceğini göstermektedir ve bu da artan bir direnç fenotipine neden olmaktadır (Choudhuri, 1999; Viveiros, 2002; Pasca, 2005). *M. tuberculosis iniA* geninin incelenmesi, eflüks bağımlı INH direncine daha fazla kanıt sağlamıştır. INH ve EMB' ye karşı dirence neden olan eflüks pompa aktivitesini için *iniA* geninin gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu da, *iniA*' nın birçok

ilaca karşı direnç gelişmesine yol açarak, MDR veya XDR-TB gelişmesine neden olabileceğini göstermektedir. *iniA* geni bulunmayan *M. tuberculosis* suşları, INH' ya karşı artmış bir duyarlılık gösterirler. Kantitatif reverse transkriptaz-PZR ile *M. tuberculosis* klinik izolatlarının gen ekspresyon farklılıklarının çalışıldığı son araştırmalarda, birçok MFS eflüks pompası geninin (*efpA*, *pstB*, Rv1258c ve Rv1410c) ve ABC taşıyıcılarının (Rv1819c ve Rv2136c) INH varlığında overeksprese oldukları gösterilmiştir. Bu sonuçların tümü *M. tuberculosis'* deki INH direncinin, bilinen genlerdeki mutasyonlara dayandırıldığını ve eflüks ilişkili mekanizmalardan etkilenebileceğini göstermektedir (Wilson, 1999; Colangeli, 2005; Gupta, 2006; Jiang, 2008).

RIF dirençli *Mycobacterium avium* ve *M. tuberculosis* izolatlarındaki *rpoB* genindeki mutasyonlar tanımlanmış olsa da, bazı *M. avium* ve *M. intracellulare* klinik izolatları, *rpoB* mutasyonlarının yokluğunda RIF' e önemli düzeyde doğal direnç göstermektedir. Ve bu muhtemelen permeabilite bariyerinin bir sonucudur. Vahşi tip *M. smegmatis*, *M. aurum* ve *M. tuberculosis'* teki düşük seviye RIF direncinin, ilacı ihraç eden eflüks mekanizmasından kaynaklanabileceği gösterilmiştir (Guerrero, 1994; Portillo-Gomez, 1995; Piddock, 2000; Obata, 2006). RIF dirençli klinik *M. tuberculosis* izolatlarındaki direncin % 95' i, RIF direnç belirleyici bölgedeki mutasyonlara dayandırılsa da, *M. tuberculosis'* te eflükse bağlı RIF direnç mekanizmalarının rol alabileceğini gösteren kanıtlar vardır. Bu çalışmalarda, klinik *M. tuberculosis* izolatlarında RIF' in *tap*-benzeri bir pompa olan Rv1258c ve diğer varsayılan eflüks pompalarının (Rv1410c, Rv1819c ve Rv2136c) ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir. Buna ek olarak bir ABC taşıyıcı olan *pstB'* nin de RIF varlığında ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Siddiqi, 2004; Gupta, 2006; Jiang, 2008).

MFS süperailesinden olan *tap* benzeri Rv1258c geninin, *M. smegmatis'* te eksprese edildiğinde tetrasiklin ve aminoglikozilere düşük seviyede dirence neden olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda MDR - TB izolatında INH ve RIF varlığında Rv1258c ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. TET ve aminoglikozidlere eflüks aracılı ilaç direncine bir başka örnek de *M. bovis'* den izole edilen, mikobakterilerde TET ve

aminoglikozid eflüks pompaları ile ilişkili olduğu gösterilmiş olan ve Rv1410c geninin kodladığı P55 proteini verilebilir. P55 eksprese eden hücrelere CCCP, verapamil ve rezerpin eklenmesi, STR ve TET direnç seviyelerini azaltır. Bu, P55' in eflüks pompa inhibitörlerine duyarlı olduğunu ve ilaçları ihraç edebilmek amacıyla proton akımından doğan enerjiyi kullandığını göstermektedir (Ainsa, 1998; Silva, 2001; Jiang, 2008). Aminoglikozid ve TET ilişkili ihraca diğer örnekler, klinikte kullanılan TET, STR ve EMB' yi içeren geniş aralıktaki antibiyotiklere karşı direçle ilişkili bulunan, *M. smegmatis'* teki ABC taşıyıcı proteinler olan *drrAB* genlerinin ekspresyonlarıdır. Bu hücrelere rezerpin ve verapamil eklenmesi direnç fenotipini ters çevirmektedir (Choudhuri, 2002; Geiman, 2006; Gupta, 2006).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. *M. tuberculosis* Suşları

M. tuberculosis suşları, Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Hastanesi' nde tüberküloz tanısı ile yatarak tedavi gören hastalara ait klinik örneklerden, tedavileri öncesinde, aynı hastanenin Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuarında ilaçsız Lowenstein-Jensen besiyeri üzerinde üretilerek izole edilmiştir. Yine aynı laboratuarda bu suşların LJ' de proporsiyon metodu ile (INH: 0,2 - 1 µg/ml, RIF: 40 µg/ml, EMB: 2 µg/ml, STR: 4 µg/ml kritik konsantrasyonlarında) direnç fenotipleri saptanarak, çoklu ilaç dirençli 10 ve tüm ilk basamak anti - TB ilaçlara duyarlı 10 *M. tuberculosis* suşu çalışmaya alınmıştır. *M. tuberculosis* suşlarının alımı, Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Hastanesi'nde, 30.04.2008 tarihli Etik Kurul kararı ile onaylanmıştır.

Duyarlı suşlar S1-S10, çoklu dirençli suşlar ise R1-R10 olarak adlandırılarak çalışılmıştır. Çoklu dirençli suşların primer anti - TB ilaçlara gösterdikleri direnç fenotipleri Tablo 3.1' de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Çalışmaya alınan MDR suşların primer anti - TB ilaçlara direnç fenotipleri (R:Dirençli, S: Duyarlı)

Suş	INH	RIF	STR	EMB
R1	R	R	R	R
R2	R	R	R	R
R3	R	R	R	S
R4	R	R	R	R
R5	R	R	R	R
R6	R	R	R	R
R7	R	R	R	S
R8	R	R	R	R
R9	R	R	R	S
R10	R	R	R	S

M. tuberculosis H37Rv ATCC 25618, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşu olmak üzere 3 standart suş, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı' ndan temin edilmiştir.

3.2. Eflüks Pompa Genleri

Çalışmamızda ekspresyonlarını araştırdığımız eflüks pompa yapısına giren genler Tablo 3.2' de gösterilmiştir (Ren, 2007; Louw, 2009; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/). Çalışmaya 15 gen yaklaşık 150 gen arasından seçilerek dahil edilmiştir. İlk 8 pompa geni muhtemel direnç artışı sağlayan ve üzerlerinde daha önce araştırma yapılmış olan genlerden, kalan 7 pompa ise üzerlerinde daha önce çalışma yapılmamış, sadece membran pompa proteinleri oldukları gösterilmiş olan genlerden seçilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada araştırılan eflüks pompalarının özellikleri (Ren, 2007; Louw, 2009; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/).

Gen	Pompa Ailesi	Fonksiyon
1- Rv1410c	MFS	Tetrasiklin ve Aminoglikozidlerin membrandan ihracı
2- Rv2333c	MFS	İlaçların ihracı (TET)
3- drrA	ABC	Hücre duvarından antibiyotik ihracı (TET, STR, EMB)
4- drrB	ABC	Hücre duvarından antibiyotik ihracı (TET, STR, EMB)
5- iniA	Membran proteini	İlaç taşıyıcı (INH, EMB)
6- mmpL7	RND	Antibiyotik ihracı (INH)
7- Rv1258c	MFS	İlaçların ihracı (INH, RIF, EMB, OFL)
8- Rv0783c	MFS	İhraç ile çoklu ilaç direnci
9- Rv1273c	ABC	İhraç ile çoklu ilaç direnci
10- Rv1687c	ABC	Membrandan aktif transportla ilaç ihracı
11- Rv1250	MFS	İhraç mekanizması ile ilaç direnci
12- Rv1634	MFS	İhraç mekanizması ile ilaç direnci
13- Rv3000	ABC	Çoklu İlaç İhracı?
14- mmpL4	RND	İhraç?
15- Rv0037c	MFS	Muhtemelen makrolidlerin membrandan taşınmalarıyla ilişkili

3.3. Gereçler

3.3.1. Besiyerleri

Lowenstein Jensen Besiyeri

3.3.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Etil Alkol (SIGMA, USA)
Agaroz (VIVANTIS, AG6330)
Etidyum bromür (APPLICHEM, 1239458)
Taq DNA Polimeraz (FERMENTAS, 37)
10X PZR Buffer (FERMENTAS, 37)
10 mM $MgCl_2$ (FERMENTAS, 37)
dNTP Karışımı (FERMENTAS, 37)
Primerler (IDT)
DNA moleküler büyüklük belirteci (Doç. Dr. Fikret ŞAHİN)
1X Loading Dye Solution (FERMENTAS, 9903)
RNA Ekstraksiyon kiti (Trizol Reagent, Kloroform, İzopropil Alkol, Etanol) (INVITROGEN, 15596-026)
EZ-First Strand cDNA Synthesis Kit (oligo dT Primer, RT Reaction Mix, DTT Solution) (BIOLOGICAL IDUSTRIES, 20-800-50)

3.3.3. Sarf Malzemeleri

Steril 1,5 ml' lik eppendorf (ORANGE SCIENTIFIC, Belçika)
Steril PZR Tüpü 0,2 ml (ORANGE SCIENTIFIC, Belçika)
Steril Filtreli Pipet Uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (RATIOLAB, Almanya)
Lateks Muayene Eldiveni (DOLPHIN, Türkiye)

3.3.4. Araçlar

Santrifüj (EPPENDORF, Almanya)
Soğutmalı Santrifüj (HERMLE Z233 MK-2, Almanya)
Kuru Isıtıcı Blok (HVD, Avusturya)
Elektroforez Tankı (SUNRISE, ABD)
Elektroforez Güç Kaynağı (BIO-RAD, ABD)
Otomatik Pipetler (EPPENDORF, Almanya)
UV Translüminatör (VIBER-LOURMAT TFX-20.M, Fransa)
Isı Döngü Cihazı (Thermalcycler) (TECHNE, İngiltere)
Otoklav (NÜVE, Türkiye)
Vorteks (HVD, Avusturya)
Fotoğraf Makinesi (CANON POWER SHOT G5, Kanada)
Çalkalayıcı (HVD, Avusturya)
Etüv (HERAEUS, Almanya)
Spektrofotometre (HITACHI, Japonya)
Class II Güvenlik Kabini (CLEANLAF, Danimarka)
Mikrodalga Fırın (VESTEL, Türkiye)
Hassas Terazi (METTLER- TOLEDO, İsviçre)
Derin Dondurucu (BOSCH, Almanya)

3.3.5. Jel Elektroforez İşleminde Kullanılan Solüsyonlar

Agaroz Jel (%1,2):

Hazırlanışı:
Agar ..... 1,7 g
TBE X 1 ..... 140 ml
Etidyum Bromür ..... 7,5 µl

TBE X 5 Tamponu:

Hazırlanışı:

TRIS base 54g

Borik Asit ..... 27,5 g

0,5 M EDTA (pH 8,0) ..... 20 ml

dd H_2O ..... 980 ml

TBE X 1 Tamponu:

Hazırlanışı:

TBE X 5 ..... 200 ml

dd H_2O ..... 800 ml

3.4. *M. tuberculosis* Suşlarından RNA Ekstraksiyonu

INVITROGEN RNA Ekstraksiyon kiti protokolünde ufak değişiklik yapılarak, duyarlı ve dirençli her bir suşa ve *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşlarına RNA ekstraksiyon işlemi uygulandı.

1. Ependorflara 1 ml trizol reagent kondu.
2. LJ besiyerinde üremiş olan *M. tuberculosis* suşlarından özel imal edilmiş kalın özeler yardımı ile koloniler, besiyeri yüzeyinden 1 öze dolusu olacak şekilde kazınarak toplandı ve trizol reagent içerisinde homojenize edildi.
3. 1 gece boyunca oda ısısında çalkalayıcıda bekletildi.
4. 0,2 ml kloroform eklendi.
5. 15 sn çok hızlı çalkalandı.
6. 3 dk bekletildi.
7. 12.000 rpm' de 15 dakika + 4 ^{o}C' de santrifüj edildi.
8. Ependorfun üzerindeki saydam fazdan süpernatant temiz bir şekilde steril bir ependorfa aktarıldı.

9. 0,5 ml izopropil alkol eklendi ve 8 - 10 defa ters düz edildi.
10. 10 dk oda ısısında bekletildi.
11. 12.000 rpm' de 10 dk + 4 ^{o}C' de santrifüj edildi.
12. Pelete (Dipteki RNA) dikkat edilerek süpernatan boşaltıldı.
13. 1 ml % 75 etanol eklendi.
14. Vortekslenerek 8.000 rpm' de 6 dk + 4 ^{o}C' de santrifüj edildi.
15. Süpernatan dikkatli bir şekilde boşaltıldı.
16. Yarım saat etanolün uçması beklendi.
17. 50 µl RNase free H_2O eklenerek agaroz jelde yürütüldü.
18. Her bir suştan elde edilen RNA' lar - 20 ^{o}C' de saklandı.

Duyarlı ve dirençli suşlardan beşer adet aynı gün yapılmak üzere alınan mikobakterilerden yukarıdaki yöntemle RNA ekstraksiyonu yapıldı ve cDNA sentezine hazır hale getirildi. Ayrıca % 1,2' lik agaroz jel elektroforezinde RNA zincirlerinin bütünlüğü görüldü.

3.5. Elde Edilen RNA' ların Spektrofotometre ile Ölçümü

Her bir suşta aynı miktarda cDNA olması için elde edilen RNA konsantrasyonları absorbans özelliğine göre spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüldü. Bu ölçümlere göre cDNA sentezinde her suş için RNA miktarları belirlendi.

3.6. cDNA Sentezi

EZ-First Strand cDNA Synthesis Kit protokolüne göre her bir suştan elde edilen RNA' lara cDNA sentez işlemi uygulandı.

1. Her suş için hesaplanan RNA miktarı ve hacmi tamamlamak amacıyla RNAse free steril distile H_2O, toplam hacim 9 µl olacak şekilde karıştırıldı. Üzerine 1 µl oligo dT eklendi, vorteksleme ve santrifüjleme işlemlerinden sonra kuru ısıtma bloğunda 70 ^{o}C' de 10 dk bekletildi.
2. Sonra buza kondu.

3. 8 µl RT Reaksiyon Mix ve 2 µl DTT Çözeltisi eklendi, vorteksleme ve santrifüjleme işlemlerinden sonra kuru ısıtma bloğunda 42 ^{o}C' de 1 saat bekletildi.
4. Elde edilen cDNA' lar -20 ^{o}C' de saklandı.

3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalışmamızda koamplifikasyon ve hedef gen ile internal kontrolün karşılaştırılabilmesi için multipleks RT - PZR uygulanmıştır. Bu amaçla her reaksiyonda biri internal kontrol olmak üzere 2 primer çifti kullanılmıştır (Wilson, 1999).

PZR uygulaması sırasında kontaminasyonu önlemek amacıyla; deneyler sırasında tek kullanımlık pipet uçları ve tüpler kullanılmış, test karışımları ile örneklerin hazırlanması, amplifikasyon ve elektroforez aşamaları farklı odalarda yapılmıştır. Örneklerin PZR için hazırlanması aşamaları class II güvenlik kabininde gerçekleştirilmiş, çalışmaya başlamadan önce kabin içi %70' lik etil alkol ile silinmiş, kabin yarım saatten az olmamak kaydıyla hava akımı sağlanacak şekilde çalıştırılmış ve ultraviyole ışığına tabi tutulmuştur.

3.7.1. Örneklerin Hazırlanması

Elde edilen cDNA' lar 1/10 olarak sulandırılmış ve PZR' de kullanılmıştır.

3.7.2. Primerlerin Seçilmesi

Bu çalışmada kullanılan primerler http://www.ebi.ac.uk/clustalw sekans programı kullanılarak dizayn edilmiştir. Tablo 3.3' te çalışmada kullanılan primerlerin listesi görülmektedir. Çalışmamızda internal kontrol olarak 16S rRNA geni kullanılmıştır (Roth, 1998).

Tablo 3.3. PZR' de kullanılan primerler.

Gen	Primer Sekansı	PZR ürününün büyüklüğü (bç)
Rv1410c	5'TCT TGG ACT TCC GGT TCA TC-3' 5'TAC CGG TTC AAC CAG ATC CTG-3'	221
Rv2333c	5'ATA TGA CTA ACC GCG CAC TC-3' 5'TTG CGG AGG AGG ATT TCA TC-3'	178
drrA	5'ATG GTG GAC ATC TTG TCG AC-3' 5'AGG TTC TGC TCA CCG GAA AG-3'	158
drrB	5'AAT ACA TCA CGC CGT TGG TC-3' 5'AAC GGA ATC CGA TGA CGT AG-3'	224
iniA	5'TGA TCT AGT ACA GCG GTT GAC G-3' 5'TGT AGC TTA CGA CGG TGA TC-3'	187
mmpL7	5'TAC CCA AGC TGG AAA CAA CC-3' 5'AAG GTC CAG TTG TCC GTC AG-3'	227
Rv1258c	5'AGT TAT AGA TCG GCT GGA TGG-3' 5'AAT ACT TCA CCG ACC ACC AGC AAC-3'	255
Rv1273c	5'TCC GAG AAG GTG ATG ATG TG-3' 5'TAT ACC TCC CGA CGG TCA AC-3'	214
Rv1687c	5'ACA GAA ACG CTT CCT CCA GTG-3' 5'ATT GCG CGT CGA ATT ATG G-3'	200
Rv1250	5'TGT CTG GTG CGG GAA TGT TTC-3' 5'TTG AAG ACC TCC AGT GGG ATC-3'	172
Rv1634	5'TAT CTG GGC ACC TCC ATA GTG-3' 5'AAC ATC GTA TTG ACG GTG G-3'	182
Rv3000	5'TCT GGA TGT GCT CGT GTT AC-3' 5'AAC GAC TTT CGT GGA GTC GAT C-3'	238
mmpL4	5'TTG CAC GTG CTT CTT ATC GG-3' 5'TGC GTC GTT GTC ACC GTA TTT G-3'	246
Rv0783c	5'TAT GAG CGG ATG TTC TGT GC-3' 5'AAC TTC GAC TAC ATG GG CCT C-3'	186
Rv0037c	5'AAA GGA AGC CGC ATA CCA CCA TC-3' 5'TCA CTG CTG ATC TTG CTC CTG-3'	244
16S rRNA (internal kontrol)	5'CTT AAC ACA TGC AAG TCG AAC-3' 5'GTA TCT CAG TCC CAG TGT G-3'	280

3.7.3. DNA Amplifikasyonu

Her bir suştan elde edilen cDNA' lar, internal kontrol primerleri ve duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkını araştırdığımız genlerin primerleri ile multipleks PZR yapılmıştır. Bunun için PZR karışımı hazırlandı: 10X PZR tamponu; 2,5 U Taq DNA Polimeraz; 1,5 mM $MgCl_2$; 200 µM dNTP; 1µg cDNA, her genin logaritmik artış fazını belirleme PZR' sinde her bir primerden 25 pmol, döngü sayısı belirlendikten sonra her primer o oranda ayarlanarak kullanılıp son hacim 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Örnekler; ısı döngü cihazında (thermalcycler); ilk denatürasyon için 94 ^oC' de 2 dk, daha sonra her bir gen için belirlenen döngü sayısında (94 ^oC' de 50 sn, 60 ^oC' de 50 sn, 72 ^oC' de 1 dk) olacak şekilde çalıştırıldı. Son olarak, 72 ^oC' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırıldı.

3.7.4. PZR Ürünlerinin Saptanması

PZR ürünlerinin saptanması amacıyla 10 µl PZR ürününün, TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda jel elektroforezi yapıldı. Agaroz jelde yürütülen DNA' lar etidyum bromür ile işaretlenerek UV translüminatör ile incelendi. PZR ürünlerinin büyüklükleri DNA moleküler belirtecinin bantları ile karşılaştırılarak doğrulandı ve jel görüntüleri dijital fotoğraf makinesi ile görüntülenerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

3.7.5. Duyarlı ve Dirençli Suşlar Arasındaki Ekspresyon Farkı Ölçümü

Bu amaçla imageJ programı kullanıldı. Bu program ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarıldı. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlar arasında fark aranan gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlandı. Son olarak bu oranlar tablo haline getirildi.

3.7.6. İstatistiksel değerlendirme

Çalışmalar üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar Student' s T-testi (two-tailed t-test) ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

3.8. Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme

Multipleks PZR' de incelenecek olan genlerin ekspresyon miktarları arasındaki farklılığın, genlerin logaritmik artış fazında araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle öncelikle genlerin hangi döngüde logaritmik artış fazında oldukları araştırılmıştır. Her gen ile internal kontrol bantlarını eşit veya yakın yoğunlukta gösterecek primer miktarlarını belirlemek amacıyla belirli döngülerde multipleks PZR uygulanıp daha sonra her gen için belirlenen döngü ve gen/internal kontrol primer oranlarında multipleks PZR uygulanmıştır.

Bu amaçla, Rv1410c ve Rv2333c genleri 34. ve 35. döngülerde; *drrA, drrB, iniA* ve *mmpL7* genleri 27., 30. ve 33. döngülerde; Rv1258c geni 26., 29. ve 33. döngülerde; Rv1273c, Rv1687c, Rv3000, *mmpL4,* Rv1250, Rv1634, Rv0783c ve Rv0037c genleri 29, 33 ve 37. döngülerde internal kontrollü multipleks PZR yapılmıştır.

Bu PZR' lerde kullanılan cDNA, tüm suşlardan daha önce elde edilen cDNA' ların karışımından hazırlanan cDNA mixten alınmıştır. Aynı zamanda her gen ve internal kontrol primerleri 1/1 oranında PZR karışımına eklenmiştir. Daha sonra elde edilen görüntülere göre araştırılan her gen için, gen/IK oranı ve logaritmik artış fazının gözlendiği döngü sayısı belirlenip, buna göre asıl multipleks PZR çalışmalarına geçilmiştir.

3.8.1. PZR Yöntemi ile Rv1410c ve Rv2333c Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme

Rv1410c ve Rv2333c genlerinin logaritmik artış fazlarını belirlemek amacıyla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir (Tüm suşlardan daha önce elde ettiğimiz cDNA' ların karışımından hazırladığımız cDNA mixten alınmıştır). PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^{o}C' de 2 dk bekletildikten

sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^{o}C' de 50 sn, 60 ^{o}C' de 50 sn, 72 ^{o}C' de 1 dk olacak şekilde 2 seferde 34 ve 35 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^{o}C' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix (Rv1410c)***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
Rv1410c F primer		25 pmol×N
Rv1410c R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR protokolü	***Master mix (Rv2333c)***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
Rv2333c F primer		25 pmol×N
Rv2333c R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 ^{o}C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 ^{o}C'de 50 saniye	34 ve 35 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 ^{o}C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 ^{o}C'de 1 dakika	
Son uzama	72 ^{o}C'de 10 dakika	

PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 40 dakika 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve IK ve genin bant yoğunluklarına göre bir sonraki aşamadaki primer miktarları ile döngü sayısına karar verilmiştir. Son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.8.2. PZR Yöntemi ile *drrA, drrB, iniA* ve *mmpL7* Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme

drrA, drrB, iniA ve *mmpL7* genlerinin logaritmik artış fazlarını belirlemek amacıyla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir (Tüm suşlardan daha önce elde ettiğimiz cDNA' ların karışımından hazırladığımız cDNA mixten alınmıştır). PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^oC' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^oC' de 50 sn, 60 ^oC' de 50 sn, 72 ^oC' de 1 dk olacak şekilde 3 seferde 27, 30 ve 33 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^oC' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix (drrA)***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
drrA F primer		25 pmol×N
drrA R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR protokolü ***Master mix (drrB)*** ***N***

dH_2O	×N
Tampon	10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP	200 µM×N
$MgCl_2$	1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)	25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)	25 pmol×N
drrB F primer	25 pmol×N
drrB R primer	25 pmol×N
Taq polimeraz	2,5 U×N
DNA	1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR protokolü ***Master mix (iniA)*** ***N***

dH_2O	×N
Tampon	10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP	200 µM×N
$MgCl_2$	1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)	25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)	25 pmol×N
iniA F primer	25 pmol×N
iniA R primer	25 pmol×N
Taq polimeraz	2,5 U×N
DNA	1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR protokolü ***Master mix (mmpL7)*** ***N***

dH_2O	×N
Tampon	10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP	200 µM×N
$MgCl_2$	1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)	25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)	25 pmol×N
mmpL7 F primer	25 pmol×N
mmpL7 R primer	25 pmol×N
Taq polimeraz	2,5 U×N
DNA	1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C'de 50 saniye	27, 30 ve 33 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 °C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1 saat 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve IK ve genin bant yoğunluklarına göre bir sonraki aşamadaki primer miktarları ile döngü sayısına karar verilmiştir. Son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.8.3. PZR Yöntemi ile Rv1258c Geninin Logaritmik Artış Fazını Belirleme

Rv1258c geninin logaritmik artış fazını belirlemek amacıyla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir (Tüm suşlardan daha önce elde ettiğimiz cDNA' ların karışımından hazırladığımız cDNA mixten alınmıştır). PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 °C' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 °C' de 50 sn, 60 °C' de 50 sn, 72 °C' de 1 dk olacak şekilde 3 seferde 26, 29 ve 33 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 °C' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix (Rv1258c)***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
Rv1258c F primer		25 pmol×N
Rv1258c R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C'de 50 saniye	26, 29 ve 33 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 °C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1,5 saat 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve IK ve genin bant yoğunluklarına göre bir sonraki aşamadaki primer miktarları ile döngü sayısına karar verilmiştir. Son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.8.4. PZR Yöntemi ile Rv1273c, Rv1687c, Rv3000, *mmpL4*, Rv1250, Rv1634, Rv0783c ve Rv0037c Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme

Rv1273c, Rv1687c, Rv3000, *mmpL4,* Rv1250, Rv1634, Rv0783c ve Rv0037c genlerinin logaritmik artış fazlarını belirlemek amacıyla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir (Tüm suşlardan daha önce elde ettiğimiz cDNA' ların karışımından hazırladığımız cDNA mixten alınmıştır). PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^oC' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^oC' de 50 sn, 60 ^oC' de 50 sn, 72 ^oC' de 1 dk olacak şekilde 3 seferde 29, 33 ve 37 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^oC' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix (Rv1273c)***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
Rv1273c F primer		25 pmol×N
Rv1273c R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR protokolü	***Master mix (Rv1687c)***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
Rv1687c F primer		25 pmol×N
Rv1687c R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR protokolü ***Master mix (Rv3000)*** ***N***

dH_2O	×N
Tampon	10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP	200 µM×N
$MgCl_2$	1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)	25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)	25 pmol×N
Rv3000 F primer	25 pmol×N
Rv3000 R primer	25 pmol×N
Taq polimeraz	2,5 U×N
DNA	1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR protokolü ***Master mix (mmpL4)*** ***N***

dH_2O	×N
Tampon	10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP	200 µM×N
$MgCl_2$	1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)	25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)	25 pmol×N
mmpL4 F primer	25 pmol×N
mmpL4 R primer	25 pmol×N
Taq polimeraz	2,5 U×N
DNA	1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR protokolü ***Master mix (Rv1250)*** ***N***

dH_2O	×N
Tampon	10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP	200 µM×N
$MgCl_2$	1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)	25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)	25 pmol×N
Rv1250 F primer	25 pmol×N
Rv1250 R primer	25 pmol×N
Taq polimeraz	2,5 U×N
DNA	1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR protokolü ***Master mix (Rv1634)*** ***N***

dH_2O	×N
Tampon	10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP	200 µM×N
$MgCl_2$	1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)	25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)	25 pmol×N
Rv1634 F primer	25 pmol×N
Rv1634 R primer	25 pmol×N
Taq polimeraz	2,5 U×N
DNA	1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR protokolü ***Master mix (Rv0783c)*** ***N***

dH_2O	×N
Tampon	10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP	200 µM×N
$MgCl_2$	1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)	25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)	25 pmol×N
Rv0783c F primer	25 pmol×N
Rv0783c R primer	25 pmol×N
Taq polimeraz	2,5 U×N
DNA	1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR protokolü ***Master mix (Rv0037c)*** ***N***

dH_2O	×N
Tampon	10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP	200 µM×N
$MgCl_2$	1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)	25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)	25 pmol×N
Rv0037c F primer	25 pmol×N
Rv0037c R primer	25 pmol×N
Taq polimeraz	2,5 U×N
DNA	1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C'de 50 saniye	29, 33 ve 37 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 °C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1 saat 10 dakika 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve IK ve genin bant yoğunluklarına göre bir sonraki aşamadaki primer miktarları ile döngü sayısına karar verilmiştir. Son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9. Multipleks PZR çalışmaları

3.9.1. Rv1410c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 33 döngüde, Rv1410c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 °C' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 °C' de 50 sn, 60 °C' de 50 sn, 72 °C' de 1 dk olacak şekilde 33 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 °C' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
Rv1410c F primer		25 pmol×N
Rv1410c R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C'de 50 saniye	33 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 °C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

3.9.1.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1 saat 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.1.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1410c gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.2. Rv2333c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 32 döngüde, Rv2333c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 16S rRNA gen primerlerinden 25 pmol, Rv2333c gen primerlerinden 12,5 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^oC' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^oC' de 50 sn, 60 ^oC' de 50 sn, 72 ^oC' de 1 dk olacak şekilde 32 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^oC' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
Rv2333c F primer		12,5 pmol×N
Rv2333c R primer		12,5 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N
TV = 50 µl×N		

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 ^oC' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 ^oC'de 50 saniye	32 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 ^oC'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 ^oC'de 1 dakika	
Son uzama	72 ^oC'de 10 dakika	

3.9.2.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 45 dakika 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.2.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv2333c gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.3. *drrA* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 26 döngüde, *drrA* geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^{o}C' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^{o}C' de 50 sn, 60 ^{o}C' de 50 sn, 72 ^{o}C' de 1 dk olacak şekilde 26 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^{o}C' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
drrA F primer		25 pmol×N
drrA R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C'de 50 saniye	26 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 °C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

3.9.3.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 50 dakika 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.3.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki *drrA* gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.4. *drrB* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 26 döngüde, *drrB* geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 16S rRNA gen primerlerinden 25 pmol, *drrB* gen primerlerinden 12,5 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^oC' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^oC' de 50 sn, 60 ^oC' de 50 sn, 72 ^oC' de 1 dk olacak şekilde 26 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^oC' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü — ***Master mix*** — ***N***

dH_2O	×N
Tampon	10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP	200 µM×N
$MgCl_2$	1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)	25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)	25 pmol×N
drrB F primer	12,5 pmol×N
drrB R primer	12,5 pmol×N
Taq polimeraz	2,5 U×N
DNA	1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 ^oC' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 ^oC'de 50 saniye	26 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 ^oC'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 ^oC'de 1 dakika	
Son uzama	72 ^oC'de 10 dakika	

3.9.4.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1 saat 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.4.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki *drrB* gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.5. *iniA* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 26 döngüde, *iniA* geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^{o}C' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^{o}C' de 50 sn, 60 ^{o}C' de 50 sn, 72 ^{o}C' de 1 dk olacak şekilde 26 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^{o}C' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon	10X $(NH_4)_2SO_4$	×N
dNTP	200 µM	×N
$MgCl_2$	1,5 mM	×N
16S rRNA F primer (IK)	25 pmol	×N
16S rRNA R primer (IK)	25 pmol	×N
iniA F primer	25 pmol	×N
iniA R primer	25 pmol	×N
Taq polimeraz	2,5 U	×N
DNA	1 µg	×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C'de 50 saniye	26 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 °C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

3.9.5.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 50 dakika 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.5.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki *iniA* gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.6. *mmpL7* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 26 döngüde, *mmpL7* geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^oC' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^oC' de 50 sn, 60 ^oC' de 50 sn, 72 ^oC' de 1 dk olacak şekilde 26 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^oC' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
mmpL7 F primer		25 pmol×N
mmpL7 R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 ^oC' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 ^oC'de 50 saniye	26 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 ^oC'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 ^oC'de 1 dakika	
Son uzama	72 ^oC'de 10 dakika	

3.9.6.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1 saat 15 dakika 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.6.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki *mmpL7* gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.7. Rv1258c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 25 döngüde, Rv1258c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^{o}C' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^{o}C' de 50 sn, 60 ^{o}C' de 50 sn, 72 ^{o}C' de 1 dk olacak şekilde 25 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^{o}C' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
Rv1258c F primer		25 pmol×N
Rv1258c R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C'de 50 saniye	25 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 °C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

3.9.7.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1,5 saat 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.7.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1258c gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.8. Rv1273c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 29 döngüde, Rv1273c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 16S rRNA gen primerlerinden 19 pmol, Rv1273c gen primerlerinden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^oC' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^oC' de 50 sn, 60 ^oC' de 50 sn, 72 ^oC' de 1 dk olacak şekilde 29 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^oC' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		19 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		19 pmol×N
Rv1273c F primer		25 pmol×N
Rv1273c R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 ^oC' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 ^oC'de 50 saniye	29 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 ^oC'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 ^oC'de 1 dakika	
Son uzama	72 ^oC'de 10 dakika	

3.9.8.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 40 dakika 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.8.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1273c gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.9. Rv1687c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 30 döngüde, Rv1687c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^{o}C' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^{o}C' de 50 sn, 60 ^{o}C' de 50 sn, 72 ^{o}C' de 1 dk olacak şekilde 30 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^{o}C' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
Rv1687c F primer		25 pmol×N
Rv1687c R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C'de 50 saniye	30 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 °C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

3.9.9.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 50 dakika 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.9.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1687c gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.10. Rv3000 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 37 döngüde, Rv3000 geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 16S rRNA gen primerlerinden 12,5 pmol, Rv3000 gen primerlerinden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^oC' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^oC' de 50 sn, 60 ^oC' de 50 sn, 72 ^oC' de 1 dk olacak şekilde 37 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^oC' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		12,5 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		12,5 pmol×N
Rv3000 F primer		25 pmol×N
Rv3000 R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 ^oC' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 ^oC'de 50 saniye	37 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 ^oC'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 ^oC'de 1 dakika	
Son uzama	72 ^oC'de 10 dakika	

3.9.10.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1,5 saat 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.10.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv3000 gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.11. *mmpL4* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 29 döngüde, *mmpL4* geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 16S rRNA gen primerlerinden 37,5 pmol, *mmpL4* gen primerlerinden 12,5 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^{o}C' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^{o}C' de 50 sn, 60 ^{o}C' de 50 sn, 72 ^{o}C' de 1 dk olacak şekilde 29 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^{o}C' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		37,5 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		37,5 pmol×N
mmpL4 F primer		12,5 pmol×N
mmpL4 R primer		12,5 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C'de 50 saniye	29 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 °C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

3.9.11.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1,5 saat 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.11.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki *mmpL4* gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.12. Rv1250 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 28 döngüde, Rv1250 geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^oC' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^oC' de 50 sn, 60 ^oC' de 50 sn, 72 ^oC' de 1 dk olacak şekilde 28 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^oC' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
Rv1250 F primer		25 pmol×N
Rv1250 R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 ^oC' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 ^oC'de 50 saniye	28 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 ^oC'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 ^oC'de 1 dakika	
Son uzama	72 ^oC'de 10 dakika	

3.9.12.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 40 dakika 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.12.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1250 gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.13. Rv1634 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 28 döngüde, Rv1634 geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, her bir primerden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^{o}C' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^{o}C' de 50 sn, 60 ^{o}C' de 50 sn, 72 ^{o}C' de 1 dk olacak şekilde 28 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^{o}C' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		25 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		25 pmol×N
Rv1634 F primer		25 pmol×N
Rv1634 R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C'de 50 saniye	28 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 °C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

3.9.13.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 45 dakika 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.13.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1634 gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.14. Rv0783c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 29 döngüde, Rv0783c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 16S rRNA gen primerlerinden 12,5 pmol, Rv0783c gen primerlerinden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^oC' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^oC' de 50 sn, 60 ^oC' de 50 sn, 72 ^oC' de 1 dk olacak şekilde 29 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^oC' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		12,5 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		12,5 pmol×N
Rv0783c F primer		25 pmol×N
Rv0783c R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 ^oC' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 ^oC'de 50 saniye	29 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 ^oC'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 ^oC'de 1 dakika	
Son uzama	72 ^oC'de 10 dakika	

3.9.14.1. PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1 saat 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.14.2. Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv0783c gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.9.15. Rv0037c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

Bir önceki aşamada gen/IK oranının hesaplanması ile ve logaritmik artış fazının görüldüğü 34 döngüde, Rv0037c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapıldı. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 16S rRNA gen primerlerinden 19 pmol, Rv0037c gen primerlerinden 25 pmol, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^{o}C' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^{o}C' de 50 sn, 60 ^{o}C' de 50 sn, 72 ^{o}C' de 1 dk olacak şekilde 34 döngü çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^{o}C' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolü	***Master mix***	***N***
dH_2O		×N
Tampon		10X $(NH_4)_2SO_4$×N
dNTP		200 µM×N
$MgCl_2$		1,5 mM×N
16S rRNA F primer (IK)		19 pmol×N
16S rRNA R primer (IK)		19 pmol×N
Rv0037c F primer		25 pmol×N
Rv0037c R primer		25 pmol×N
Taq polimeraz		2,5 U×N
DNA		1 µg×N

TV = 50 µl×N

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C'de 50 saniye	34 döngü
Primer yapışması (anneling)	60 °C'de 50 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72 °C'de 1 dakika	
Son uzama	72 °C'de 10 dakika	

3.9.15.1.PZR ürününün agaroz jel elektroforezinde saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1,5 saat 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

3.9.15.2.Duyarlı ve dirençli suşlar arasındaki ekspresyon farkı ölçümü

imageJ programı ile fotoğraftaki her bir bant yoğunluğunun ölçümü yapılarak Microsoft Excel programına aktarılmıştır. Microsoft Excel programı ile duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv0037c gen bantlarının yoğunlukları ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğu oranlanarak tablo haline getirilmiştir.

3.10. *M. tuberculosis* Standart Suşlarında Multipleks PZR ile Genlerin Amplifikasyonu

Çalışılan genlerin ekspresyon miktarları, *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşlarında da, genlerin logaritmik artış fazındaki döngülerde ve ayarlanan gen/internal kontrol primer oranlarında multipleks PZR yapılarak araştırılmıştır. Bu amaçla, 1 µg cDNA kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP, 16S rRNA gen primerlerinden her gen için hesaplanan miktarda, her gen primeri için yine o gen için hesaplanan miktarda, 2,5 U *Taq* DNA Polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94 ^{o}C' de 2 dk bekletildikten sonra her bir döngü sırasıyla 94 ^{o}C' de 50 sn, 60 ^{o}C' de 50 sn, 72 ^{o}C' de 1 dk olacak şekilde her gen için daha önceden belirlenen döngülerde çalıştırılmıştır. Son olarak, 72 ^{o}C' de 10 dk bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

3.10.1. PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Saptanması

Bu amaçla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu ile süspanse edilerek, 1X TBE tampon ile hazırlanan % 1,2' lik agarozda, 1,5 saat 170 Volt elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi yapıldıktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir. PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve son olarak dijital fotoğraf makinesi ile jel görüntülenmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Hastanesi' nde tüberküloz tanısı ile yatarak tedavi gören hastalara ait klinik örneklerden izole edilmiş olan 20 *M. tuberculosis* suşu kullanılmıştır. Bu şuşların 10' u tüm ilk basamak anti - TB ilaçlara duyarlı, 10' u MDR fenotipi gösteren suşlar olarak çalışmada kullanılmışlardır.

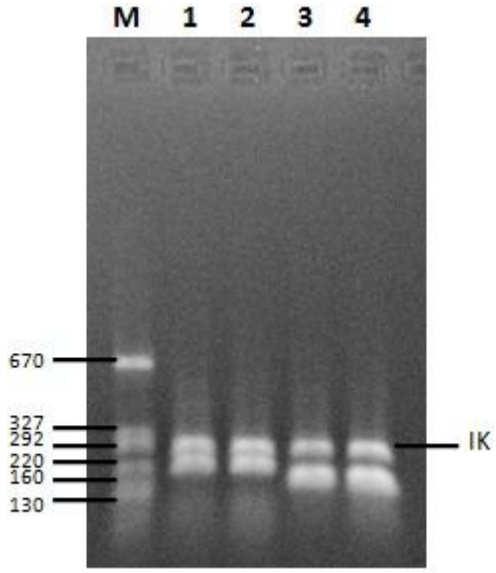
Çalışmaya aldığımız genlerin ekspresyon miktarları multipleks PZR yöntemi ile anti - TB ilaçlara duyarlı ve MDR fenotipi gösteren gruptaki suşlarda çalışılmıştır. Multipleks PZR' de incelenecek olan genlerin ekspresyon miktarları arasındaki farklılığın, en belirgin olarak PZR' deki logaritmik artış fazında araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle öncelikle genlerin hangi döngüde logaritmik artış fazında oldukları araştırılmıştır. Her gen ile internal kontrol bantlarını eşit veya yakın yoğunlukta gösterecek primer miktarlarını belirlemek amacıyla belirli döngülerde multipleks PZR uygulanıp, daha sonra her gen için belirlenen döngü ve gen/internal kontrol primer oranlarında multipleks PZR uygulanmıştır.

En son olarak, bu genlerin ekspresyon miktarları, *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşlarında da pompaların ekspresyonlarının klinik olarak elde edilen *M. tuberculosis* suşlarında görülmeye başlandığı döngü sayısında ve daha önce ayarlanan gen/16S rRNA primer oranlarında multipleks PZR ile araştırılmıştır.

4.1. Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme

4.1.1. PZR Yöntemi ile Rv1410c ve Rv2333c Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme

Rv1410c ve Rv2333c genlerinin 34. ve 35. döngülerdeki PZR jel fotoğrafları Şekil 4.1' de verilmiştir.



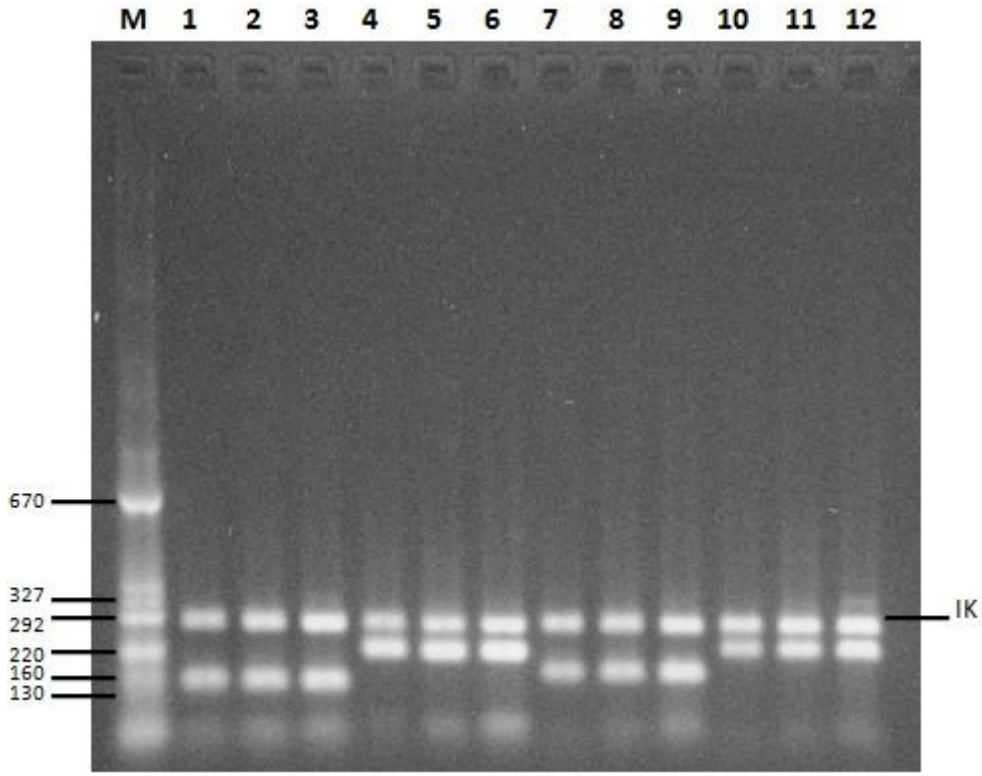
Şekil 4.1. Rv1410c ve Rv2333c genleri 34. ve 35. döngülerdeki PZR görüntüsü (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, 1: 16S rRNA ve Rv1410c 34 döngü, 2: 16S rRNA ve Rv1410c 35 döngü, 3: 16S rRNA ve Rv2333c 34 döngü, 4: 16S rRNA ve Rv2333c 35 döngü).

34 döngüdeki bant yoğunluklarından daha az yoğunlukta (dansitede) bantlar görmek istediğimiz için Rv1410c geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 33 olmasına, IK ve Rv1410c gen bant oranları eşit yoğunlukta olduklarından primer oranlarının aynı kalmasına karar verilmiştir.

Yine 34 döngüdeki bant yoğunluklarından daha az yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için Rv2333c geni ile yapılacak olan multipleks PZR döngü sayısının 32 olmasına, Rv2333c bandı IK bandına göre daha yoğun görüldüğünden, Rv2333c gen primerler miktarının da % 50 azaltılmasına karar verilmiştir.

4.1.2. PZR Yöntemi ile *drrA, drrB, iniA* ve *mmpL7* Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme

drrA, drrB, iniA ve *mmpL7* genlerinin 27., 30. ve 33. döngülerdeki PZR jel fotoğrafları Şekil 4.2' de verilmiştir.



Şekil 4.2. *drrA, drrB, iniA* ve *mmpL7* genleri 27., 30. ve 33. döngülerdeki PZR görüntüsü (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, 1: 16S rRNA ve *drrA* 27 döngü, 2: 16S rRNA ve *drrA* 30 döngü, 3: 16S rRNA ve *drrA* 33 döngü, 4: 16S rRNA ve *drrB* 27 döngü, 5: 16S rRNA ve *drrB* 30 döngü, 6: 16S rRNA ve *drrB* 33 döngü, 7: 16S rRNA ve *iniA* 27 döngü, 8: 16S rRNA ve *iniA* 30 döngü, 9: 16S rRNA ve *iniA* 33 döngü, 10: 16S rRNA ve *mmpL7* 27 döngü, 11: 16S rRNA ve *mmpL7* 30 döngü, 12: 16S rRNA ve *mmpL7* 33 döngü)

Sonuç olarak, 27 döngüdeki bant yoğunluklarından daha az yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için *drrA* geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 26 olmasına, IK ve *drrA* gen bant oranları eşit yoğunlukta olduklarından primer oranlarının aynı kalmasına karar verilmiştir.

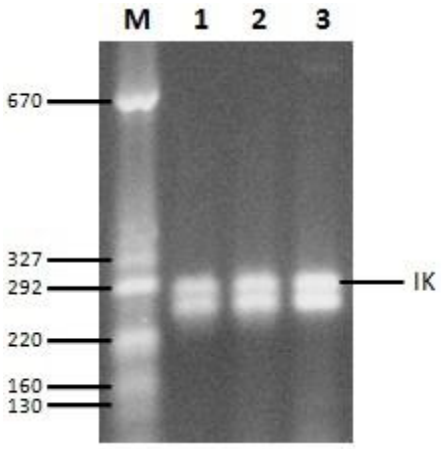
Yine 27 döngüdeki bant yoğunluklarından daha az yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için *drrB* geni ile yapılacak olan multipleks PZR döngü sayısının 26 olmasına, *drrB* bandı IK bandına göre daha yoğun görüldüğünden, *drrB* gen primerler miktarının da % 50 azaltılmasına karar verilmiştir.

27 döngüdeki bant yoğunluklarından daha az yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için *iniA* geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 26 olmasına, IK ve *iniA* gen bant oranları eşit yoğunlukta olduklarından primer oranlarının aynı kalmasına karar verilmiştir.

27 döngüdeki bant yoğunluklarından daha az yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için *mmpL7* geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 26 olmasına, IK ve *mmpL7* gen bant oranları eşit yoğunlukta olduklarından primer oranlarının aynı kalmasına karar verilmiştir.

4.1.3. PZR Yöntemi ile Rv1258c Geninin Logaritmik Artış Fazını Belirleme

Rv1258c geninin 26., 29. ve 33. döngülerdeki PZR jel fotoğrafı Şekil 4.3' te verilmiştir.

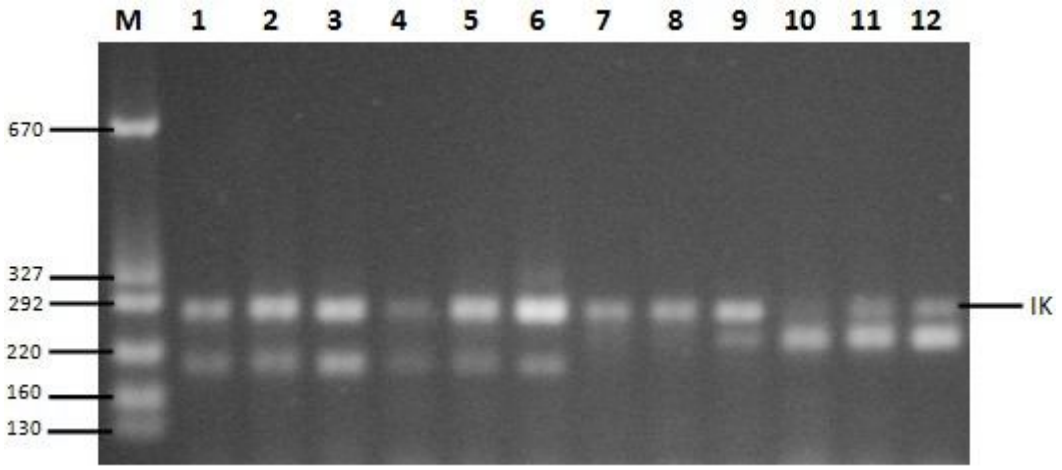


Şekil 4.3. Rv1258c geni 26., 29. ve 33. döngülerdeki PZR görüntüsü (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, 1: 16S rRNA ve Rv1258c 26 döngü, 2: 16S rRNA ve Rv1258c 29 döngü, 3: 16S rRNA ve Rv1258c 33 döngü).

Sonuç olarak, 26 döngüdeki bant yoğunluklarından daha az yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için Rv1258c geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 25 olmasına, IK ve Rv1258c gen bant oranları eşit yoğunlukta olduklarından primer oranlarının aynı kalmasına karar verilmiştir.

4.1.4. PZR Yöntemi ile Rv1273c, Rv1687c, Rv3000, *mmpL4*, Rv1250, Rv1634, Rv0783c ve Rv0037c Genlerinin Logaritmik Artış Fazlarını Belirleme

Rv1273c, Rv1687c, Rv3000, *mmpL4* genlerinin 29., 33. ve 37. döngülerdeki PZR jel fotoğrafları Şekil 4.4' te verilmiştir.



Şekil 4.4. Rv1273c, Rv1687c, Rv3000 ve *mmpL4* genlerinin 29, 33 ve 37. döngülerdeki PZR görüntüsü (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, 1: 16S rRNA ve Rv1273c 29 döngü, 2: 16S rRNA ve Rv1273c 33 döngü, 3: 16S rRNA ve Rv1273c 37 döngü, 4: 16S rRNA ve Rv1687c 29 döngü, 5: 16S rRNA ve Rv1687c 33 döngü, 6: 16S rRNA ve Rv1687c 37 döngü, 7: 16S rRNA ve Rv3000 29 döngü, 8: 16S rRNA ve Rv3000 33 döngü, 9: 16S rRNA ve Rv3000 37 döngü, 10: 16S rRNA ve *mmpL4* 29 döngü, 11: 16S rRNA ve *mmpL4* 33 döngü, 12: 16S rRNA ve *mmpL4* 37 döngü).

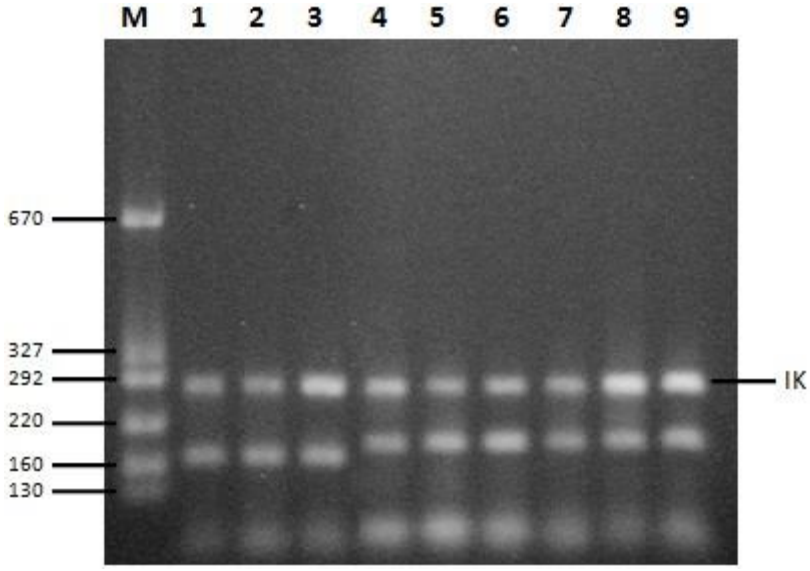
Sonuç olarak, 29 döngüdeki bant yoğunluğuna eşit yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için Rv1273c geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 29 olmasına, IK bandı Rv1273c bandına göre daha yoğun görüldüğünden, IK primer miktarının % 25 azaltılmasına karar verilmiştir.

29 döngüdeki bant yoğunluklarından daha yoğun bantlar görmek istediğimiz için Rv1687c geni ile yapılacak olan multipleks PZR döngü sayısının 30 olmasına, IK ve Rv1687c gen bant oranları eşit yoğunlukta olduklarından primer oranlarının aynı kalmasına karar verilmiştir.

37 döngüdeki bant yoğunluğuna eşit yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için Rv3000 geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 37 olmasına, IK bandı Rv1273c bandına göre daha yoğun görüldüğünden, IK primer miktarının % 50 azaltılmasına karar verilmiştir.

29 döngüdeki bant yoğunluğuna eşit yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için *mmpL4* geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 29 olmasına, *mmpL4* bandı IK bandına göre daha yoğun görüldüğünden, *mmpL4* primer miktarının %50 azaltılmasına, IK primer miktarının da % 50 artırılmasına karar verilmiştir.

Rv1250, Rv1634 *ve* Rv0783c genlerinin 29., 33. ve 37. döngülerdeki PZR jel fotoğrafları Şekil 4.5' te verilmiştir.



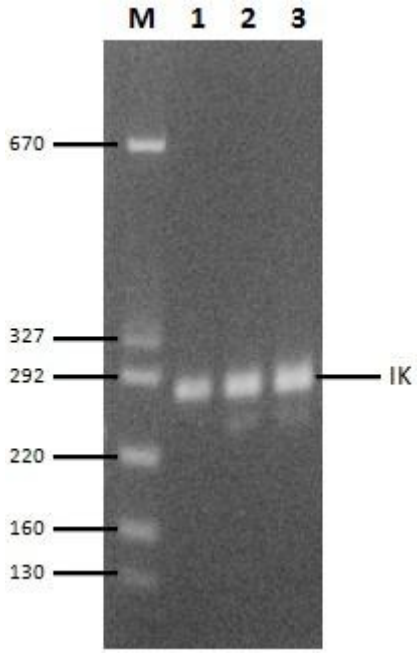
Şekil 4.5. Rv1250, Rv1634 ve Rv0783c genlerinin 29, 33 ve 37. döngülerdeki PZR görüntüsü (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, 1: 16S rRNA ve Rv1250 29 döngü, 2: 16S rRNA ve Rv1250 33 döngü, 3: 16S rRNA ve Rv1250 37 döngü, 4: 16S rRNA ve Rv1634 29 döngü, 5: 16S rRNA ve Rv1634 33 döngü, 6: 16S rRNA ve Rv1634 37 döngü, 7: 16S rRNA ve Rv0783c 29 döngü, 8: 16S rRNA ve Rv0783c 33 döngü, 9: 16S rRNA ve Rv0783c 37 döngü).

29 döngüdeki bant yoğunluklarından daha az yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için Rv1250 geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 28 olmasına, IK ve Rv1250 gen bant oranları eşit yoğunlukta olduklarından primer oranlarının aynı kalmasına karar verilmiştir.

29 döngüdeki bant yoğunluklarından daha az yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için Rv1634 geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 28 olmasına, IK ve Rv1634 gen bant oranları eşit yoğunlukta olduklarından primer oranlarının aynı kalmasına karar verilmiştir.

29 döngüdeki bant yoğunluğuna eşit yoğunlukta bantlar görmek istediğimiz için Rv0783c geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 29 olmasına, IK bandı Rv0783c bandına göre daha yoğun görüldüğünden, IK primer miktarının % 50 azaltılmasına karar verilmiştir.

Rv0037c geninin 29., 33. ve 37. döngülerdeki PZR jel fotoğrafları Şekil 4.6' da verilmiştir.



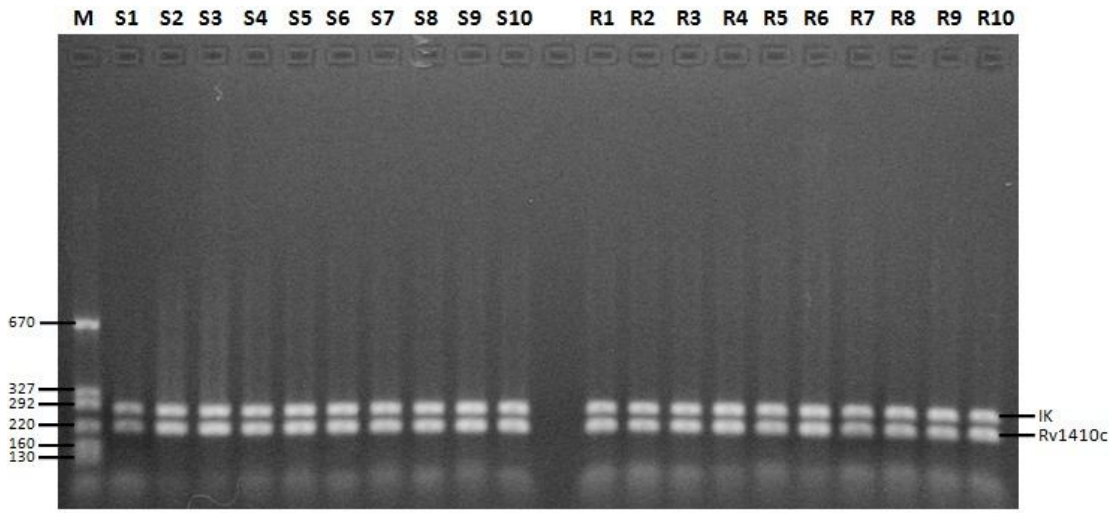
Şekil 4.6. Rv0037c geninin 29, 33 ve 37. döngülerdeki PZR görüntüsü (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, 1: 16S rRNA ve Rv0037c 29 döngü, 2: 16S rRNA ve Rv0037c 33 döngü, 3: 16S rRNA ve Rv0037c 37 döngü).

Sonuç olarak, 33 döngüdeki bant yoğunluğundan daha yoğun bantlar görmek istediğimiz için Rv0037c geni ile yapılacak olan multipleks PZR' de döngü sayısının 34 olmasına, IK bandı Rv0037c bandına göre daha yoğun görüldüğünden, IK primer miktarının % 25 azaltılmasına karar verilmiştir.

4.2. Multipleks PZR Çalışmaları

4.2.1. Rv1410c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

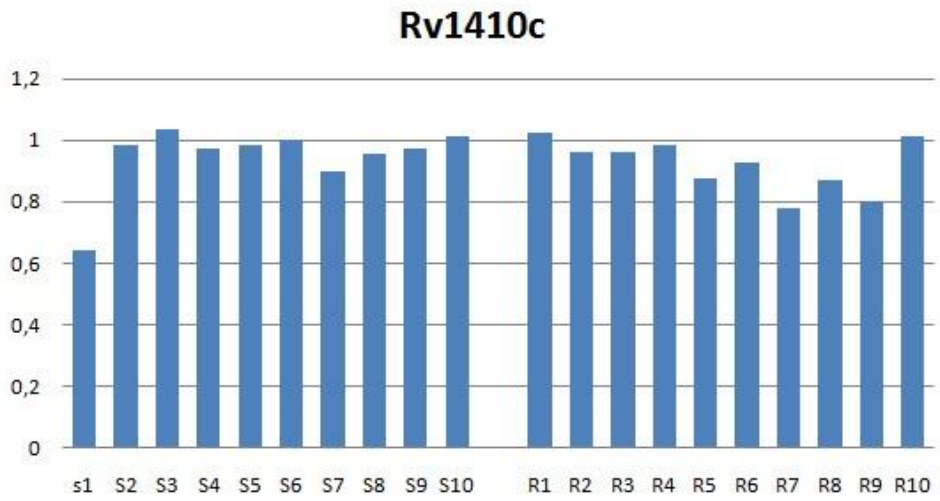
33 döngüde, Rv1410c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış ve PZR jel fotoğrafı Şekil 4.7' de verilmiştir.



Şekil 4.7. Rv1410c geni 33 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 1/1)

Tablo 4.1' de imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1410c gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

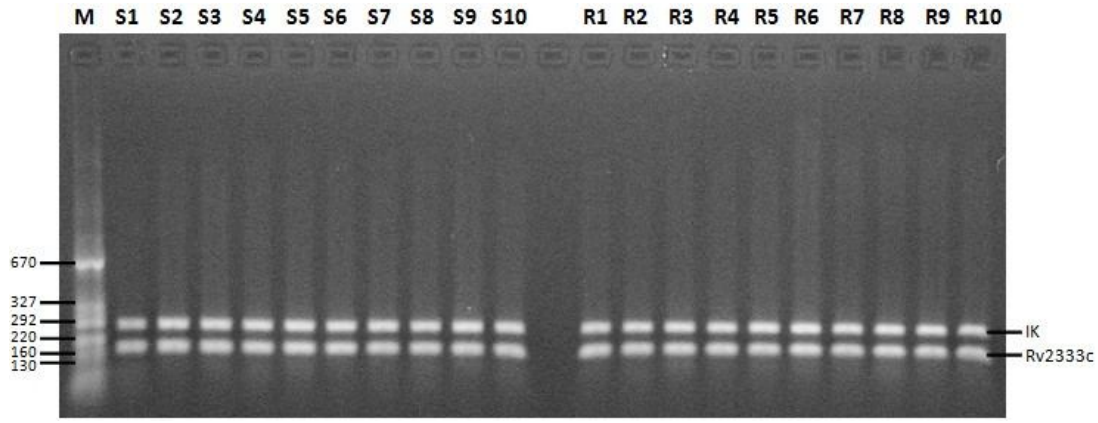
Tablo 4.1. Rv1410c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M. tuberculosis* suşlarındaki Rv1410c geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.2. Rv2333c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

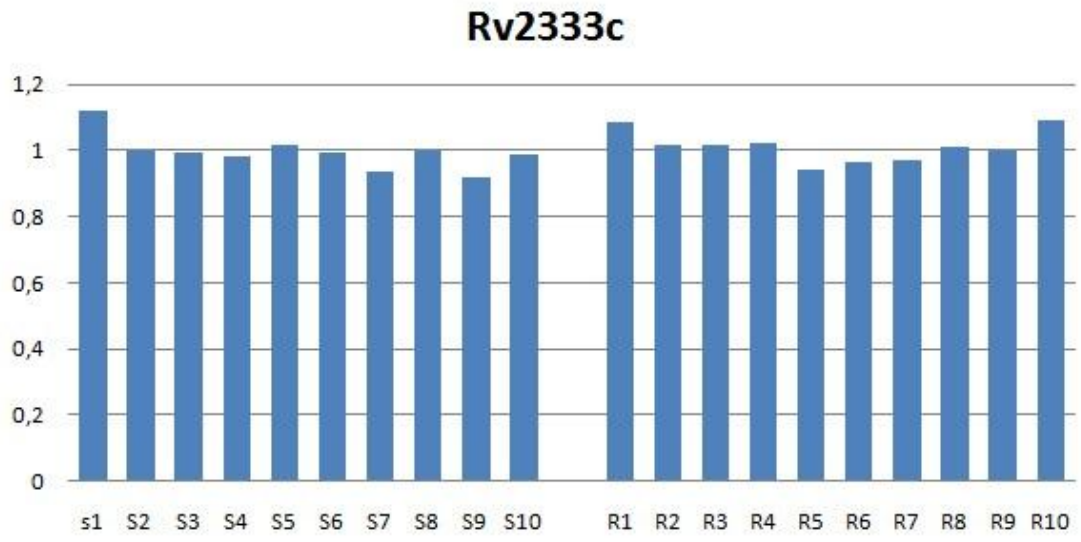
32 döngüde, Rv2333c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.8' de verilmiştir.



Şekil 4.8. Rv2333c geni 32 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 1/0,5)

Tablo 4.2' de imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv2333c gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

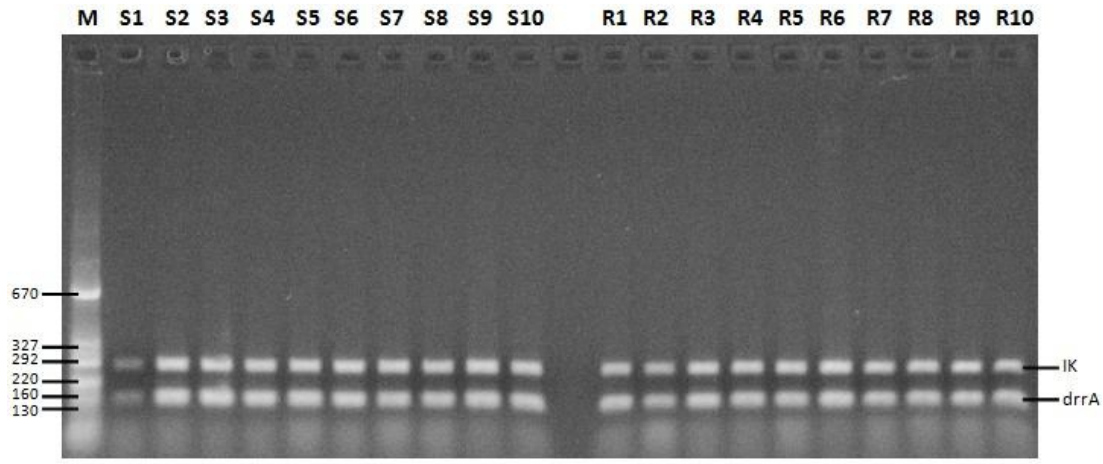
Tablo 4.2. Rv2333c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M. tuberculosis* suşlarındaki Rv2333c geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.3. *drrA* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

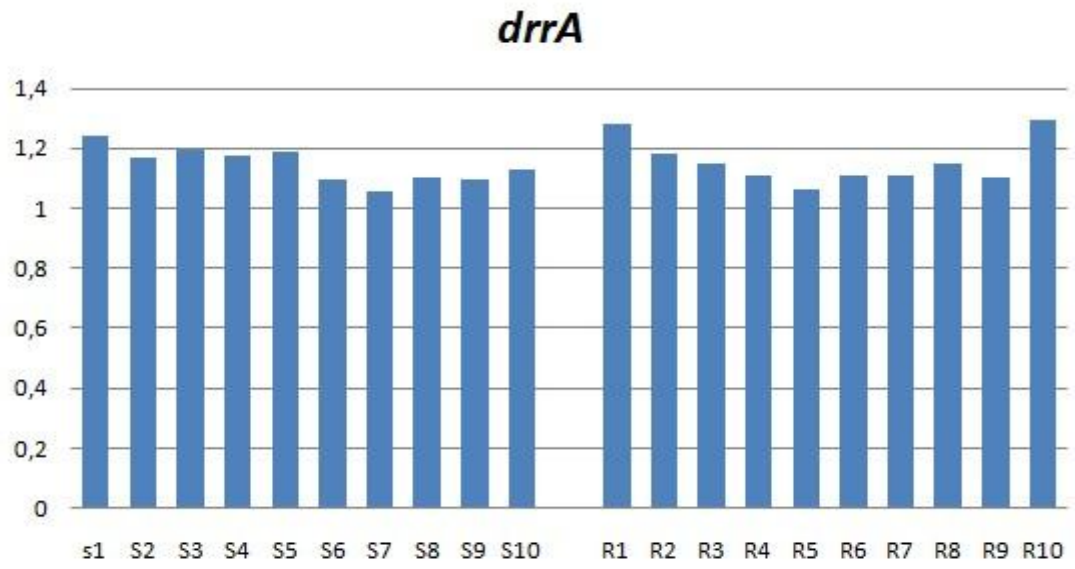
26 döngüde, *drrA* geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.9' da verilmiştir.



Şekil 4.9. *drrA* geni 26 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 1/1)

Tablo 4.3' te imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki *drrA* gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

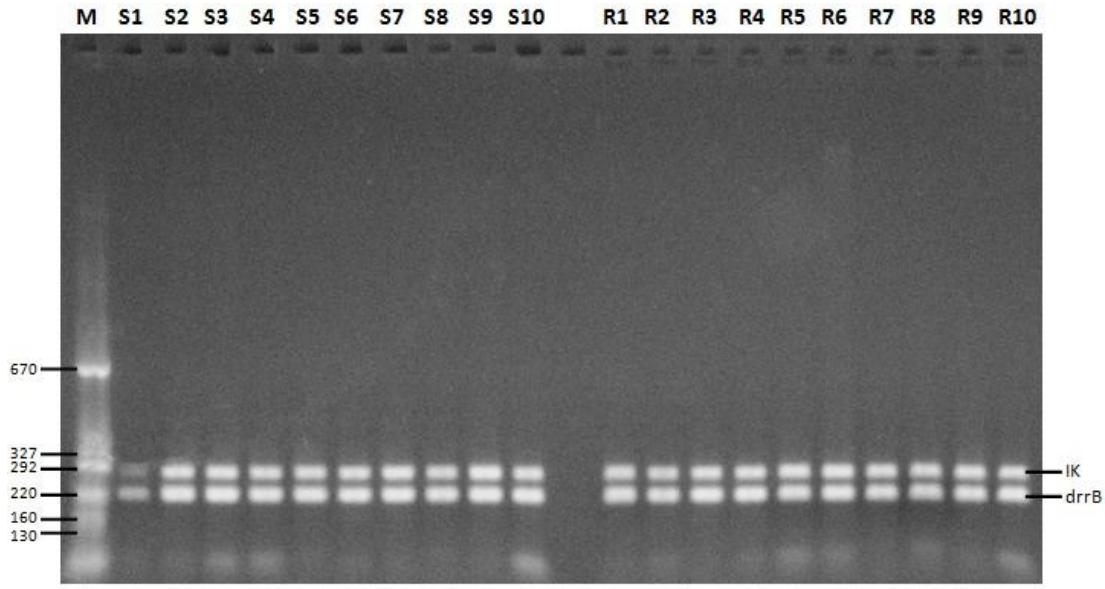
Tablo 4.3. *drrA* geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M. tuberculosis* suşlarındaki *drrA* geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.4. *drrB* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

26 döngüde, *drrB* geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.10' da verilmiştir.



Şekil 4.10. *drrB* geni 26 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 1/0,5)

Tablo 4.4' te imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki *drrB* gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

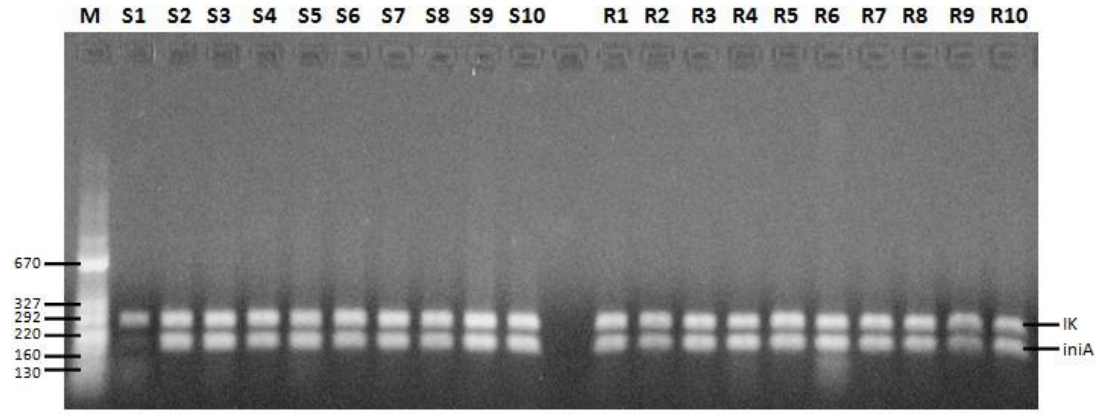
Tablo 4.4. *drrB* geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki *drrB* geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.5. *iniA* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

26 döngüde, *iniA* geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.11' de verilmiştir.



Şekil 4.11. *iniA* geni 26 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 1/1)

Tablo 4.5' te imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki *iniA* gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

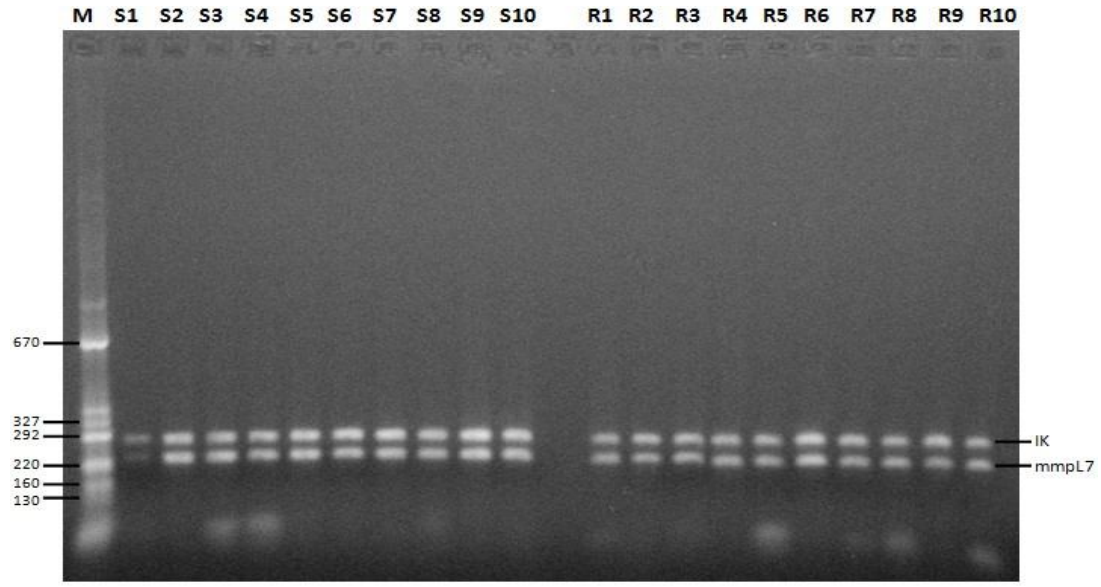
Tablo 4.5. *iniA* geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki *iniA* geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.6. *mmpL7* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

26 döngüde, *mmpL7* geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.12' de verilmiştir.



Şekil 4.12. *mmpL7* geni 26 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 1/1)

Tablo 4.6' da imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki *mmpL7* gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

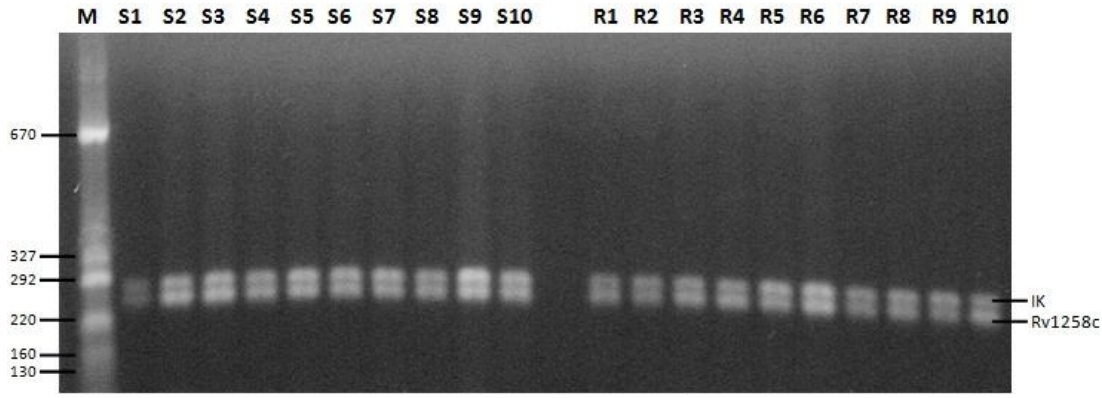
Tablo 4.6. *mmpL7* geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki *mmpL7* geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.7. Rv1258c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

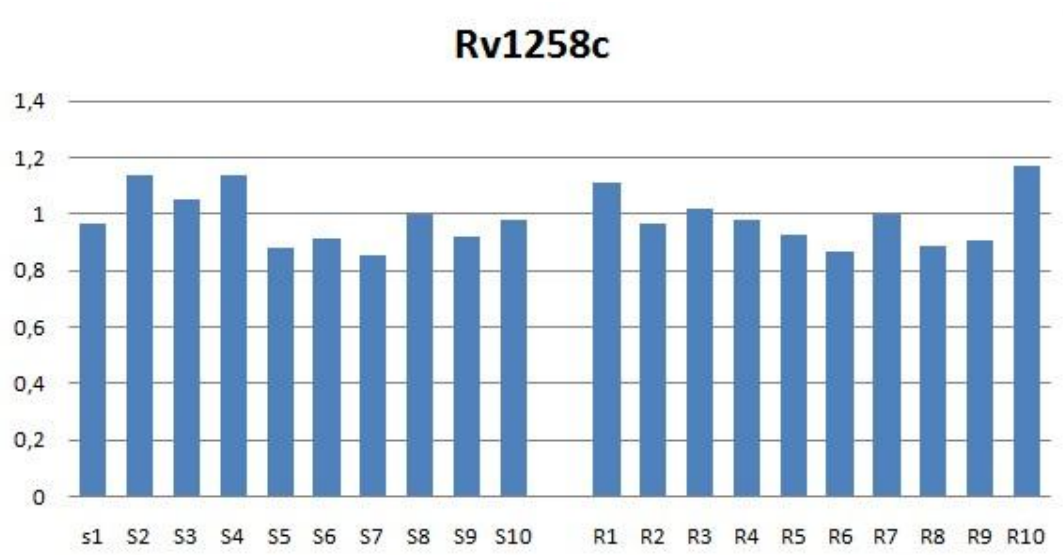
25 döngüde, Rv1258c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.13' te verilmiştir.



Şekil 4.13. Rv1258c geni 25 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 1/1)

Tablo 4.7' de imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1258c gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

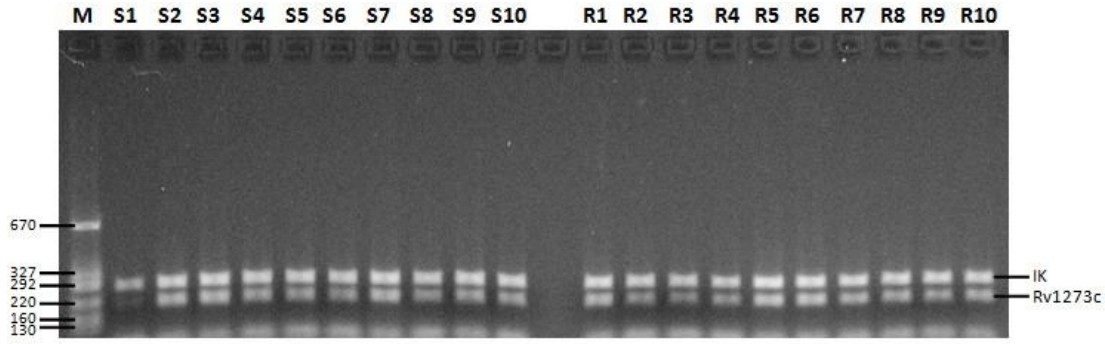
Tablo 4.7. Rv1258c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki Rv1258c geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.8. Rv1273c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

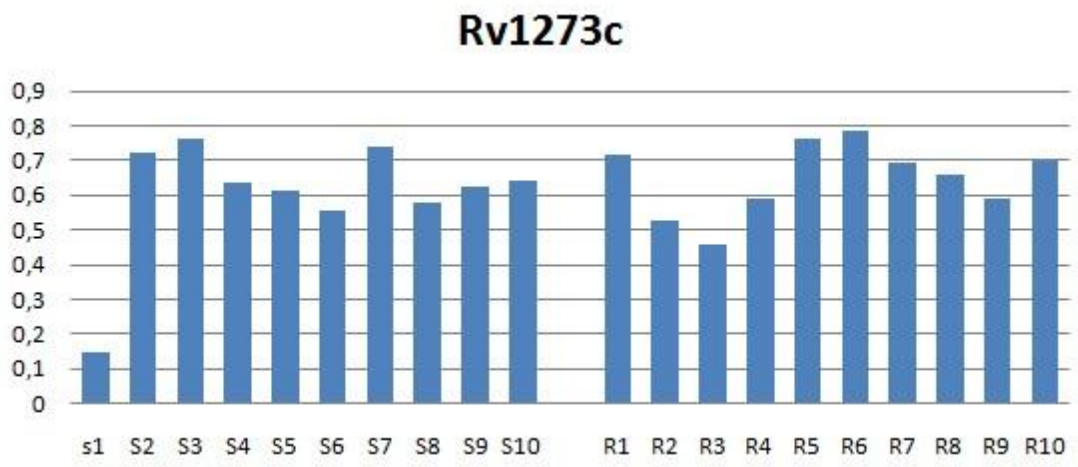
29 döngüde, Rv1273c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.14' te verilmiştir.



Şekil 4.14. Rv1273c geni 29 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 0,75/1)

Tablo 4.8' de imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1273c gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

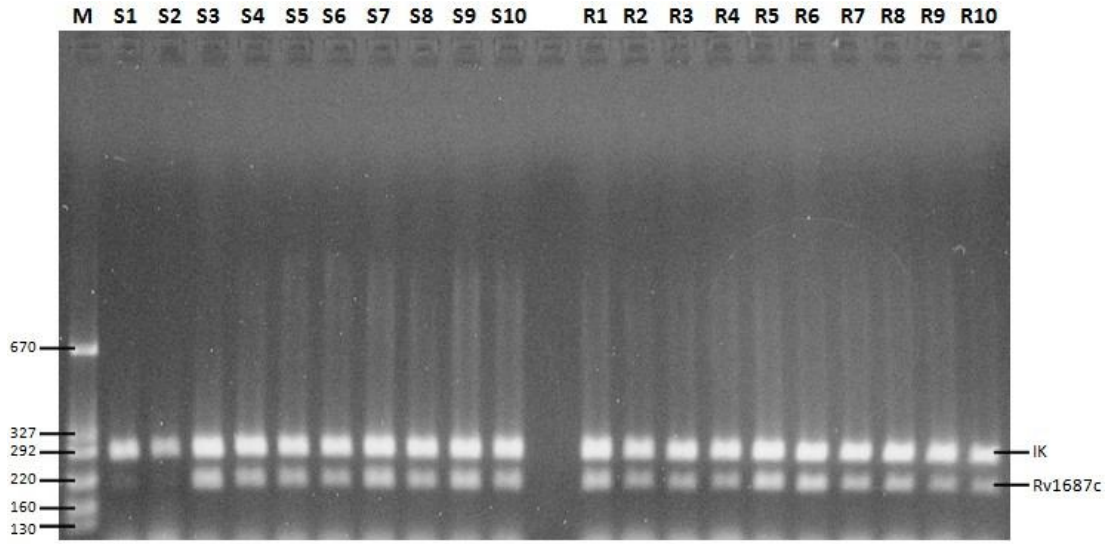
Tablo 4.8. Rv1273c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki Rv1273c geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.9. Rv1687c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

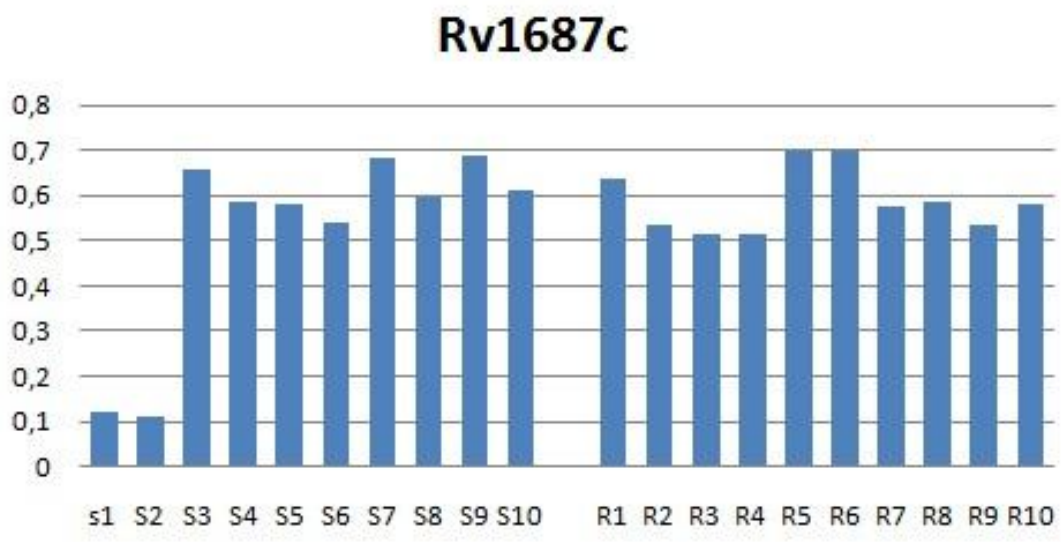
30 döngüde, Rv1687c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.15' te verilmiştir.



Şekil 4.15. Rv1687c geni 30 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 1/1)

Tablo 4.9' da imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1687c gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

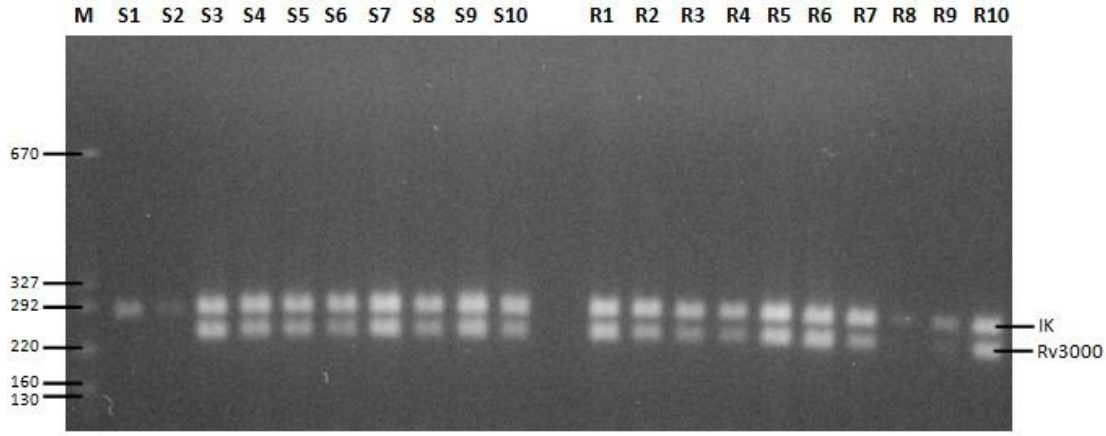
Tablo 4.9. Rv1687c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki Rv1687c geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.10. Rv3000 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

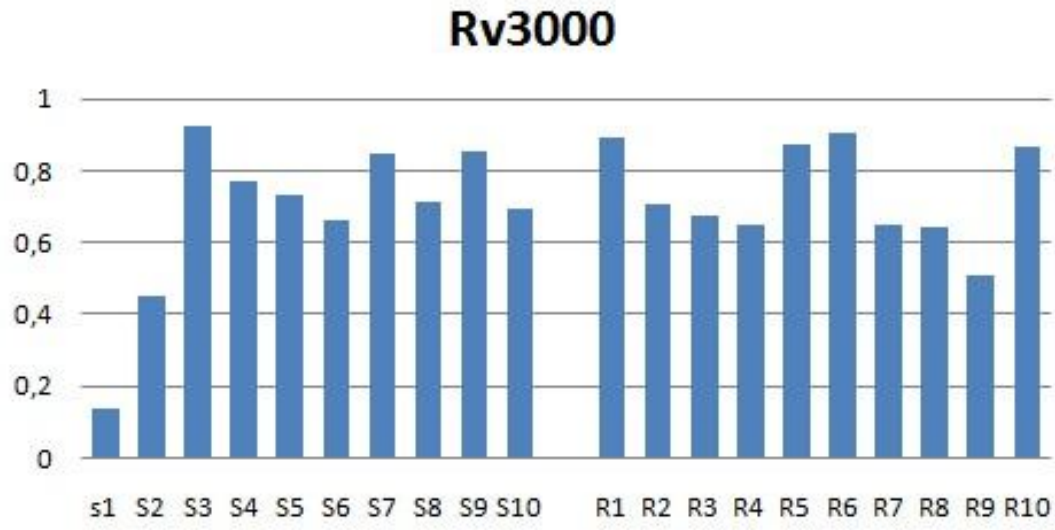
37 döngüde, Rv3000 geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.16' da verilmiştir.



Şekil 4.16. Rv3000 geni 37 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 0,5/1)

Tablo 4.10' da imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv3000 gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

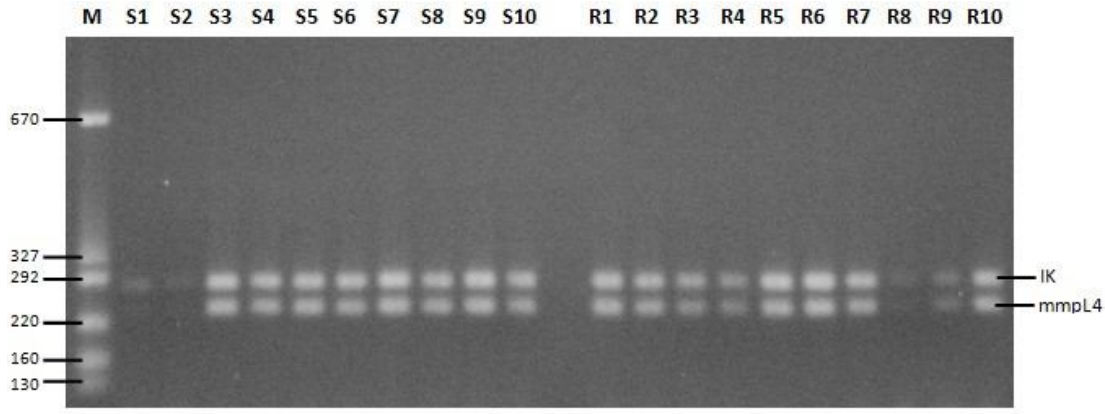
Tablo 4.10. Rv3000 geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki Rv3000 geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.11. *mmpL4* Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

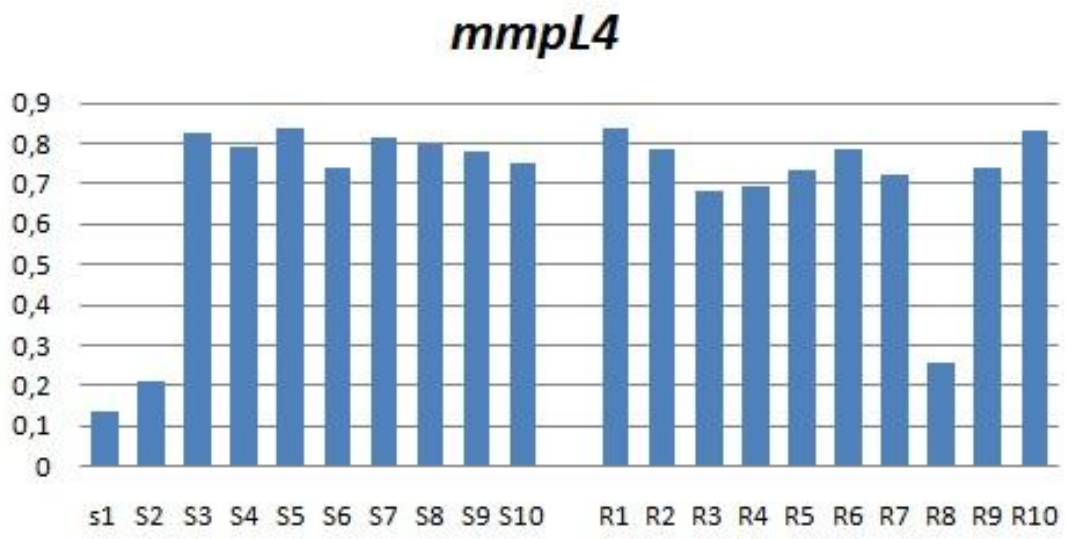
29 döngüde, *mmpL4* geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.17' de verilmiştir.



Şekil 4.17. *mmpL4* geni 29 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 1,5/0,5)

Tablo 4.11' de imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki *mmpL4* gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

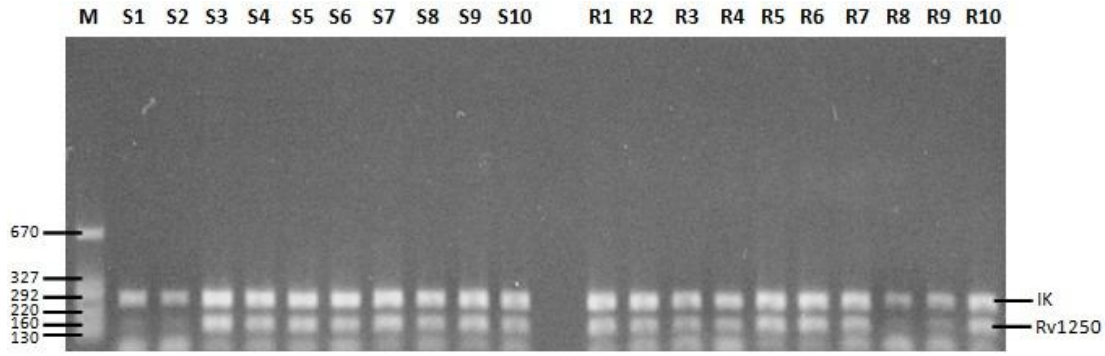
Tablo 4.11. *mmpL4* geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki *mmpL4* geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.12. Rv1250 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

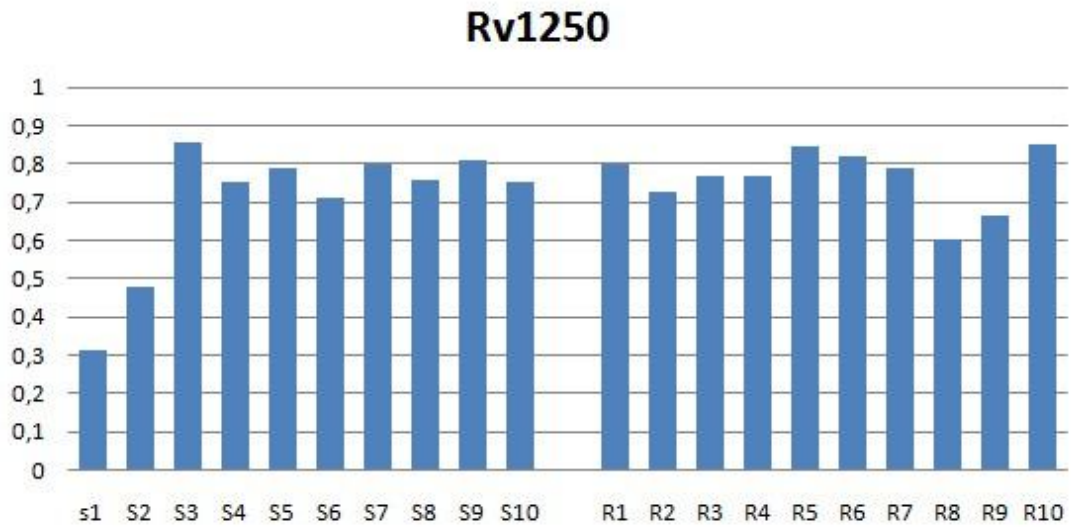
28 döngüde, Rv1250 geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.18' de verilmiştir.



Şekil 4.18. Rv1250 geni 28 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 1/1)

Tablo 4.12' de imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1250 gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

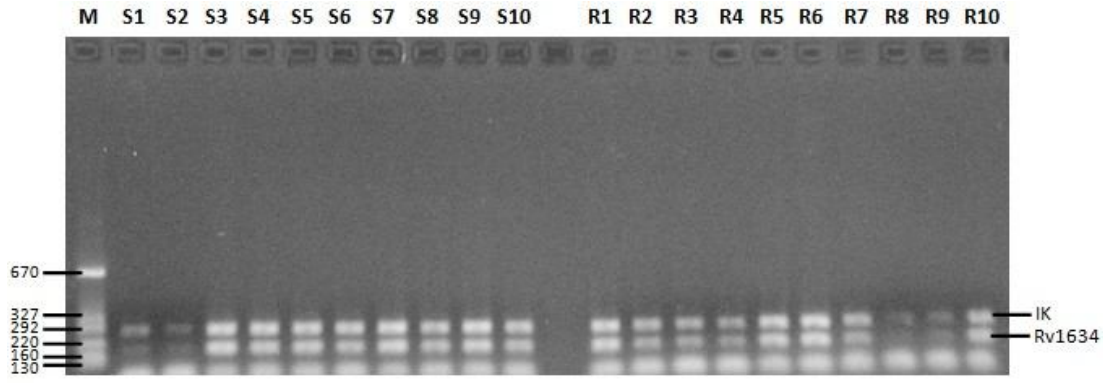
Tablo 4.12. Rv1250 geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki Rv1250 geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.13. Rv1634 Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

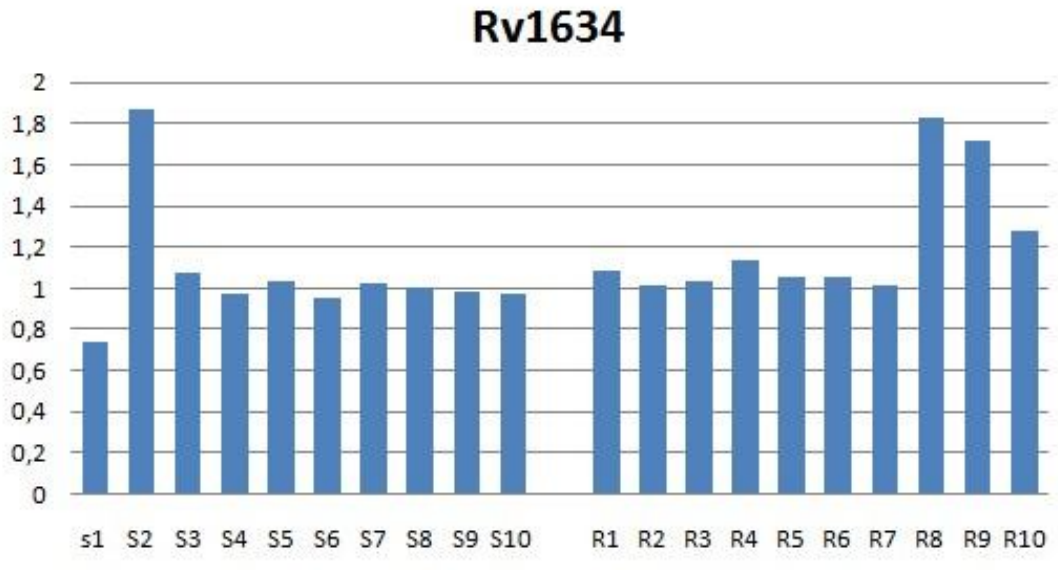
28 döngüde, Rv1634 geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.19' da verilmiştir.



Şekil 4.19. Rv1634 geni 28 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 1/1)

Tablo 4.13' te imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv1634 gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

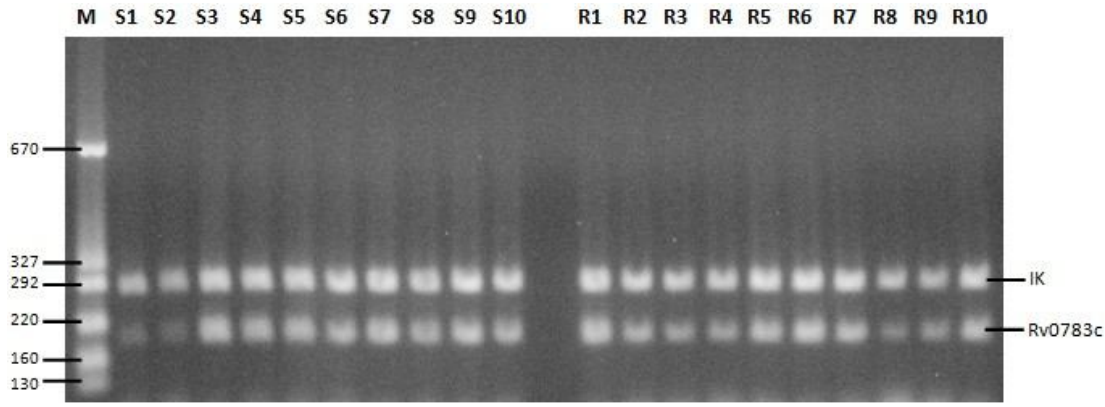
Tablo 4.13. Rv1634 geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki Rv1634 geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.14. Rv0783c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

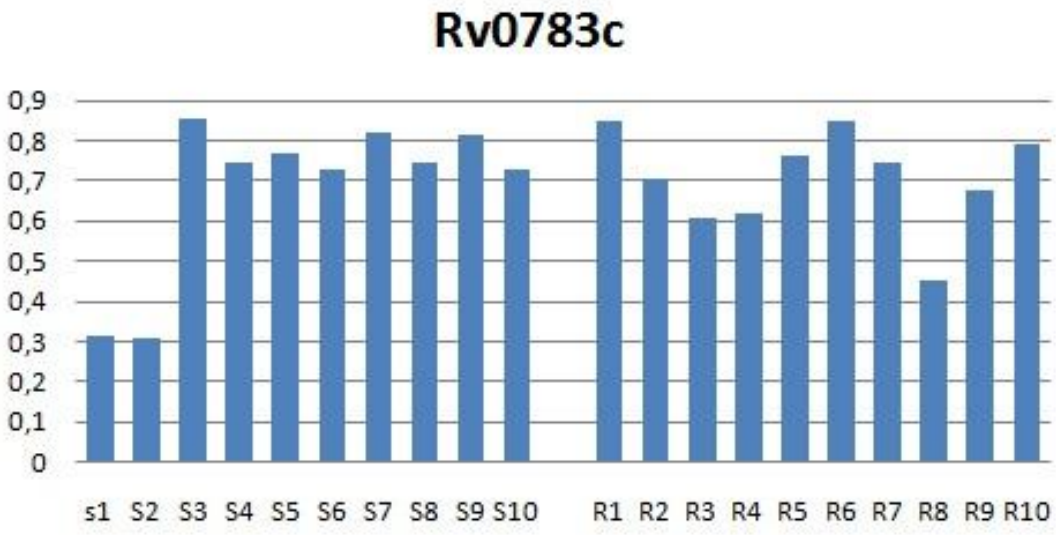
29 döngüde, Rv0783c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.20' de verilmiştir.



Şekil 4.20. Rv0783c geni 29 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 0,5/1)

Tablo 4.14' te imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv0783c gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

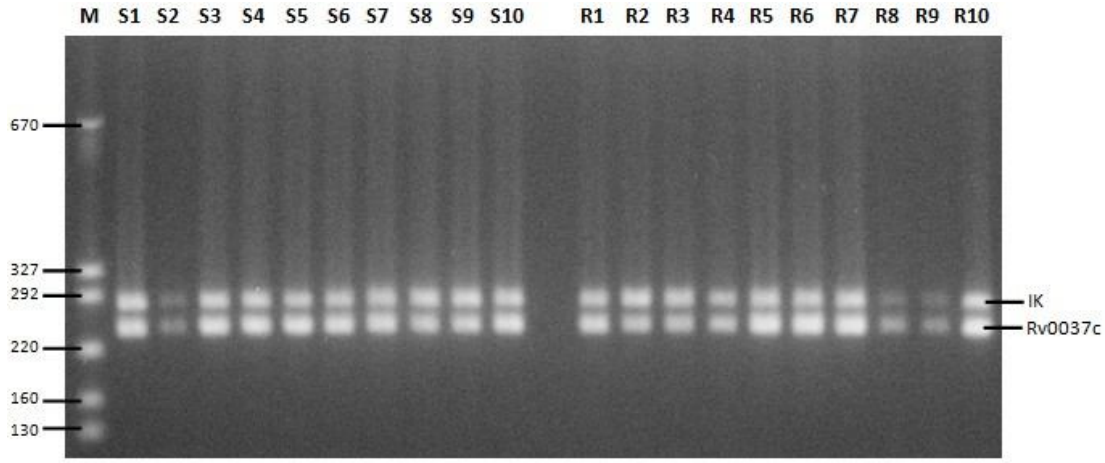
Tablo 4.14. Rv0783c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).



Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki Rv0783c geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.2.15. Rv0037c Geninin Multipleks PZR ile Amplifikasyonu

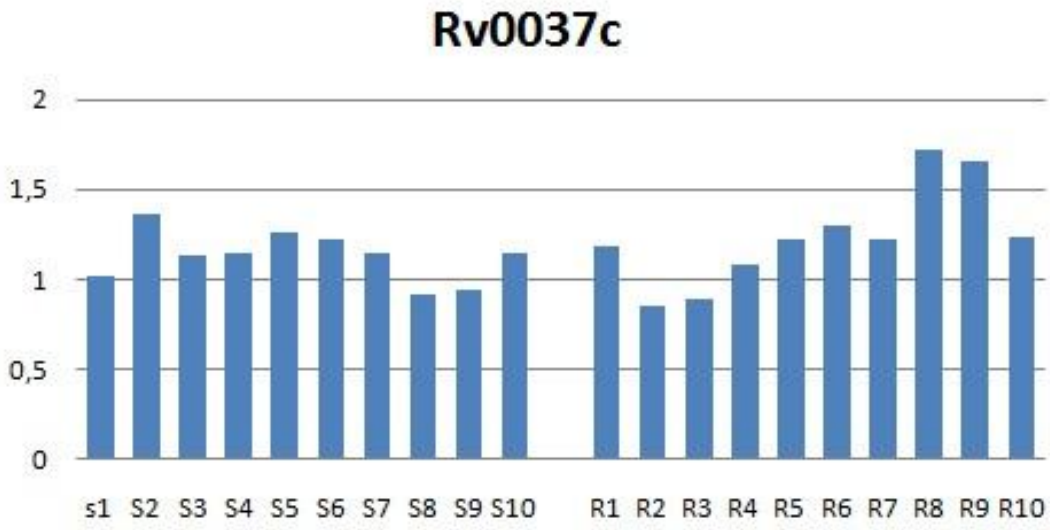
34 döngüde, Rv0037c geninin 16S rRNA ile karşılaştırmalı multipleks PZR' si yapılmış olup PZR jel fotoğrafı Şekil 4.21' de verilmiştir.



Şekil 4.21. Rv0037c geni 34 döngü PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları) (IK/Gen primer oranı: 0,75/1)

Tablo 4.15' te imageJ programıyla ölçülerek Microsoft Excel programına aktarılan duyarlı ve dirençli suşlardaki Rv0037c gen bantlarının yoğunluk değerleri ile o suştaki internal kontrol bant yoğunluğunun oranlanması ile ortaya çıkan tablo görülmektedir.

Tablo 4.15. Rv0037c geni, gen/IK ekspresyon oranları tablosu (S1-S10 Duyarlı *M.tuberculosis* suşları, R1-R10 MDR *M.tuberculosis* suşları).

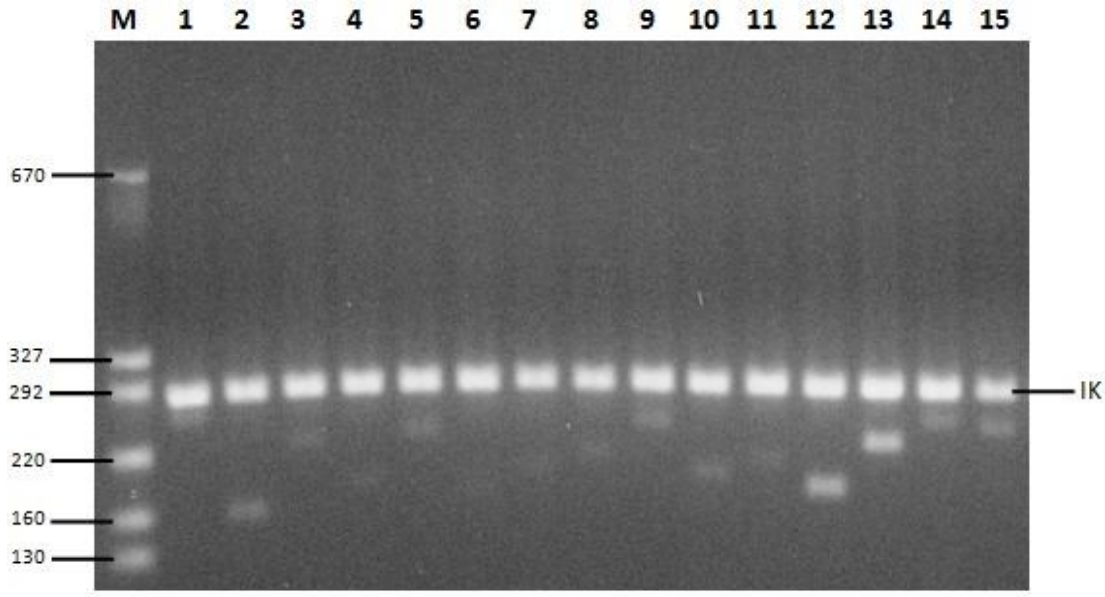


Bu sonuçlara göre, çoklu ilaç dirençli *M.tuberculosis* suşlarındaki Rv0037c geni ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara göre genel bir artma veya azalma görülmemiştir.

4.3. *M. tuberculosis* Standart Suşlarında Multipleks PZR ile Genlerin Amplifikasyonu

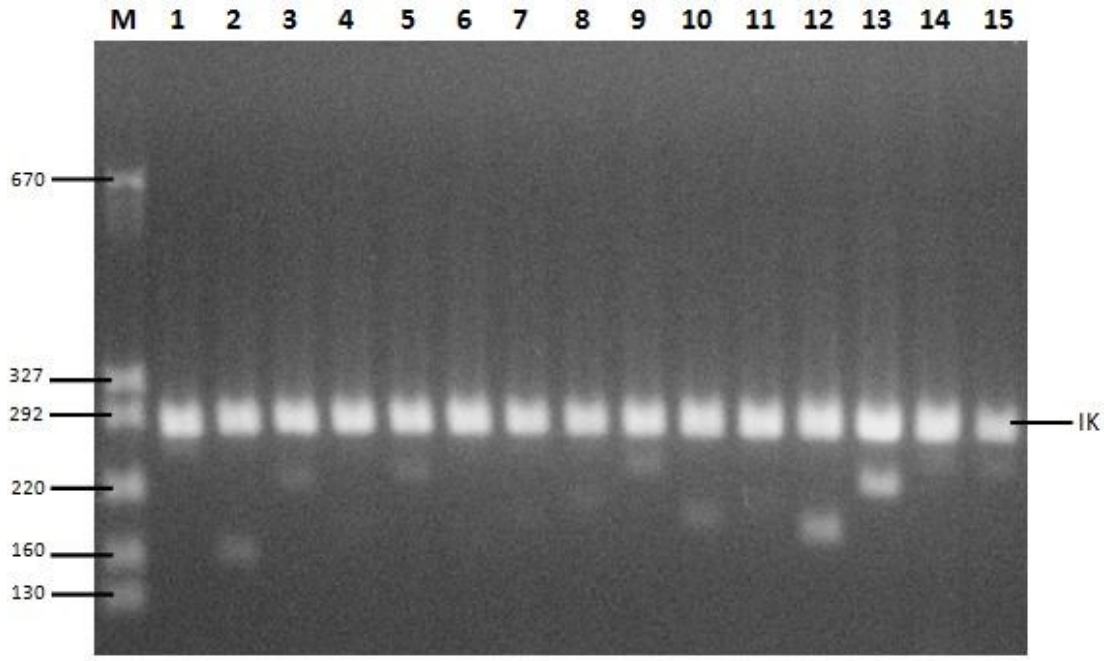
Çalışılan genlerin ekspresyon miktarları ayrıca *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *M.tuberculosis* H37Ra ATCC, *M. tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşlarında, genlerin logaritmik artış fazında olduğu döngülerde ve ayarlanan gen/internal kontrol primer oranlarında multipleks PZR yapılarak araştırılmıştır.

Şekil 4.22’ de tüm genlerin *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618 suşundaki PZR fotoğrafı görülmektedir.



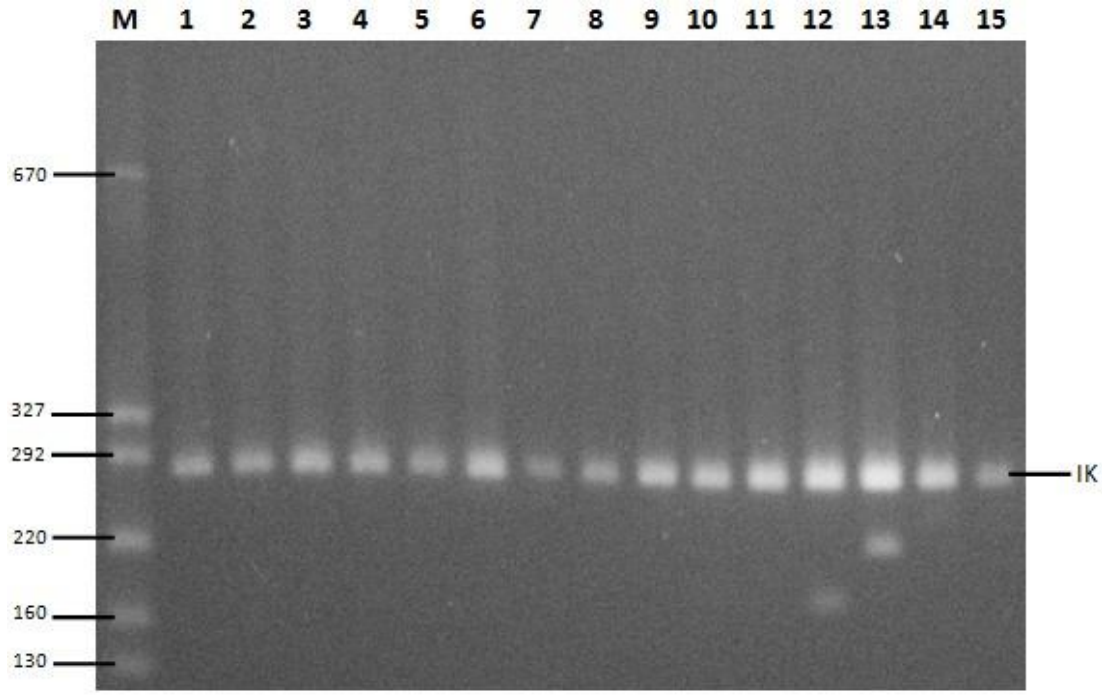
Şekil 4.22. Tüm genlerin *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618 suşundaki PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, **1**: 16S rRNA ve **Rv1258c** 25 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **2**: 16S rRNA ve ***drrA*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **3**: 16S rRNA ve ***drrB*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/0,5), **4**: 16S rRNA ve ***iniA*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **5**: 16S rRNA ve ***mmpL7*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **6**: 16S rRNA ve **Rv1250** 28 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **7**: 16S rRNA ve **Rv1634** 28 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **8**: 16S rRNA ve **Rv1273c** 29 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,75/1), **9**: 16S rRNA ve ***mmpL4*** 29 döngü (IK/Gen primer oranı: 1,5/0,5), **10**: 16S rRNA ve **Rv0783c** 29 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,5/1), **11**: 16S rRNA ve **Rv1687c** 30 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **12**: 16S rRNA ve **Rv2333c** 32 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/0,5), **13**: 16S rRNA ve **Rv1410c** 33 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **14**: 16S rRNA ve **Rv0037c** 34 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,75/1), **15**: 16S rRNA ve **Rv3000** 37 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,5/1))

Şekil 4.23’ te tüm genlerin *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 suşundaki PZR fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 4.23. Tüm genlerin *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 suşundaki PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, **1**: 16S rRNA ve **Rv1258c** 25 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **2**: 16S rRNA ve ***drrA*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **3**: 16S rRNA ve ***drrB*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/0,5), **4**: 16S rRNA ve ***iniA*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **5**: 16S rRNA ve ***mmpL7*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **6**: 16S rRNA ve **Rv1250** 28 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **7**: 16S rRNA ve **Rv1634** 28 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **8**: 16S rRNA ve **Rv1273c** 29 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,75/1), **9**: 16S rRNA ve ***mmpL4*** 29 döngü (IK/Gen primer oranı: 1,5/0,5), **10**: 16S rRNA ve **Rv0783c** 29 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,5/1), **11**: 16S rRNA ve **Rv1687c** 30 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **12**: 16S rRNA ve **Rv2333c** 32 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/0,5), **13**: 16S rRNA ve **Rv1410c** 33 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **14**: 16S rRNA ve **Rv0037c** 34 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,75/1), **15**: 16S rRNA ve **Rv3000** 37 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,5/1))

Şekil 4.24' te tüm genlerin *M. tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşundaki PZR fotoğrafı görülmektedir.



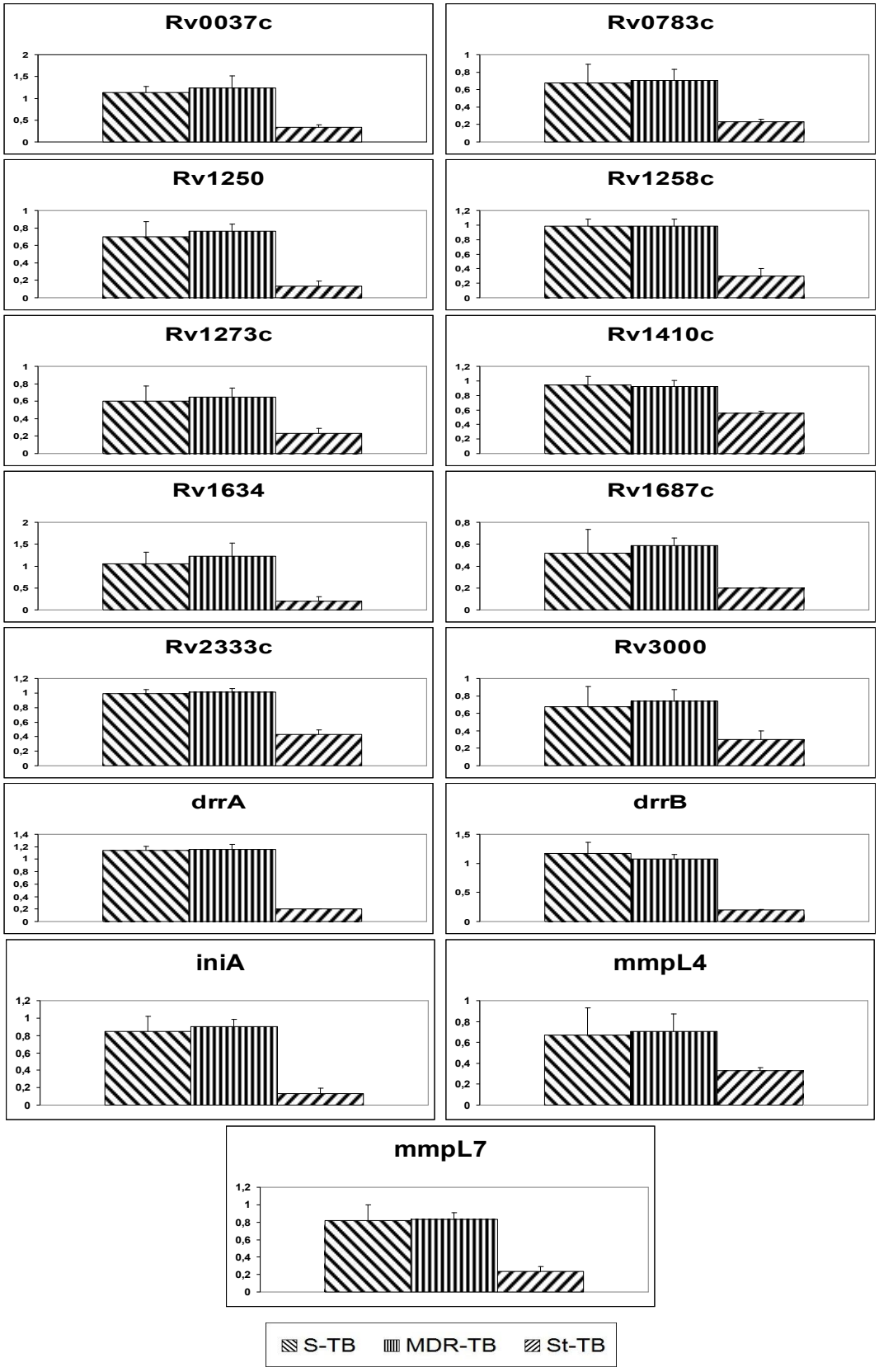
Şekil 4.24. Tüm genlerin *M. tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşundaki PZR fotoğrafı. (M: Moleküler büyüklük belirteci, IK: İnternal kontrol, **1**: 16S rRNA ve **Rv1258c** 25 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **2**: 16S rRNA ve ***drrA*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **3**: 16S rRNA ve ***drrB*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/0,5), **4**: 16S rRNA ve ***iniA*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **5**: 16S rRNA ve ***mmpL7*** 26 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **6**: 16S rRNA ve **Rv1250** 28 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **7**: 16S rRNA ve **Rv1634** 28 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **8**: 16S rRNA ve **Rv1273c** 29 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,75/1), **9**: 16S rRNA ve ***mmpL4*** 29 döngü (IK/Gen primer oranı: 1,5/0,5), **10**: 16S rRNA ve **Rv0783c** 29 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,5/1), **11**: 16S rRNA ve **Rv1687c** 30 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **12**: 16S rRNA ve **Rv2333c** 32 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/0,5), **13**: 16S rRNA ve **Rv1410c** 33 döngü (IK/Gen primer oranı: 1/1), **14**: 16S rRNA ve **Rv0037c** 34 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,75/1), **15**: 16S rRNA ve **Rv3000** 37 döngü (IK/Gen primer oranı: 0,5/1))

4.4. Duyarlı, Çoklu Dirençli ve Standart Suş Gruplarında Genlerin Rölatif Ekspresyon Profilleri

Multipleks PZR sonuçları, standart suş grubu ile karşılaştırıldığında klinikten elde edilmiş olan duyarlı ve çoklu dirençli *M. tuberculosis* suş gruplarında test edilen 15 gen için yüksek mRNA seviyeleri bulunduğunu göstermektedir. Student' s T-testi (two-tailed t-test) kullanılarak yapılan istatistiksel analizler sonucunda değerlendirilen genler arasındaki p değerleri 0,009 - 0,00009 arasında bulunmuştur.

Tablo 4.16' da duyarlı, çoklu ilaç dirençli ve standart *M. tuberculosis* suş gruplarında Rv0037c, Rv0783c, Rv1250, Rv1258c, Rv1273c, Rv1410c, Rv1634, Rv1687c, Rv2333c, Rv3000, *drrA, drrB, iniA, mmpL4* ve *mmpL7* genlerinin rölatif ekspresyon profilleri görülmektedir.

Tablo 4.16. Tüm genlerin rölatif ekspresyon profilleri (S-TB: Duyarlı *M. tuberculosis* suşları, MDR-TB: Çoklu dirençli suşlar, St-TB: Standart suşlar).



5. TARTIŞMA

Antimikrobiyal ilacın enzimatik yolla hidrolizi ya da modifikasyonu ve ilacın hedefi olan molekülde mutasyon sonucu ortaya çıkan değişim, en çok çalışılan ve en iyi bilinen antibiyotik direnç mekanizmalarıdır. Bunlardan bir kısmı, intrinsik olarak bakterinin doğal direncine (Gram negatif bakterilerin penisiline doğal direncinde rol oynayan beta-laktamazlar) katkıda bulunurken; önemli bir bölümü, mutasyon sonucu ya da direnç determinantlarının ekzojen yolla kazanılması sonucu ortaya çıkmakta ve bugün klinikte sorun oluşturan antimikrobiyal direnç oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Bu mekanizmalar, genellikle yapısal olarak benzerlik gösteren antimikrobiyal ilaçlara karşı etkin olup, substrat profilleri bu nedenle sınırlıdır. Aminoglikozid modifikasyon enzimlerinin, aminoglikozid antibiyotiklere; penisilin bağlayan proteinlerde ortaya çıkan bir mutasyonun, beta - laktam grubu antibiyotiklere; DNA giraz' da ortaya çıkan bir mutasyonun ise sadece kinolon grubu antibiyotiklere dirence yol açması, bu özgül direnç mekanizmalarının tipik örnekleridir. Son 15 - 20 yıldan bu yana yapılan çalışmalar, bakterilerin doğal ve kazanılmış çoklu ilaç direncinde etkin bir başka mekanizmanın varlığını ortaya koymaktadır. İlk kez 1976' da, memeli hücre membranında yer alan P-glikoproteininin kanser ilaçlarına, daha sonra bakteri hücre membranında yer alan Tet pompa proteininin tetrasiklin direncine yol açtığının gösterilmesini takiben yapılan çalışmalar, çoklu ilaç direncine yol açan aktif pompa genlerinin bakterilerde ve diğer birçok patojen mikroorganizmada *(Candida albicans, Plasmodium falciparum)* yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir. Son 10 yıldır yapılan çalışmalar, sitoplazmik membranda yerleşim gösteren aktif pompa proteinlerinin doğal dirençte önemli olduğunu göstermektedir. Eflüks pompa mekanizmaları ile ilaç direnci gelişimi, pompanın kendi sentezini artırması veya önceden var olan pompanın aktivasyonu sonucu meydana gelmektedir. Yapısal (konstitütif) düzeyde sentezlendiklerinde bakterinin doğal direncine etkin katkıda bulunan bu proteinlerin, yüksek düzeyde sentezi ise farklı sınıftan antimikrobiyal ilaçların, dezenfektanların, boyaların da içinde bulunduğu çok sayıda bileşiğe karşı tek bir adımda yüksek düzey çoklu ilaç direncinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Nikaido, 1998; 2001; Viveiros, 2002; Poole, 2000; 2004; Li, 2004; Hasdemir, 2007).

Bakterilerde aktif pompa sistemlerini yöneten proteinler besinlerin ve iyonların hücreye alınmasını, metabolik son ürünlerin ve zararlı maddelerin hücre dışına atılmasını, bakterilerin birbirleri ve çevreleriyle olan ilişkilerini düzenleyen çok sayıda proteini içine alan büyük bir protein ailesinin üyeleridir. Sitoplazmik membranda yerleşim gösteren bu proteinlerin aralarında belirgin homoloji mevcuttur. Biyoenerjetik ve yapısal kriterlere göre çoklu ilaç taşıyıcılar, ATP binding cassette (ABC) ve İkincil Çoklu ilaç Taşıyıcılar olmak üzere 2 büyük sınıfa ayrılırlar. İkincil Çoklu ilaç Taşıyıcılar da kendi içerisinde 4 gruba ayrılır. Bunlar Major facilitator (MFS), Small multidrug resistance (SMR), Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) ve Resistance-nodulation-cell division (RND) aileleridir. ABC ailesi üyesi pompalar, ilaçları hücre dışına pompalamak için ATP hidrolizi ile açığa çıkan serbest enerjiyi kullanırlar. İkincil çoklu ilaç taşıyıcılar ise, ilaçların hücre dışına çıkarılması için proton veya sodyum iyonlarının transmembran elektrokimyasal gradientini kullanırlar (Nikaido, 1998; 2001; Li, 2004).

Tüberkülozla ilişkili yüksek mortalite ve morbidite, dünya çapında halk sağlığını ilgilendiren bir sorundur. Çok etkili bir aşısı bulunmadığından, kemoterapi tüberkülozun kontrolünde önemli bir araçtır. Son yıllarda tüberküloz vakalarında, özellikle de MDR ve XDR tüberkülozda önemli bir artış görülmektedir (WHO, 2010b). MDR - TB, izoniazid ve rifampisine dirençli TB' dir. XDR - TB, izoniazid, rifampisine direnç ve bir kinolona direnç ve de parenteral kullanılan ilaçlardan (kanamisin, kapreomisin, amikasin) birisine direnç olması olarak tanımlanmaktadır. MDR - TB ile enfekte hastalar Dünya Sağlık Örgütü' nün önerileri doğrultusunda tedavi edilmektedir (WHO, 2010a). XDR - TB ile enfekte hastaların tedavi seçenekleri daha azdır ve AIDS' li hastalarda bu enfeksiyonun mortalite riski daha fazladır (Almeida da Silva, 2011).

Günümüzde enfeksiyon tedavisinde en büyük sorun olan ilaçlara direnç gelişimi tüberküloz enfeksiyonunda daha da ön plana çıkmakta ve gelecekte bu enfeksiyonun tedavisini neredeyse imkansız hale getirecek boyuta doğru ilerlemektedir. Bu nedenle tüberküloz tedavisine yeni bir yaklaşım sağlayacak molekül veya moleküllerin belirlenmesi toplum sağlığı açısından son derece önemli bir konu olarak

karşımıza çıkmaktadır. Bu tip yeni yaklaşımların belirlenebilmesi ancak, mikroorganizmanın sahip olduğu tüm direnç mekanizmalarının tam olarak anlaşılması ve bu mekanizmaların direnç gelişimindeki kesin rolünün belirlenmesi ile mümkün olacaktır.

Tüberküloz basillerinde direnç, doğal olarak direnç genlerinin varlığına veya spontan mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir. Bakteriler arası gen aktarımı yoluyla direnç oluşmamaktadır. Plazmitlere bağlı direnç tanımlanmamıştır. *Mycobacterium tuberculosis'* teki ilaç direnç mekanizmaları komplekstir ve bazıları hala bilinmemektedir (Durmaz, 2005; Jiang, 2008).

Mikobakteriler, hücre duvar yapılarının kompleks organizasyonu ile diğer bakterilerden belirgin biçimde farklılık gösterirler. Mikobakterilerde toksik bileşenlerin hücre içine girişi, kompleks hücre duvar yapısı ve lipid tabaka tarafından önemli bir şekilde kısıtlanmıştır. Membran geçirgenliğindeki azalma, ilaçların hücre içine girişinin azalmasına neden olur ve böylece intrasellüler ilaç birikiminde de bir azalma oluşturarak mikobakterilerin doğal direncine önemli katkıda bulunmaktadır. Mikobakterilerin doğal direncinde pompa proteinlerinin rolleri de son yıllarda yapılan çalışmalarla önem kazanmıştır (Brennan, 1995; Niederweis, 2003; Viveiros, 2003; Pasca, 2005; Hasdemir, 2007).

Son yıllarda, farklı mikroorganizmalarda ve kanser hücrelerinde çoklu ilaç direnç gelişimi ile eflüks pompası ve ilaç atılımı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Çalışmalar daha çok kolay elde edilen ve üretilen gram pozitif ve gram negatif bakterilerde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmaların çoğunda, eflüks pompasını inhibe eden ilaçlar kullanılarak, direnç gelişimi ile eflüks pompası arasındaki direkt fonksiyonel ilişki araştırılmış, bir kısmında eflüks pompasını oluşturan genler plazmid içerisinde klonlanarak mikroorganizma içerisinde ekspresyon miktarları arttırılmış ve ilaçlara direnç gelişimi değerlendirilmiş, bir kısmında ise izolatların antimikrobiyal MİK değerleri ile eflüks pompalarının ekspresyonları karşılaştırılmıştır (Ordway, 2003; Chuanchuen, 2003; 2005; Chollet, 2004; Piddock, 2006; Ruzin 2010).

Ordway ve arkadaşları (2003), Carpobrotus edulis bitkisinin methanol ekstraktının, L5178 fare T hücre lenfoma hücrelerindeki verapamile duyarlı eflüks pompasını inhibe ederek bu çoklu ilaca dirençli hücreleri antikanser ilaçlara duyarlı hale getirdiğini bildirmişlerdir.

Chuanchuen ve arkadaşları (2003), triclosanın yüksek düzeylerine intrinsik olarak dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarını kullandıkları çalışmalarında, agar birleştirme metodu ile bu suşların triclosanın yüksek düzeylerine (> 1000 µg/mL) dirençlerinin asıl nedeninin çoklu ilaç eflüks pompaları olduğunu bildirmişlerdir.

Chollet ve arkadaşları (2004), AcrAB - TolC pompasının *Escherichia coli* ve *Enterobacter aerogenes* suşlarında makrolid ve ketolid duyarlılığına olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında, çoklu ilaca dirençli izolatlarda eflüks pompası inhibitörü olan phenylalanine arginine beta - naphthylamide ile eritromisin, klaritromisin ve telitromisin duyarlılıklarında artış olduğunu bildirmişlerdir.

Ruzin ve arkadaşları (2010), *Acinetobacter calcoaceticus - Acinetobacter baumannii* kompleksi klinik izolatlarında tigesiklin MİK değerleri ile adeABC eflüks pompa geninin ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek ve adeABC pompası bağımlı mekanizmanın tigesikline karşı azalmış duyarlılık üzerine olan etkisini kanıtlamak amacıyla yaptıkları çalışmalarında, yüksek tigesiklin MİK değerlerine sahip *Acinetobacter calcoaceticus - Acinetobacter baumannii* suşlarında, adeABC eflüks pompa ekspresyonunun da artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca gen inaktivasyon çalışmaları AdeABC ile birlikte AdeIJK pompasının, *Acinetobacter baumannii* BM4454 klinik izolatında tetrasiklin, minosiklin ve tigesiklin direncine neden olduğunu göstermiştir.

Eflüks pompasının oluşması ve çalışmasında rol aldığı belirtilen genlerin mikobakterilerdeki eşdeğerleri veya benzerlerinin varlığı ve ilaç atılımı ile çoklu ilaç direnci gelişimi üzerindeki rolleri ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Özellikle klinik suşlarda bu genlerin ekspresyonlarındaki farklılıkları konu alan çok az çalışma vardır (De Rossi, 2006; Jiang, 2008).

DNA dizim çalışmaları, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv genomunun birçoğu daha karakterize edilememiş 150' ye yakın eflüks proteinini kodladığını göstermiştir. Biz bu çalışmamızda mikobakterilerde efflüks pompasında rol aldığı belirlenmiş olan; Rv1410c (p55), Rv2333c, *drrA, drrB, mmpL4, mmpL7,* Rv1258c, *iniA* (Rv0342), Rv0037c, Rv0783c, Rv1250, Rv1273c, Rv1634, Rv1687c ve Rv3000 gen ekspresyonlarını, direkt klinik olarak elde edilmiş olan 10 adet ilk basamak anti - TB ilaçlara duyarlı ve 10 adet çoklu ilaç direncine sahip toplam 20 *Mycobacterium tuberculosis* suşunda araştırdık (Ainsa, 1998; Kao, 2000; Silva, 2001; Choudhuri, 2002; Viveiros, 2003; Pasca, 2005; Colangeli, 2005; Gupta, 2006; Ramon-Garcia, 2007).

Jiang ve arkadaşları (2008), *Mycobacterium tuberculosis* MDR 1499 klinik izolatında, real time PZR ile Rv1410c ve Rv1258c genlerinin ekspresyonlarını öncelikle hiçbir ilaca maruz bırakmadan ölçüp, daha sonra ise izoniazid ve rifampisine maruz bırakarak ölçtükleri çalışmalarında, rifampisin varlığında bu pompaların ekspresyonlarının 3 kat, izoniazid varlığında ise 5 - 6 kat arttığını saptamışlardır. Sonuç olarak *Mycobacterium tuberculosis'* in çoklu direnç geliştirmesinin bazı eflüks genlerinin overekspresyonları ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Ramon Garcia ve arkadaşları (2009), *Mycobacterium bovis* BCG' yi model olarak aldıkları çalışmalarında, Rv1410c delesyonu ile bu suşu rifampin ve klofazimine daha duyarlı hale getirmişlerdir.

Silva ve arkadaşları (2001), Rv1410c (P55) genini *Mycobacterium smegmatis'* e klonladıklarında, bu bakterinin aminoglikozid ve tetrasiklinlere daha dirençli olduğunu saptamışlar, daha sonra eflüks pompası inhibitörleri olan carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), verapamil ve rezerpin varlığında streptomisin ve tetrasikline karşı direnç seviyelerinin düştüğünü saptamışlardır.

Siddiqi ve arkadaşları (2004), Rv1258c geninin ekspresyon miktarını PZR ile MDR MTB hasta izolatında (ICC154) araştırdıkları çalışmalarında, rifampisin ve ofloksasin varlığında Rv1258c geninin ekspresyonunun sırasıyla 10 ve 6 kat arttığını saptamışlardır.

Sharma ve arkadaşları (2010), rifampin ile birlikte piperine kombinasyonunun *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ve rifampisin dirençli (rif(r)) laboratuvar mutantı *Mycobacterium tuberculosis* üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, bu kombinasyon ile *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşlarında rifampisin MİK değerlerinin azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca rifampisin dirençli (rif(r)) laboratuvar mutantı *Mycobacterium tuberculosis'* de Rv1258c geninin ekspresyon seviyelerini real - time PZR ile ölçtüklerinde rifampisin varlığında Rv1258c geninin ekspresyonunun 3,6 kat arttığını saptamışlardır. Sonuç olarak piperine' in Rv1258c pompasını inhibe ederek gelecekte bu molekülün antimikobakteriyel aktivitede artış amacıyla kullanılabileceği görüşü desteklenmiştir.

De Rossi ve arkadaşları (2002), *Mycobacterium tuberculosis'* teki MFS ailesine üye 11 eflüks pompasını plazmid içerisinde klonlayıp *Mycobacterium smegmatis'* te ilaç direnç fenotiplerini araştırdıkları çalışmalarında, Rv1634 pompasının florokinolonlara (siprofloksasin, norfloksasin, ofloksasin ve lomefloksasin) karşı direnç artışına neden olduğunu ve Rv1258c pompasının da tetrasiklin direncinde artışa neden olduğunu saptamışlardır.

Ramon Garcia ve arkadaşları (2007), *Mycobacterium bovis* BCG' yi model olarak aldıkları çalışmalarında, *Mycobacterium bovis* BCG kromozomunda Rv2333c genini inaktive ettiklerinde spektinomisin ve tetrasiklin MİK değerlerinde bir azalma olduğunu saptayıp, daha sonra Rv2333c genini bir multikopya plazmide klonladıklarında ise spektinomisin ve tetrasiklin MİK değerlerinde artış olduğunu saptamışlardır.

Choudhuri ve arkadaşları (2002), ATP-bağlayıcı kaset (ABC) tipi çoklu ilaç taşıyıcılar grubuna dahil fonksiyonel doxorubicin eflüks pompa yapısına birlikte katılan ATP bağlayıcı protein DrrA ve integral membran proteini DrrB genlerini bir plazmid içerisinde *Escherichia coli* ve *Mycobacterium smegmatis'* e entegre edip bu pompanın ekspresyon miktarını artırarak yaptıkları çalışmalarında, *Escherichia coli'* de bu artışla birlikte etidyum bromide olan direncin 8 kat arttığını, *Mycobacterium smegmatis'* te ise yapısal olarak farklı bir çok ilaca karşı direnç artışı olduğunu gözlemlemiş ve pompa inhibitörü olan reserpin ile bu direncin azaldığını saptamışlardır.

Pasca ve arkadaşları (2005), *Mycobacterium tuberculosis mmpL7* genini *Mycobacterium smegmatis'* te overeksprese edip izoniazid akümülasyonunu ölçtükleri çalışmalarında, *mmpL7* eflüks pompasının izoniazide karşı yüksek düzeyde dirence neden olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca bu direncin eflüks pompa inhibitörleri olan rezerpin ve CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) varlığında azaldığını bildirmişlerdir.

Colangeli ve arkadaşları (2005), *Mycobacterium tuberculosis iniA* genini *Mycobacterium bovis* BCG suşunda overeksprese ettikleri çalışmalarında, *iniA* overekspresyonunun izoniazid ve etambutole karşı direnç artışı ile sonuçlandığını saptamışlardır. Ayrıca *iniA* geninde delesyona sahip *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının izoniazide daha duyarlı olduklarını ve BCG suşunda pompa inhibitörü olan rezerpin birlikteliğinde izoniazid duyarlılığında artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Tüm bu sonuçlara göre *Mycobacterium tuberculosis*, antitüberküloz ilaçlara maruz kaldıktan sonra genomunda ihtiva ettiği çeşitli sınıflara üye eflüks pompa genlerinin ekspresyonlarını artırarak, antitüberküloz ilaçlara karşı direnç kazanmaktadır. Kazanılan bu direnç, yukarıdaki çalışmalarda bahsedilen eflüks pompa inhibitörleri ile azaltılabilmektedir.

Bu çalışmamızda, tüberküloz tedavisinde kullanılabilecek yeni bir hedef molekülün belirlenmesi ve bu molekülü hedef alacak yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla çalışmamızda seçtiğimiz eflüks pompalarının klinik olarak elde ettiğimiz, ilaçsız LJ besiyerinde üretilmiş olan ve MDR fenotipindeki *Mycobacterium tuberculosis* suşlarındaki ekspresyon miktarlarını, yine klinik olarak elde ettiğimiz ve tüm birincil anti tüberküloz ilaçlara duyarlı olan *Mycobacterium tuberculosis* suşlarındaki ekspresyonları ile kıyaslamalı olarak araştırarak, eflüks pompalarının kalıcı MDR fenotipine neden olup olmadıklarını sorguladık.

Çalışmamızdaki sonuçlara göre, araştırdığımız eflüks pompa genlerinin (Rv1410c (p55), Rv2333c, *drrA, drrB, mmpL4, mmpL7,* Rv1258c, *iniA* (Rv0342), Rv0037c, Rv0783c, Rv1250, Rv1273c, Rv1634, Rv1687c ve Rv3000) MDR fenotipindeki *Mycobacterium tuberculosis* suşlarındaki ekspresyonları ile duyarlı suşlardaki ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu eflüks pompa genlerinin her iki grupta da benzer oranlarda eksprese oldukları saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre MDR fenotipinde eflüks pompalarının katkısının olmadığı söylenemez çünkü çalışmamızda *Mycobacterium tuberculosis* genomunda bulunan yaklaşık 150 eflüks proteininden yalnızca 15 pompa geninin ekspresyonları araştırılmıştır. Eflüks pompa oluşumuna katılan diğer genler MDR fenotipinin ortaya çıkmasına katkıda bulunabilecekleri gibi, pompa yapısına katılan genlerin başka mekanizmalarla indirekt olarak *Mycobacterium tuberculosis* veya diğer bakterilerde MDR fenotipi gelişmesine katkıda bulunabilmeleri de söz konusudur. Bu konunun aydınlanması için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Jiang ve arkadaşları (2008), *Mycobacterium tuberculosis* MDR 1499 klinik izolatında ve *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC standart suşunda, real time PZR ile Rv1410c, Rv1258c, Rv0783c, Rv2136c ve Rv1819c genlerinin ekspresyonlarını araştırdıkları çalışmalarında, Rv1410c, Rv1258c, Rv0783c ve Rv1819c pompalarının ekspresyonlarında iki suş arasında fark bulamamış, sadece

Rv2136c geninin *Mycobacterium tuberculosis* MDR 1499 klinik izolatında daha fazla eksprese olduğunu saptamışlardır.

Biz de çalışmamızda, seçtiğimiz eflüks pompa genlerinin ekspresyonlarını *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşlarında araştırdık. Bu aşamadaki PZR uygulamasını, pompaların ekspresyonlarının klinik olarak elde edilen *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında görülmeye başlandığı döngü sayısında ve daha önce ayarlanan gen/16S rRNA primer oranlarında gerçekleştirerek standart suşlar ile klinikten elde edilen suşlar arasında farklılık olup olmadığını görmek istedik. Sonuçlarımıza göre, araştırdığımız eflüks pompalarının tümünün ekspresyonlarının, araştırdığımız üç standart *Mycobacterium tuberculosis* suşunda da (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü) klinik olarak elde edilmiş olan suşlardaki ekspresyon miktarlarına göre istatistiksel olarak daha az olduğu tespit edilmiştir. Yani çalışmamızda hasta izolatları olan *Mycobacterium tuberculosis* suşlarında bu genlerin daha fazla eksprese edildikleri saptanmıştır ($p < 0,01$).

Jiang ve arkadaşları (2008), bizim de çalışmamızda araştırdığımız 15 genden üçü olan Rv1410c, Rv1258c ve Rv0783c gen ekspresyonlarında klinik izolat ile standart suş arasında ekspresyon farkı bulamamışlardır. Ancak Rv2136c geninin *Mycobacterium tuberculosis* MDR 1499 klinik izolatında daha fazla eksprese edildiğini saptamışlardır. Jiang ve arkadaşlarının çalışması ile bizim çalışmamızda, Rv1410c, Rv1258c ve Rv0783c genleri ile elde edilen sonuçlar uyuşmamasına rağmen, onların çalıştığı Rv2136c geni ile bizim çalışmamıza aldığımız 15 genin, standart suşlarda daha az oranlarda eksprese edildikleri tespit edilmiştir. Bu konunun aydınlanabilmesi için, eflüks pompasının yapısına katılan diğer genlerin de yine çalışmamızdaki gibi standart suşlar ile klinikten elde edilmiş suşlar arasındaki ekspresyon farklılıklarının ölçülüp değerlendirileceği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anti – TB ilaçların varlığında bazı pompa ilişkili genlerin ekspresyonlarında artış olduğu bilinmektedir. Biz bu çalışmamızda klinik olarak elde ettiğimiz suşlar ve standart suşları çalışmalar boyunca ilaca maruz bırakmadık. Araştırdığımız pompa genlerinin ekspresyon miktarlarında duyarlı ve MDR fenotipli *Mycobacterium tuberculosis* suşları arasında fark gözlenmemiş olmasına rağmen, her iki gruptaki ekspresyon miktarlarının standart suşlardaki ekspresyon miktarlarına göre 3 - 4 kat artmış olması, çalışmada kullandığımız suşların ilaçsız ortamda üretilmesine karşın, klinik izolatlarda, muhtemelen kullanılan ilaçlara bağlı olarak pompa genlerinin sürekli olarak daha fazla eksprese olduklarını göstermektedir. *M. tuberculosis* duyarlılık testlerinde kullanılan ilaç dozlarında duyarlı olarak belirtilen klinik suşların, daha sonradan antitüberküloz ilaçlara artmış MİK değerlerine sahip olabileceği muhtemeldir. Literatür bilgimiz dahilinde incelediğimiz pompa genleri ile ilgili ilk defa tarafımızdan ortaya konulan klinik suşlardaki efflüks pompa ekspresyon artışının, çoklu ilaç direnç gelişiminde ara form oluşturabileceği ve son yıllarda tanımlanan yaygın ilaç dirençli tüberküloz (XDR - TB) fenotipinin oluşmasında rol oynayabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Hastanesi' nde tüberküloz tanısı ile yatarak tedavi gören hastalara ait klinik örneklerden alınan çoklu ilaç dirençli 10 ve tüm ilk basamak anti - TB ilaçlara duyarlı 10 *Mycobacterium tuberculosis* suşu, ayrıca Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı' ndan temin edilen *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 ve *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşu olmak üzere 3 standart suş çalışmaya alınmıştır.

2. Bu suşlarda multipleks RT - PZR yöntemi ile *Mycobacterium tuberculosis'* de eflüks pompa yapısına katıldığı gösterilmiş olan; Rv1410c (p55), Rv2333c, *drrA, drrB, mmpL4, mmpL7,* Rv1258c, *iniA* (Rv0342), Rv0037c, Rv0783c, Rv1250, Rv1273c, Rv1634, Rv1687c ve Rv3000 genlerinin ekspresyon miktarları, ilgili genlerin logaritmik artış fazlarında, internal kontrol olarak kullanılan 16S rRNA geni ile oranlanarak araştırılmıştır.

3. Rv1410c (p55), Rv2333c, *drrA, drrB, mmpL4, mmpL7,* Rv1258c, *iniA* (Rv0342), Rv0037c, Rv0783c, Rv1250, Rv1273c, Rv1634, Rv1687c ve Rv3000 genlerinin klinik olarak elde edilmiş olan çoklu dirençli *Mycobacterium tuberculosis* suşlarındaki ekspresyon miktarlarında, duyarlı suşlara oranla belirgin bir farklılık bulunamamıştır.

4. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşlarında ise araştırdığımız eflüks pompalarının tümünün ekspresyonlarının, klinik olarak elde edilmiş olan suşlardaki ekspresyon miktarlarına göre daha az oranlarda oldukları tespit edilmiştir.

5. Çalışmamız, eflüks pompasının birçok üyesini aynı anda araştırması ve direkt klinik olarak elde edilmiş MDR fenotipi bulunduran suşlarla çalışılması açısından bu konuda mevcut literatür bilgilerinden daha fazla aydınlatıcı olmuştur.

6. Çalışmamıza aldığımız genlerin ekspresyonlarındaki değişikliklerin, gen ekspresyon farklılıklarını gözlemlemede RT - PZR yönteminden daha sensitif bir yöntem olan real - time PZR yöntemi kullanılarak araştırılabileceği çalışmalar yapılabilir.

7. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv genomunun daha birçok eflüks proteinini kodlandığı düşünüldüğünde, bir ileri aşama olarak çalışmamıza almadığımız diğer eflüks proteinlerinden seçilecek bir kısmının ekspresyonlarının, klinik olarak elde edilmiş olan MDR fenotipine sahip suşlar üzerinde RT - PZR veya real - time PZR yöntemleri ile araştırılacağı çalışmalar yapılabilir.

8. Yine bir ileri aşama olarak çalışmamıza almadığımız diğer eflüks proteinlerinden seçilecek bir kısmının ekspresyonlarının, standart suşlar ile klinik olarak elde edilmiş olan suşlar üzerinde karşılaştırmalı olarak RT - PZR veya real - time PZR yöntemleri ile araştırılacağı çalışmalar yapılabilir.

9. Bu çalışmanın devamı olarak, standart suşlar ve klinik olarak ilaçlara duyarlı bulunan suşlarda duyarlılık testlerinin, ilaçların MİK değerlerinin araştırılmasıyla yapılması sonucunda, standart suşlardaki pompa gen ekspresyonlarındaki düşüklüğün sonuçlarını açıklamak mümkün olabilir. Başka bir deyişle, ileri bir çalışmayla standart suşlardaki pompa gen ekspresyon azlığının, bu suşlarda ilaçların MİK değerlerinin daha düşük seviyede gerçekleşmesine neden oldukları gösterilebilir.

ÖZET

Mycobacterium tuberculosis Suşlarında Eflüks Pompasını Oluşturan Gen Ekspresyonlarının Çoklu İlaç Direnç Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Tüberküloz tedavisinde, ilaçların hedeflediği genlerdeki mutasyonlar ilaçlara karşı gelişen direncin en önemli nedenlerindendir. Bununla birlikte klinik izolatlardan elde edilen *M. tuberculosis* suşlarının rifampin (RIF), izoniazid (INH), ethambutol (EMB), pirazinamid (PZA) ve streptomisin (STR) gibi temel tüberküloz ilaçlarına karşı gelişen yüksek direnci sadece hedef genlerde oluşan mutasyonlarla açıklamak mümkün olmamaktadır. Hedef genlerdeki mutasyonlar dışında, ilacı hücre dışına pompalayan atım (eflüks) pompası gibi farklı mekanizmalar, çoklu ilaç direnci gösteren birçok bakteride tanımlanmıştır. Bu şekilde çoklu ilaç direnci gösteren grupta rol alan gen veya genlerin belirlenmesi ile direnç mekanizmasının anlaşılması yanında özellikle çoklu ilaç direnci gösteren suşlarla ortaya çıkan tüberküloz hastalığının tedavisinde yeni bir hedefin ortaya konması önemlidir. Bu çalışmada, Rv1410c (p55), Rv2333c, *drrA, drrB, mmpL4, mmpL7,* Rv1258c, *iniA* (Rv0342), Rv0037c, Rv0783c, Rv1250, Rv1273c, Rv1634, Rv1687c ve Rv3000 genlerinin, direkt klinik olarak elde edilmiş olan çoklu ilaç direnci gösteren *M. tuberculosis* suşları ve yine klinik örneklerden elde edilen ve direnç göstermeyen suşlardaki ekspresyon farklılıkları multipleks RT - PZR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Buna ek olarak bu genlerin ekspresyonları, *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur enstitüsü standart suşlarında da araştırılmıştır.

Yapılan incelemeler sonucunda, araştırdığımız eflüks pompalarının MDR fenotipindeki *M. tuberculosis* suşlarındaki ekspresyonları ile duyarlı suşlardaki ekspresyonları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiş, söz konusu pompa genlerinin her iki grupta da benzer oranlarda eksprese edildikleri saptanmıştır. Aynı zamanda araştırdığımız eflüks pompalarının ekspresyonlarının, klinik olarak elde edilmiş olan suşlardaki ekspresyon miktarlarına göre, her üç *M. tuberculosis* standart suşunda daha az olduğu tespit edilmiştir. Eflüks pompa proteinlerinin klinik suşlarda ekspresyonlarının artması, muhtemelen başka direnç genleriyle veya proteinlerle etkileşime girerek belirli sübstratların ihracı ile ilişkili olabileceklerini göstermektedir ve *M. tuberculosis'* te birden çok ilacın MİK değerlerini artırmış olması muhtemeldir. Böyle bir ilişkinin varlığını tam olarak ortaya koyabilmek için konu ile ilgili daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: Eflüks pompası, *Mycobacterium tuberculosis*, Çoklu direnç gelişimi

SUMMARY

Investigation of the Relation of Multiple Drug Resistance with the Expression of Genes which Made of Efflux Pump in *Mycobacterium tuberculosis*

Mutations of the drug target genes are known as the important reasons of the drug resistance in the treatment of tuberculosis. However, it is not possible to explain all clinically observed multiple drug resistance to first line drugs such as rifampicin, isoniazid, ethambutol, pyrazinamide and streptomycin only with mutations of the target genes. Beyond drug target gene mutations, other mechanisms such as over expression of efflux pumps has to be considered especially for MDR. Finding a gene or genes that are involved with MDR will not only be helpful to understand the mechanisms of multidrug resistance but also will be useful for finding a new target for the treatment of drug resistant tuberculosis. In this study, we aimed to compare the differences of the expression of the genes including; Rv1410c (p55), Rv2333c, *drrA, drrB, mmpL4, mmpL7,* Rv1258c, *iniA* (Rv0342), Rv0037c, Rv0783c, Rv1250, Rv1273c, Rv1634, Rv1687c and Rv3000 in clinically isolated *M. tuberculosis* strains with and without MDR. To show the expression difference in two groups, we used Multiplex RT - PCR strategy. Additionally we investigate the expression of these genes in *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. tuberculosis* H37Rv RSKK 598 Pasteur institute reference strains. Our results showed that this pump genes have similar rates of expressions in strains with and without MDR. However, we found the expression level of the all pump genes which we studied lower in standart strains compared to the expression level of the clinical strains. This may indicate that the efflux pump expressions are increased in clinical strains, perhaps may be associated with the export of specific substrates with interact with other resistance genes or proteins and may increase MIC level in *M. tuberculosis*. Further studies are necessary to determine the presence of such an association.

Key Words: Efflux pump, *Mycobacterium tuberculosis*, Multiple Drug Resistance

KAYNAKLAR

21. yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Kitabı, Samsun, (2003), pp: 414.

Ainsa, J.A., Blokpoel M.C., Otal I., Young D.B., De Smet K.A., Martín C. (1998). Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, **180**: 5836-43.

Almeida da Silva P.E., Von Groll A., Martin A., Palomino J.C. (2011). Efflux as mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis. FEMS Immunology & Medical Microbiology, "Accepted Article"*

Anğ, Ö., Erturan Z., Uzun M. (1997). Dünyada ve Türkiye' de Tüberküloz. *İnfeksiyon Dergisi*, **11** (4:Ek yayın): 1-5.

Anğ, Ö., Uzun M. (1996). Tüberküloz Tanı, Direnç, Tedavi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayını*, **26**: 17-25.

Baulard, A.R., Betts J.C., Engohang-Ndong J., Quan S., McAdam R.A., Brennan P.J., Locht C., Besra G.S. (2000). Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 28326-31.

Bilgehan, H. (2000). Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, pp.440-1. Barış Yayınları: İzmir.

Bilgiç, H. (1991). Tüberküloz epidemiyolojisi, Tüberküloz Kliniği ve Kontrolü, (ed. Kocabaş A.), pp.401-37. Çukurova Üniversitesi Basımevi: Adana.

Bilgiç, H. (2003). Türkiye' de tüberkülozun durumu ve eradikasyon programı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun. Sempozyum Kitabı, pp: 18-33.

Brennan, P.J. (2003). Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis*, **83**: 91-7.

Brennan, P.J., Nikaido H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry,* **64**: 29-63.

Chatterjee, D. (1997). The mycobacterial cell wall: Structure, biosynthesis and site of drug action. *Current Opinion in Chemical Biology*, **1**: 579-88.

Chollet, R., Chevalier J., Bryskier A., Pages J.M. (2004). The AcrABTolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli. Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*, **48**: 3621-4.

Choudhuri, B.S., Bhakta S., Barik R., Basu J., Kundu M., Chakrabarti P. (2002). Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drrA* and *drrB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Biochemical Journal,* **367:** 279-85.

Choudhuri, B.S., Sen S., Chakrabarti P. (1999). Isoniazid accumulation in *Mycobacterium smegmatis* is modulated by proton motive force-driven and ATP-dependent extrusion systems. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **256**: 682-4.

Chuanchuen, R., Gaynor J.B., Karkhoff-Schweizer R., Schweizer H.P. (2005). Molecular characterization of MexL, the transcriptional repressor of the mexJK multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy,* **49**: 1844-51.

Chuanchuen, R., Karkhoff-Schweizer R.R., Schweizer H.P. (2003). High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux. *American Journal of Infection Control,* **31**: 124-7.

Colangeli, R., Helb D., Sridharan S., Sun J., Varma-Basil M., Hazbon M.H., Harbacheuski R., Megjugorac N.J., Jacobs W.R., Holzenburg Jr.A., Sacchettini J.C., Alland D. (2005). The *Mycobacterium tuberculosis iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Molecular Microbiology*, **55**: 1829-40.

Çilli, A. (2003). Antitüberküloz İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. 21. yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu, Samsun. Sempozyum Kitabı, pp: 163-5.

Dabbs, E.R., Yazawa K., Mikami Y., Miyaji M., Morisaki N., Iwasaki S., Furihata K. (1995). Ribosylation by mycobacterial strains as a new mechanism of rifampin inactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*, **39**: 1007-9.

Davies, J., Wright G.D. (1997). Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends in Microbiology,* **5**: 234-40.

De Rossi, E., Ainsa JA., Riccardi G. (2006). Role of Mycobacterial Efflux Transporters in Drug Resistance: An Unresolved Question. *Fems Microbiology Reviews*, **30**: 36-52.

De Rossi, E., Arrigo P., Bellinzoni M., Silva P.A., Martín C., Aínsa J.A., Guglierame P., Riccardi G. (2002). The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis. Molecular Medicine,* **8**: 714-24.

Draker, K.A., Boehr D.D., Elowe N.H., Noga T.J., Wright G.D. (2003). Functional annotation of putative aminoglycoside antibiotic modifying proteins in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. The *Journal of Antibiotics (Tokyo),* **56**: 135-42.

Durmaz, R. (2005). *Mycobacterium tuberculosis'* de Direnç Sorunu. *Ankem Dergisi,* **19(2)**: 107-10.

Fajardo, A., Martinez-Martin N., Mercadillo M., Galan J.C., Ghysels B., Matthijs S., Cornelis P., Wiehlmann L., Tummler B., Baquero F., Martinez J.L. (2008). The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS ONE,* **3**: 1619.

Gedikoğlu, S. (1997). *Mycobacterium tuberculosis'* in hücre yapısı. *İnfeksiyon Dergisi*, **11** (4:Ek yayın): 13-7.

Geiman, D.E., Raghunand T.R., Agarwal N., Bishai W.R. (2006). Differential gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress conditions among seven *Mycobacterium tuberculosis whiB*-like genes. *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*, **50:** 2836-41.

Göçmen, A. (1992). TB tanı ve tedavi. *Katkı Pediatri Dergisi*, **13(1)**: 64-79.

Guerrero, C., Stockman L., Marchesi F., Bodmer T., Roberts G.D., Telenti A. (1994). Evaluation of the *rpoB* gene in rifampicin-susceptible and-resistant *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **33**: 661-3.

Gupta, A.K., Chauhan D. S., Srivastava K., Das R., Batra S., Mittal M., Goswami P., Singhal N., Sharma V.D., Venkatesan K., Hasnain S.E., Katoch V.M. (2006). Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its correlation with expression levels of two major efflux pumps in mycobacteria. *The Journal of Communicable Diseases*, **38**: 246-54.

Hasdemir, U. (2007). Çoklu ilaç direncinde bakteri hücre duvarı organizasyonu ve aktif pompa sistemlerinin rolü. *Mikrobiyoloji Bülteni,* **41**: 309-27.

Heym, B., Alzari, P.M., Honore N., Cole S.T. (1995). Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, katG, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, **15**: 235-45.

Heym, B., Saint-Joanis B., Cole S.T. (1999). The molecular basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease*, **79**: 267-71.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/

Huitric, E., Werngren J., Jureen P., Hoffner S. (2006). Resistance levels and *rpoB* gene mutations among in vitro-selected rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotheraphy,* **50**: 2860-2.

Jiang, X., Zhang W., Zhang Y., Gao F., Lu C., Zhang X., Wang H. (2008). Assessment of Efflux Pump Gene Expression in a Clinical Isolate *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time Reverse Transcription PCR. *Microbial Drug Resistance*, **14(1):** 7-11.

Kao, S.J., You I., Clewell D.B., Donabedian S.M., Zervos M.J., Petrin J., Shaw K.J., Chow J.W. (2000). Detection of the high-level aminoglycoside resistance gene aph(2")-Ib in *Enterococcus faecium. Antimicrobial Agents and Chemotheraphy*, Oct;**44(10)**: 2876-9.

Kılıçaslan, Z. (2007). Tüberküloz Kontrol Programları ve DGTS. 5. Tüberküloz Sempozyumu ve 6. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri, Ankara. pp:66.

Kıyan, M. (1999). Mycobacteriaceae. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji (ed: Ustaçelebi Ş.), pp: 419-55. Güneş Kitabevi: Ankara.

Köksal, F., Yaman A. (2003). Farklı bir Bakteri Topluluğu Mikobakterilerde Hücre Duvarı Yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve 2. Tüberküloz Laboratuar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun. pp: 34-47.

Kumar, A., Schweizer H.P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**: 1486-513.

Li, X.Z., Nikaido H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, **64**: 159-204.

Lin, H.T. (1986). The tuberculosis problem and its control in East Asia and the South Pacific Area. *Bulletin of the International Union Against Tuberculosis*, **61**: 28-39.

Lomovskaya, O., Watkins W.J. (2001). Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. *Current Medicinal Chemistry*, **8**: 1699-711.

Louw, G.E.,Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., McEvoy, C.R.E., Van Helden, P.D., Victor, T.C. (2009). A Balancing Act: Efflux/Influx in Mycobacterial Drug Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* **53(8)**: 3181-9.

Marquez, B. (2005). Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie,* **87**: 1137-47.

Morlock, G.P., Metchock B., Sikes D., Crawford J.T., Cooksey R.C. (2003). *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* **47**: 3799-805.

Murray, P., Rosenthal K., Pfaller M. (2005). Medical Microbiology. 5 th edn., Philadelphia, pp: 297-310.

Niederweis, M. (2003). Mycobacterial porins- new channel proteins in unique outer membranes. *Molecular Microbiology*, **49**: 1167-77.

Nikaido, H. (1998). The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug Access? *Drug Resistance Updates,* **1**: 93-8.

Nikaido, H. (2001). Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Seminars in Cell&Developmental Biology*, **12**: 215-23.

Obata, S., Zwolska Z., Toyota E., Kudo K., Nakamura A., Sawai T., Kuratsuji T., Kirikae T. (2006). Association of *rpoB* mutations with rifampicin resistance in *Mycobacterium avium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **27**: 32-9.

Ordway, D., Hohmann J., Viveiros M., Viveiros A., Molnar J., Leandro C., Arroz M.J., Gracio M.A., Amaral L. (2003). Carpobrotus edulis methanol extract inhibits the MDR efflux pumps, enhances killing of phagocytosed *S. aureus* and promotes immune modulation. *Phytotherapy Research*,**17**: 512-9.

Otkun, M. (2001). Tüberküloz Tedavisinde Temel İlkeler ve Direnç Sorunu. *Klimik Dergisi*, **14**: 71-82.

Özkara, Ş. (2007). Yaygın İlaç Dirençli Tüberküloz. *Solunum Hastalıkları*, **18**: 88-92.

Pasca, M.R., Guglierame P., De Rossi E., Zara F., Riccardi G. (2005). *MmpL7* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* is Responsible for Isoniazid Efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49:** 4775-7.

Piddock, L.J., Williams K.J., Ricci V. (2000). Accumulation of rifampicin by *Mycobacterium aurum, Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* **45**: 159-65.

Piddock, L.J.V. (2006). Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**: 382.

Poole, K. (2000). Efflux mediated resistance to flouroquinolones in gram positive bacteria and mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* **44**: 2595-9.

Poole, K. (2004). Efflux mediated resistance in gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection,* **10:** 12-24.

Portillo-Gomez, L., Nair J., Rouse D.A., Morris S.L. (1995). The absence of genetic markers for streptomycin and rifampicin resistance in *Mycobacterium avium* complex strains. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* **36**: 1049-53.

Quan, S., Venter H., Dabbs E.R. (1997). Ribosylative inactivation of rifampin by *Mycobacterium smegmatis* is a principal contributor to its low susceptibility to this antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 2456-60.

Ramaswamy, S., Musser J.M. (1998). Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease*, **79**: 3-29.

Ramaswamy, S.V., Reich R., Dou S.J., Jasperse L., Pan X., Wanger A., Quitugua T., Graviss E.A. (2003). Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**: 1241-50.

Ramon-Garcia, S., Martin C., De Rossi E., Ainsa J.A. (2007). Contribution of the Rv2333c Efflux Pump (the stp protein) from *Mycobacterium tuberculosis* to Intrinsic Antibiotic Resistance in *Mycobacterium bovis* BCG. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **59**: 544-7.

Ramon-Garcia, S., Martín C., Thompson C.J., Aínsa J.A. (2009). Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 Efflux Pump in Intrinsic Drug Resistance, Oxidative Stress Responses, and Growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53(9):** 3675-82.

Ren, Q., Chen K., Paulsen I.T. (2007). TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic Acids Research,* **35**: 274-9.

Roberts, M.C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution. *FEMS Microbiology Reviews*, **19**: 1-24.

Roth, A., Fischer M., Hamid M.E., Michalke S., Ludwig W., Mauch H. (1998). Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria Based on 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences. *Journal of Clinical Microbiology,* **36**: 139-47.

Ruzin, A., Immermann F.W., Bradford P.A. (2010). RT-PCR and Statistical Analyses of adeABC Expression in Clinical Isolates of *Acinetobacter calcoaceticus–Acinetobacter baumannii* Complex. *Microbial Drug Resistance,* **16(2)**: 87-9.

Saniç, A., Çoban A.Y. (1999). Mikobakteriler ve Laboratuvar Tanı, Samsun. pp: 1-2.
Sarıbaş, Z. (2006). Tüberküloz Tedavisinde Yeni İlaç Geliştirme Çalışmaları. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **37**: 159-63.

Sharma, S., Kumar M., Sharma S., Nargotra A., Koul S., Khan I.A. (2010). Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* **65**: 1694-1701.

Siddiqi, N., Das R., Pathak N., Banerjee S., Ahmed N., Katoch V.M., Hasnain S.E. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump. *Infection,* **32**: 109-11.

Silva, P.E., Bigi F., de la Paz S.M., Romano M.I., Martin C., Cataldi A., Ainsa J.A. (2001). Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45:** 800-4.

Tahaoğlu, K., Kizkin O., Karagöz T., Tor M., Partal M., Sadoğlu T. (1994). High initial and acquired drug resistance in pulmonary tuberculosis in Turkey. *Tubercle and Lung Disease,* **75(5):** 324-8.

Telenti, A. (1997). Genetics of drug resistance in tuberculosis. *Clinics in Chest Medicine*, **18**: 55-64.

Telenti, A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J., Matter L., Schopfer K., Bodmer T. (1993). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet,* **341**: 647-50.

Viveiros, M., Leandro C., Amaral L. (2003). Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *International Journal of Antimicrobial Agents,* **22**: 274–8.

Viveiros, M., Portugal I., Bettencourt R., Victor T.C., Jordaan A.M., Leandro C., Ordway D., Amaral L. (2002). Isoniazid-induced transient high-level resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**: 2804-10.

Wilson, M., DeRisi J., Kristensen H.H., Imboden P., Rane S., Brown P.O., Schoolnik G.K. (1999). Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,* **96(22)**: 12833-8.

World Health Organization (2010a). Treatment of tuberculosis guidelines. Fourth Edition. WHO/HTM/TB/2009.420 Geneva.

World Health Organization (2010b). Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. 2010. WHO/HTM/TB/2010.3

Yolsal, N., Malat G., Dişçi R., Örkün M., Kılıçaslan Z. (1998). Türkiye'de tüberküloz ilaçlarına direnç sorununun 1984-1989 ve 1990-1995 yılları için karşılaştırılması: Meta-analiz. *Klimik Dergisi,* **1:** 6-9.

Zainuddin, Z.F., Dale J.W. (1990). Does *Mycobacterium tuberculosis* have plasmids? *Tubercle,* **71**: 43-9.