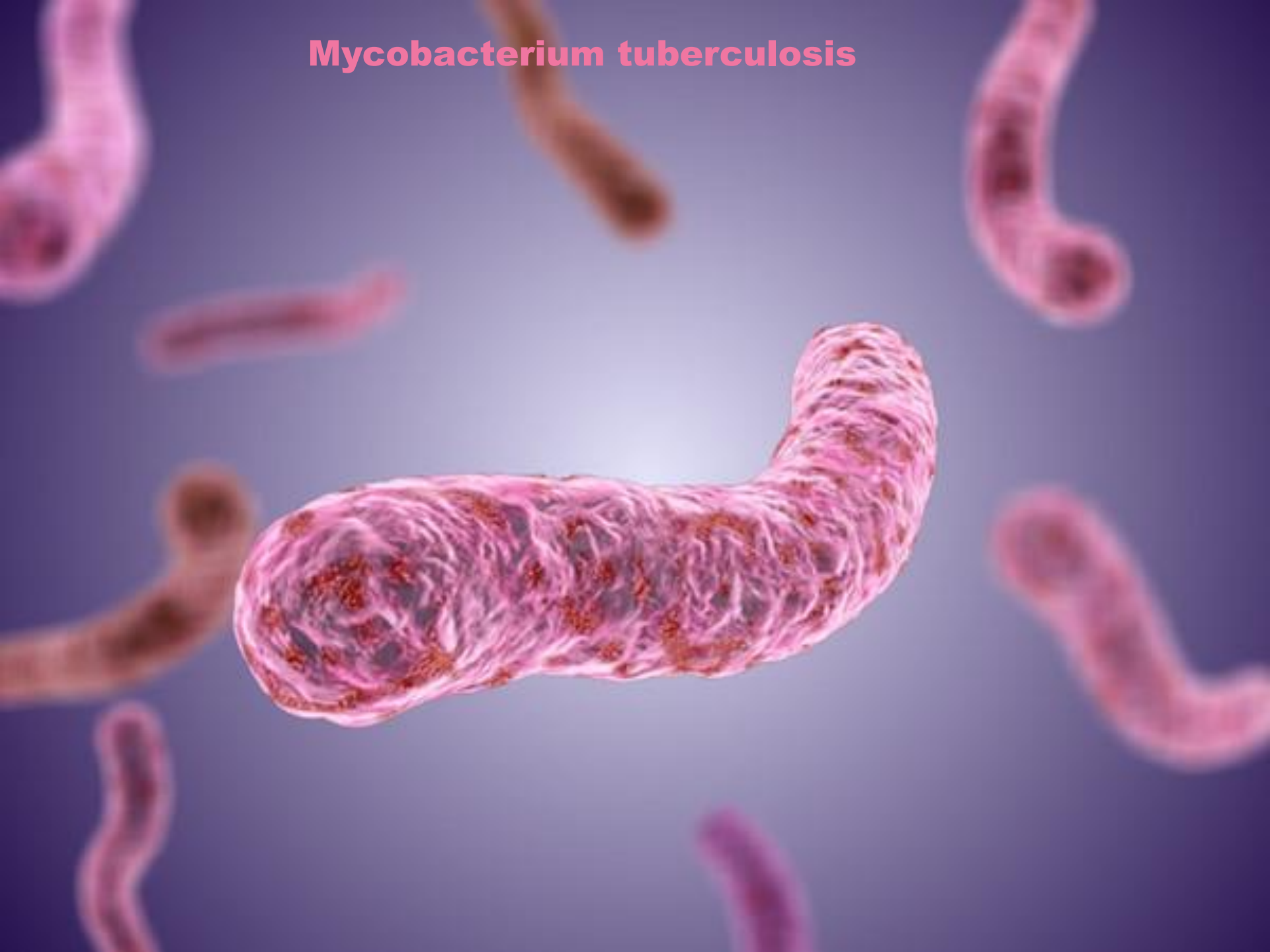


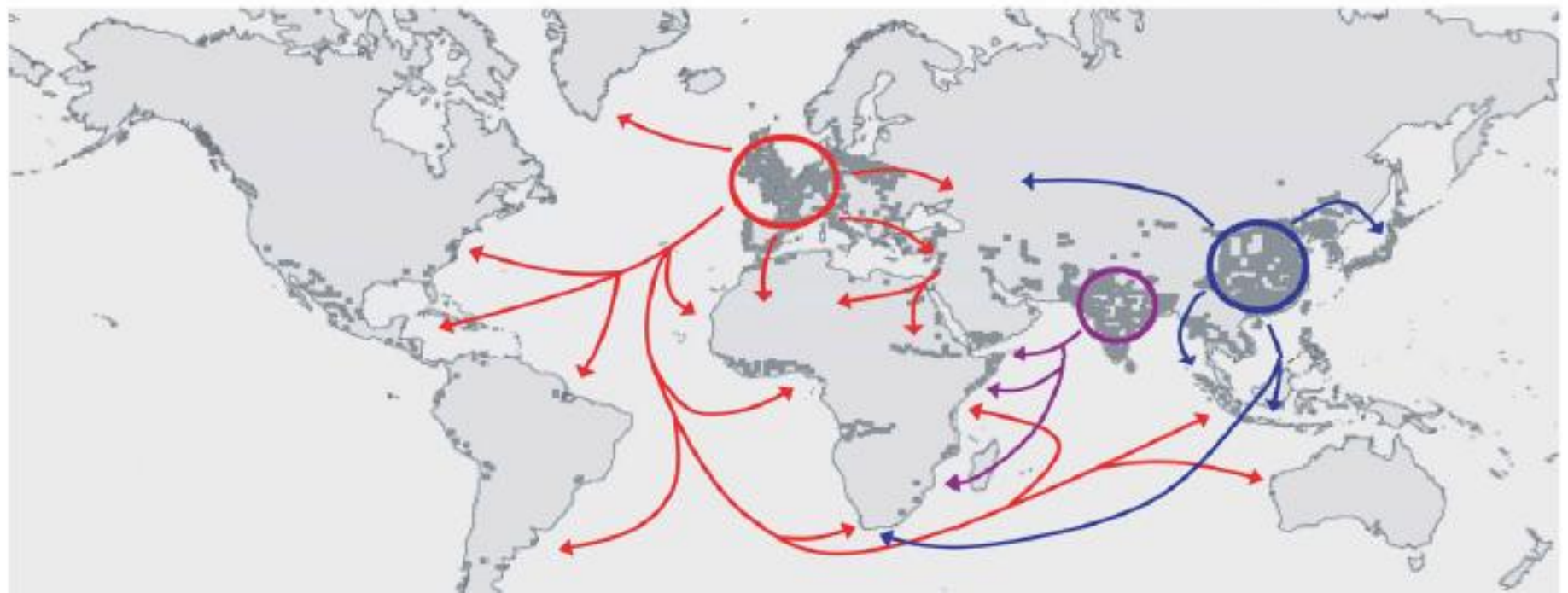
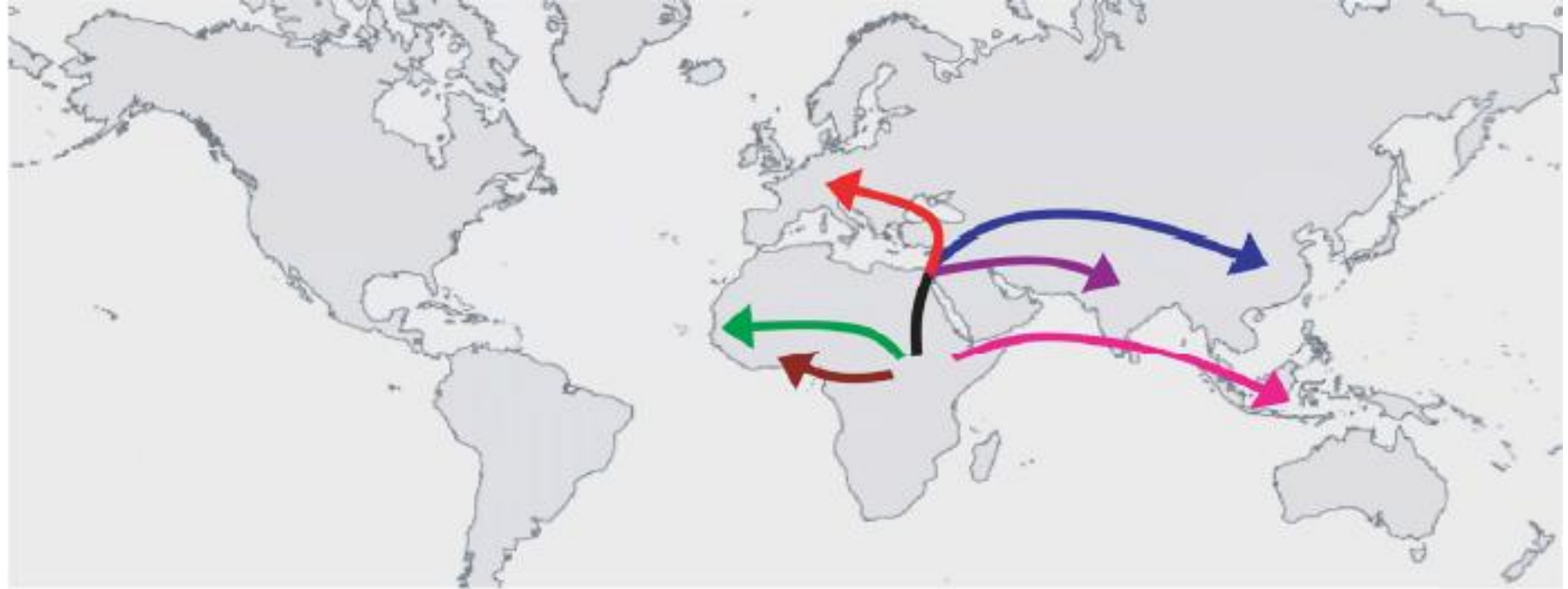
TÜBERKÜLOZ TEDAVİSİ İÇİN YENİ İLAÇ HEDEFLERİ

Doç. Dr. Alpaslan Alp

**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

Mycobacterium tuberculosis





Sunum Akışı:

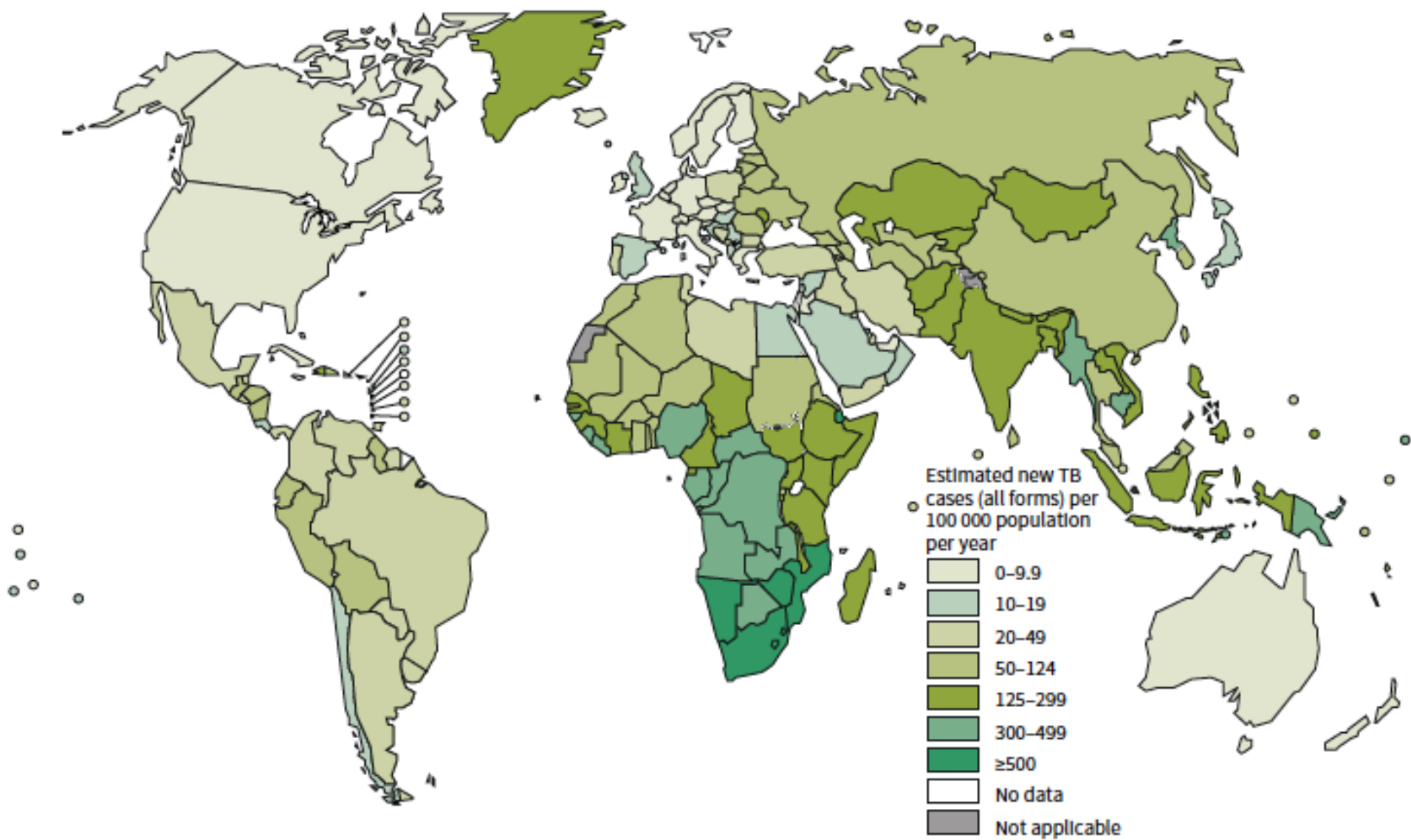
- 1. Tüberküloz: Dünyada ve Türkiye’de güncel durum**
- 2. İlaç direnci**
- 3. Tüberküloz basilinin olağanüstü adaptasyon yeteneği**
- 4. Yeni ilaç hedefleri bulunabilir mi?**
- 5. Dirençli basil evriminin bir sonu olabilir mi?**

Tüberküloz: Dünyada ve Türkiye' de Son Durum

- **Dünya nüfusunun %30' u *M. tuberculosis* ile enfekte**
- **Her yıl 8 milyon yeni tüberküloz olgusu**
- **Her yıl tüberküloz nedeniyle 1.5 milyon ölüm**
- **Türkiye'de her yıl 10.000'e yakın yeni hasta**

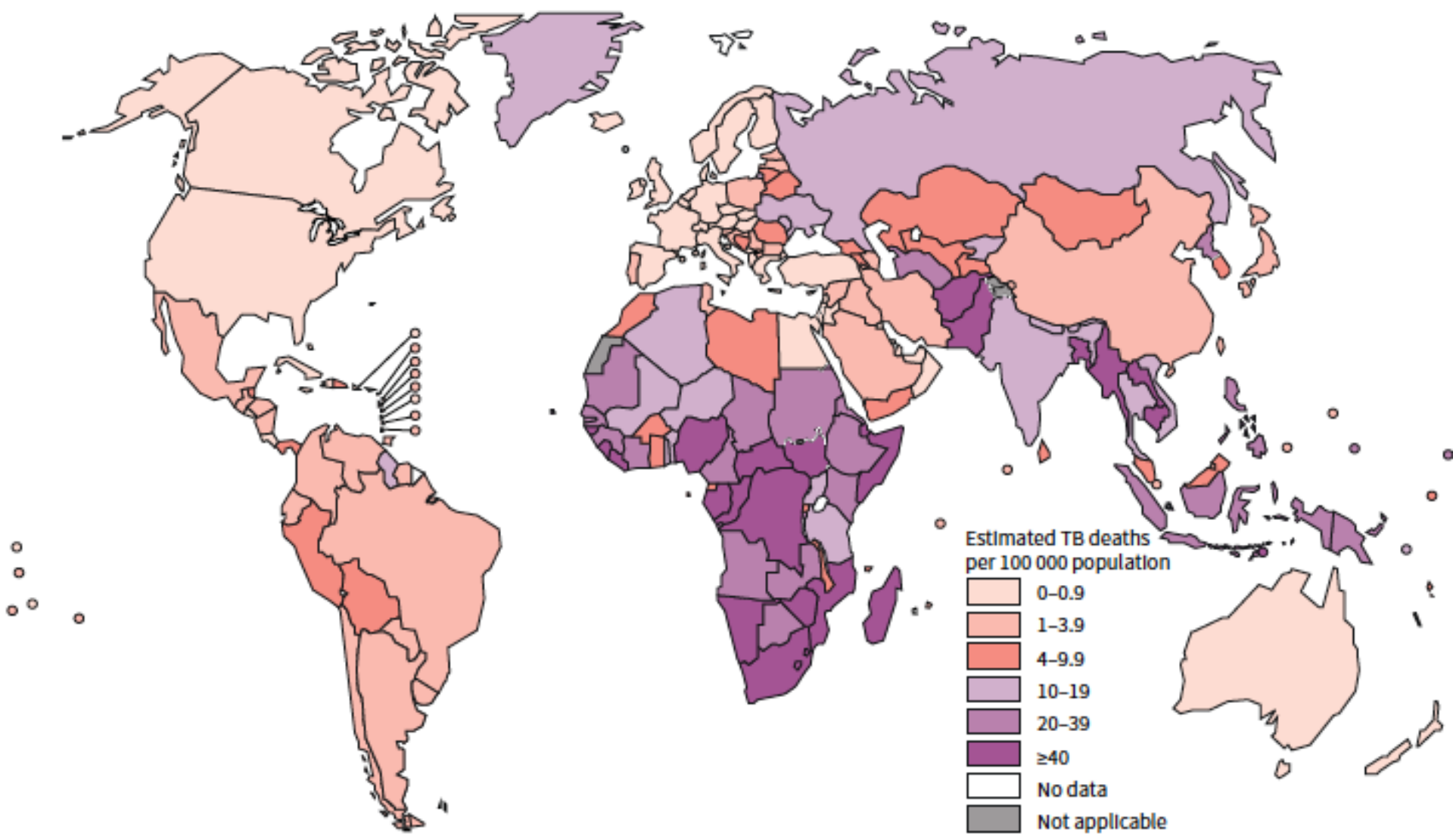
WHO: Global Tuberculosis Report 2014

Estimated TB incidence rates, 2013



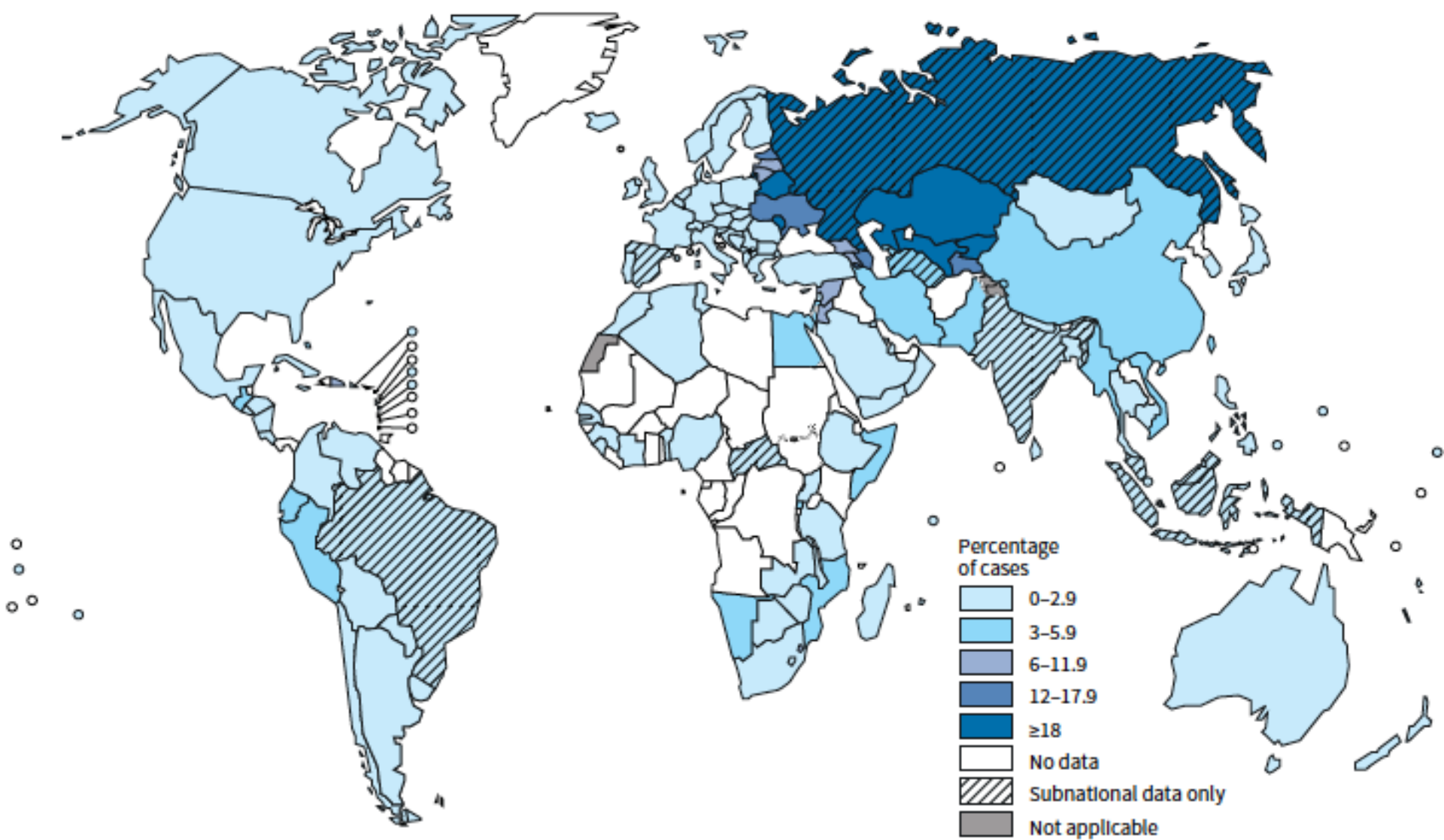
WHO: Global Tuberculosis Report 2014

Estimated TB mortality rates excluding TB deaths among HIV-positive people, 2013



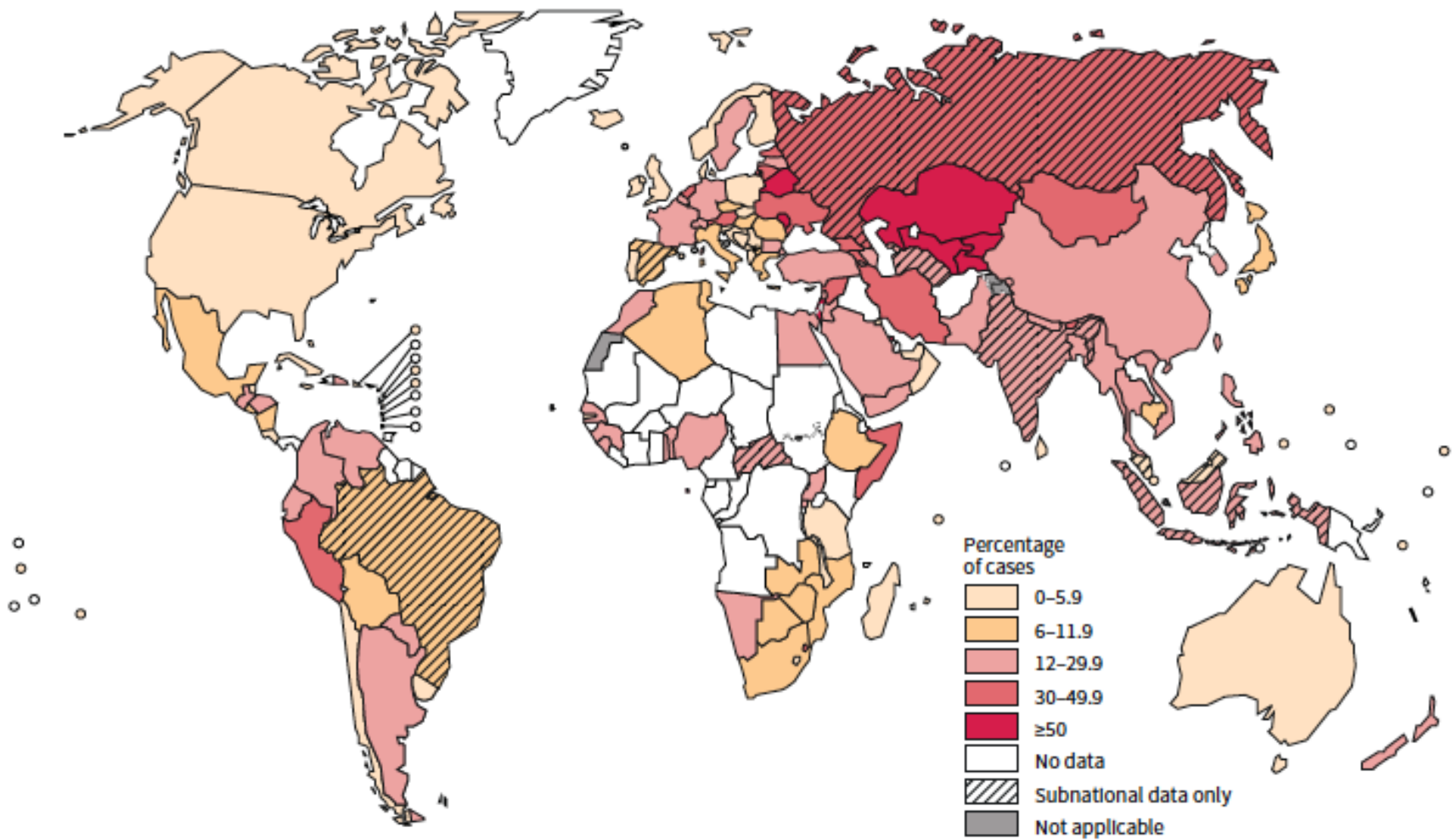
WHO: Global Tuberculosis Report 2014

Percentage of new TB cases with MDR-TB^a

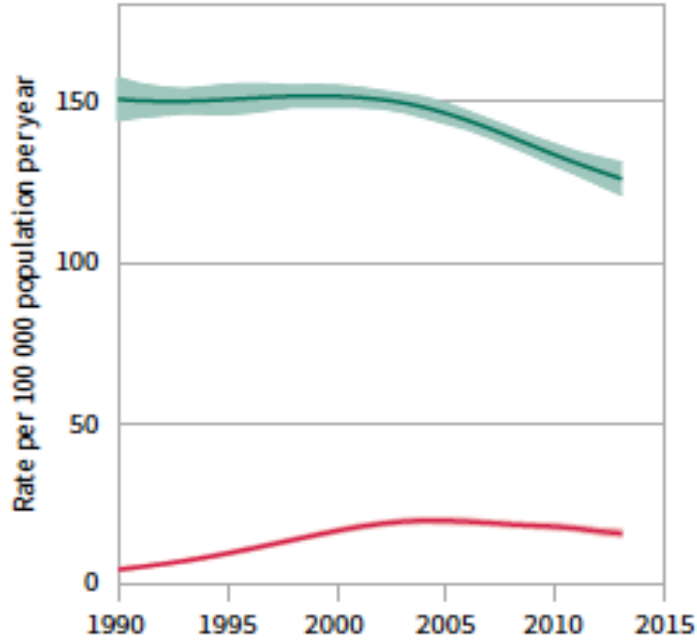


WHO: Global Tuberculosis Report 2014

Percentage of previously treated TB cases with MDR-TB^a



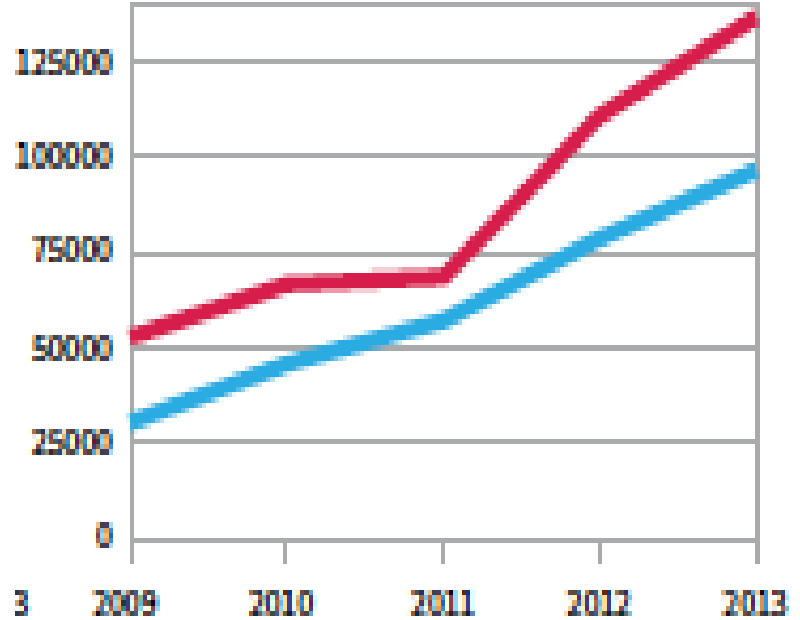
Dünya Geneline Trend



Tüberküloz insidansı

Yeşil: TB

Kırmızı: TB+HIV



ÇİD-TB sayısı

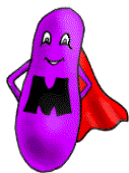
Kırmızı: Rifampisin-Dirençli TB

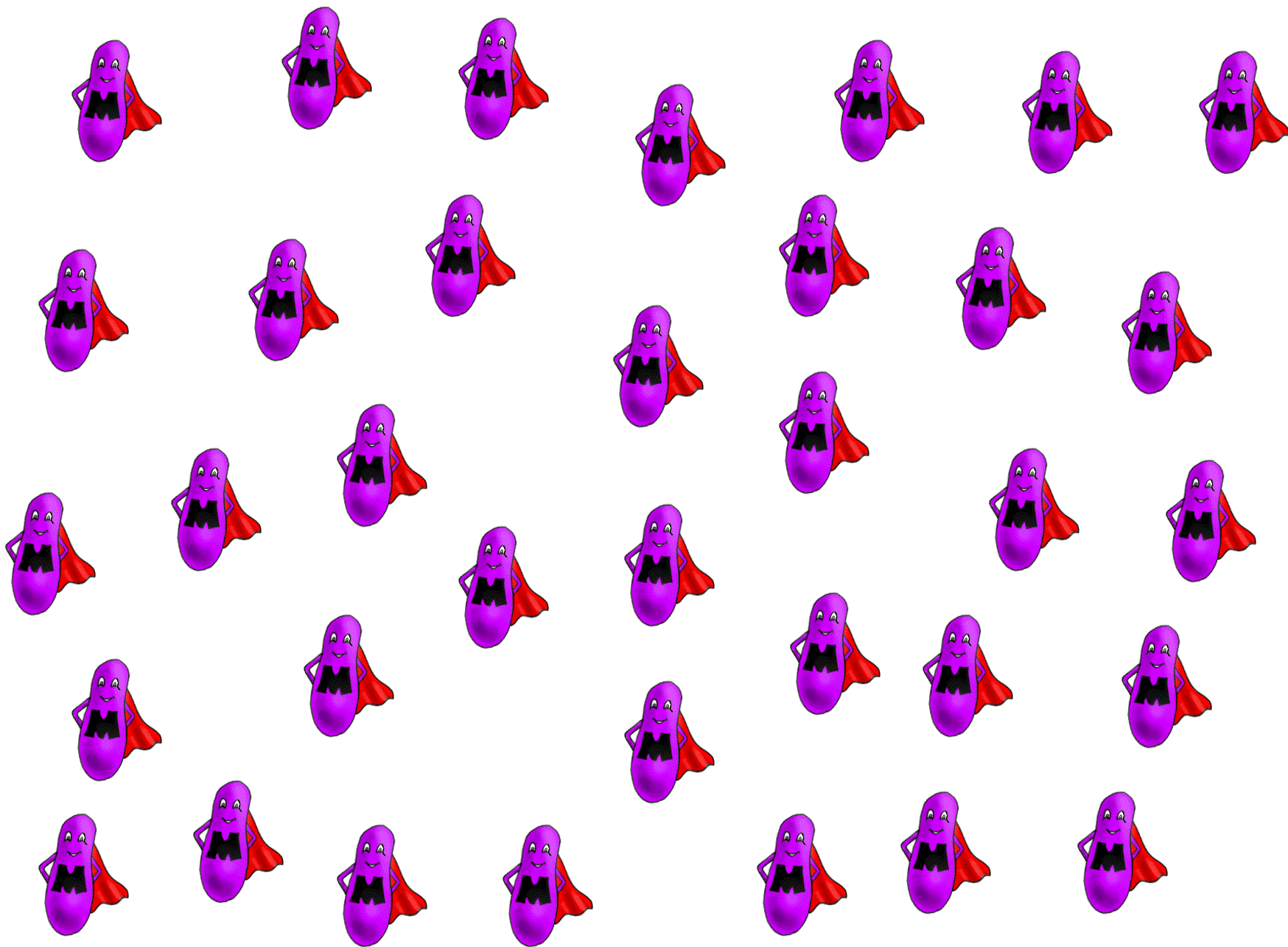
Mavi: ÇİD-TB

Direnç

- **Anti-tüberküloz ilacın kritik konsantrasyonunda, %1'den fazla üreme.**
- **%1'den fazla üreme gözleendiğinde, klinik yarar yok veya kısa sürede kaybolacak.**







Direnç Tanımları

- **İlacı dirençli olgu:** En az bir tüberküloz ilacına dirençli basille hastalanmış olgu
- **Çok ilacı dirençli tüberküloz (ÇİD-TB)**
(Multiple drug resistance; MDR-TB):
Hem izoniazid hem de rifampine dirençli olgu
(başka ilacı direnç de eklenebilir)
- **Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (YİD-TB)**
(Extensive drug resistance; XDR-TB): İzoniazid-rifampin direncine ek olarak bir kinolon ve bir enjeksiyonla kullanılan ilacı (amikasin, kapreomisin, kanamisin) dirençli olgu
- .

***M. tuberculosis*'te İlaç Direncine Neden Olan Faktörler**



- **Hücre duvarındaki mikolik asitler**
- **Yüksek mutasyon hızı**
- **Tedavide uygun kombinasyon, uygun süre, uygun dozda ilaç verilmemesi**
- **Hasta uyumsuzluğu**

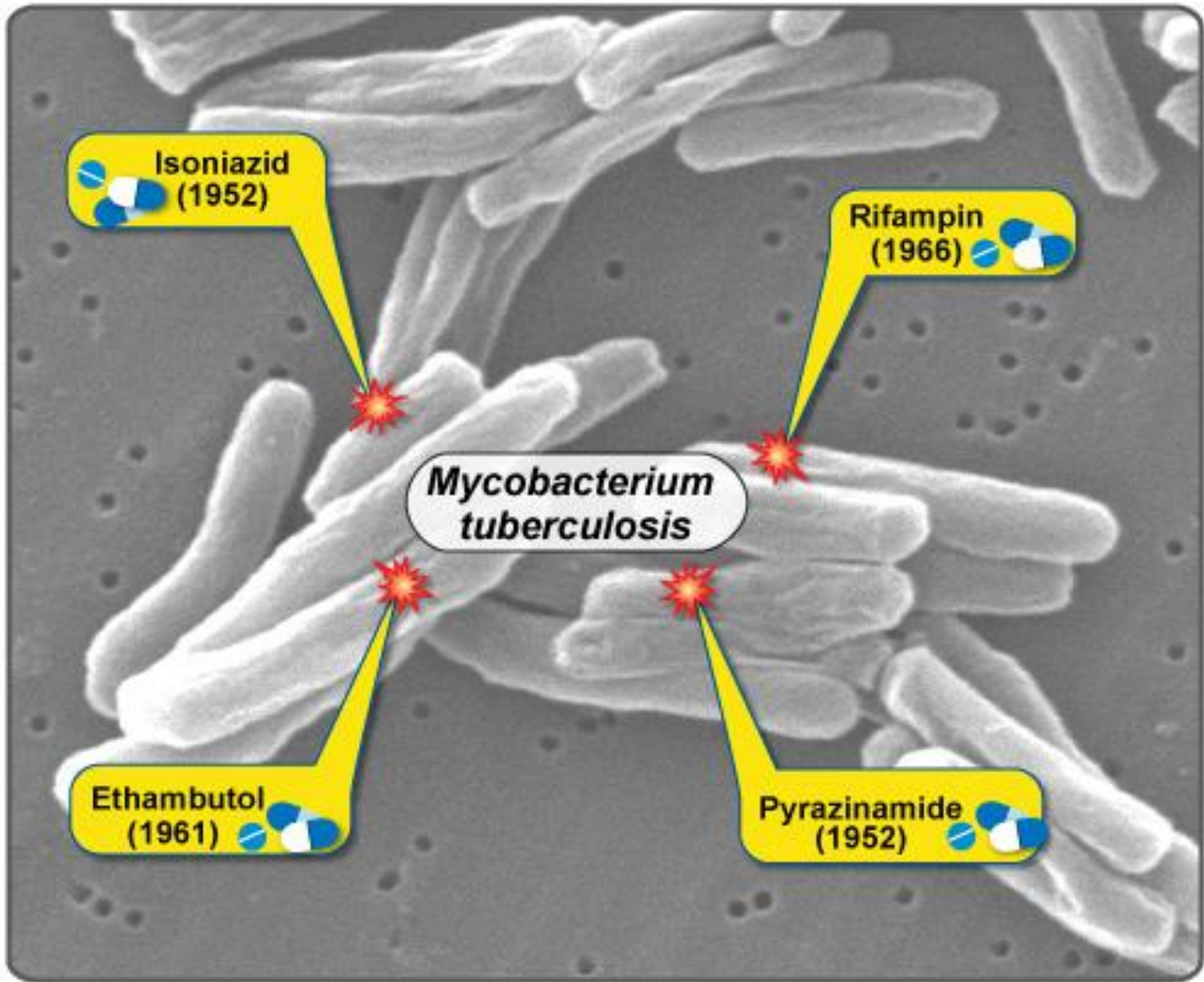
Isoniazid
(1952)

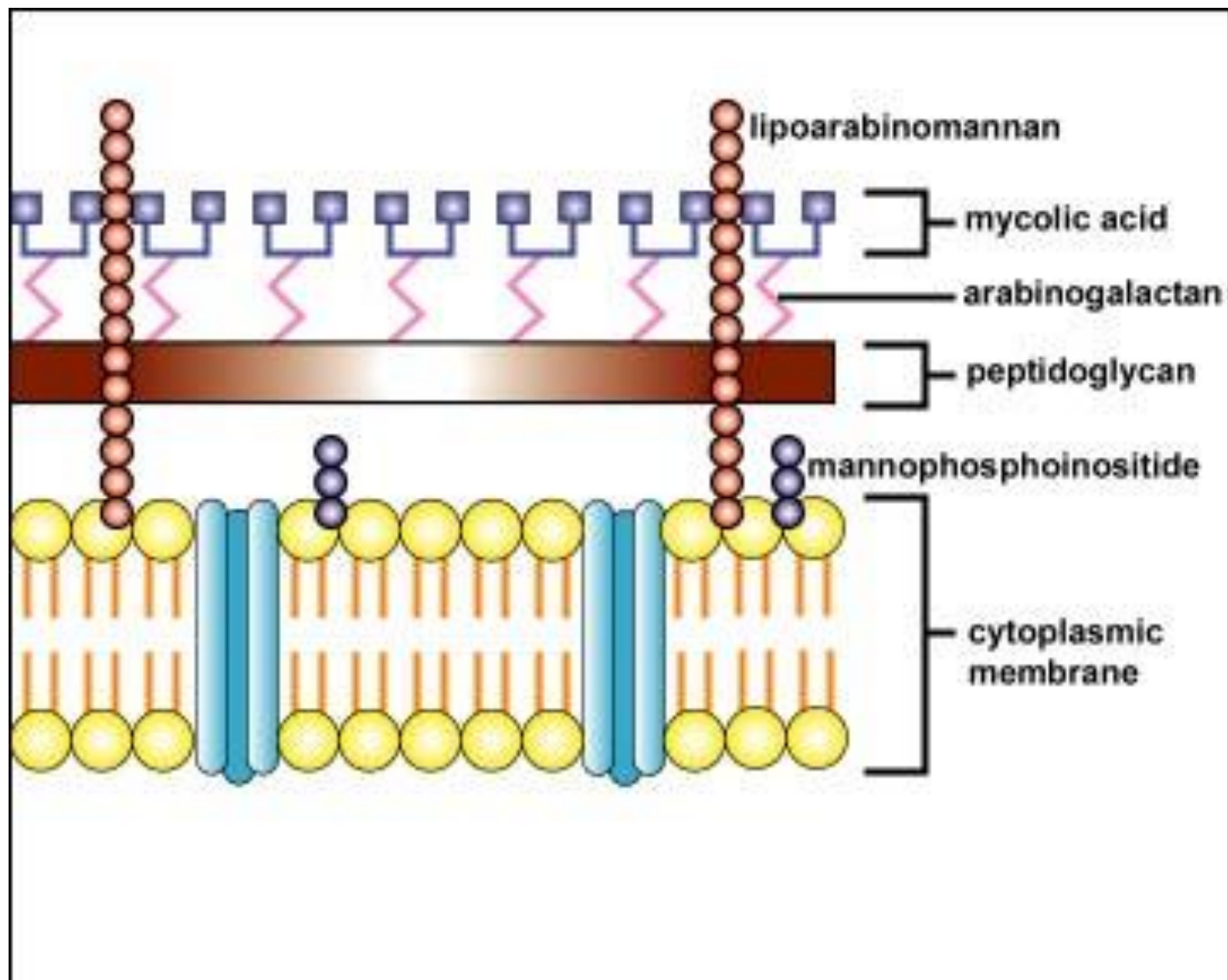
Rifampin
(1966)

***Mycobacterium
tuberculosis***

Ethambutol
(1961)

Pyrazinamide
(1952)





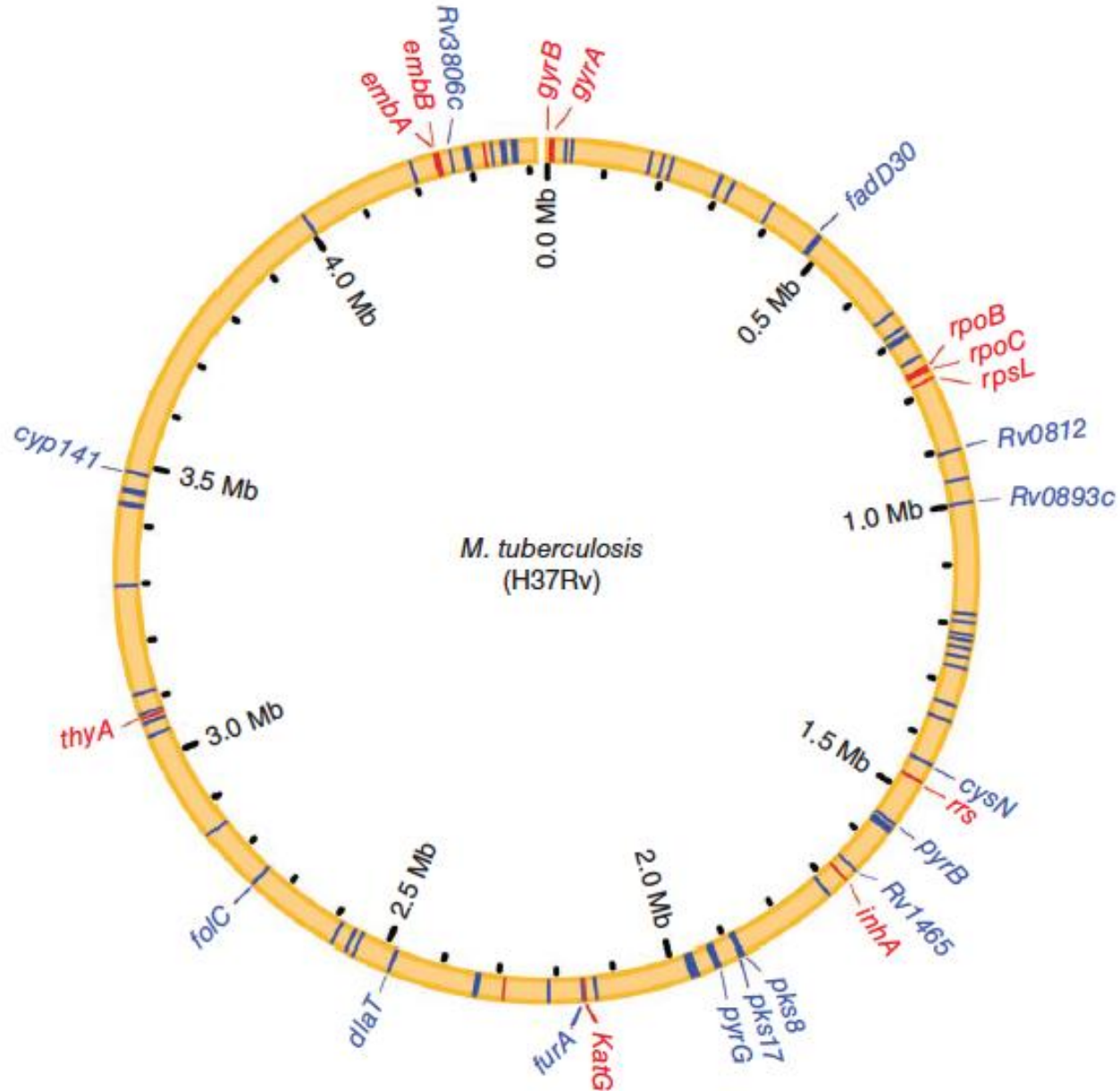
Antimikrobiyal Ajanlara Direnç Mekanizmaları:

- 1. Antimikrobiyal hedef veya reseptör değişimi**
- 2. Antimikrobiyal modifikasyon ve/veya tahribatı**
- 3. Antimikrobiyalin hedefe ulaşmasının engellenmesi:**
 - a. Hücre duvarındaki lipopolisakkarit tabakası nedeniyle geçirgenliğin az olması**
 - b. Dışa atım pompalarının antimikrobiyali hücre dışına atması**

M. tuberculosis'te İlaç Direnci

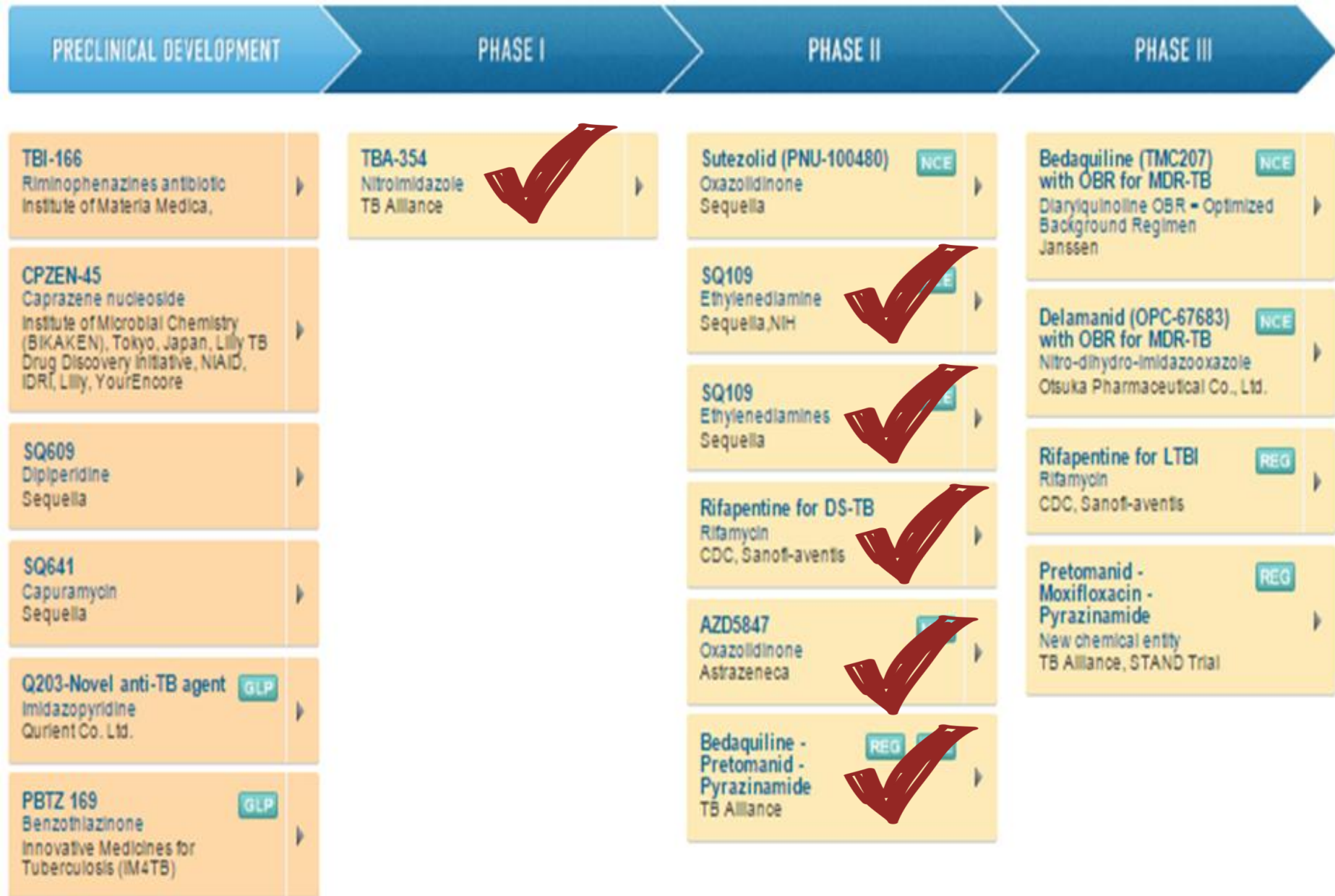
- ***M. tuberculosis*'te en sık gözlenen direnç mekanizması, antimikobakteriyel ilaçları aktive eden veya kendileri ilaç hedefi olan enzimlerde meydana gelen **mutasyon**lardır.**
- ***M. tuberculosis* ilaç direnci rastgele ve genellikle tek basamaklı bir mutasyon sonucunda oluşur.**
- **Mikobakterilerin, diğer bakterilerle kıyaslandığında, mutasyon hızları yaklaşık 10 kat daha yüksektir.**

İlaç direncine neden olan mutasyonların görüldüğü genler



Yeni ilaç çalışmaları...

CLINICAL DEVELOPMENT



Yeni ilaç çalışmaları...

PRECLINICAL DEVELOPMENT

PHASE I

PHASE II

PHASE III

TBI-166

Riminothienazoles antibiotic
Institute of Materia Medica,

CPZEN-45

Caprazene nucleoside
Institute of Microbial Chemistry
(BIKAKEN), Tokyo, Japan, Lilly TB
Drug Discovery Initiative, NIAID,
IDRI, Lilly, YourEncore

SQ609

Dipiperidine
Sequella

SQ641

Capuramycin
Sequella

Q203-Novel anti-TB agent

Imidazopyridine
Quriat Co. Ltd.

PBTZ 169

Benzothiazinone
Innovative Medicines for
Tuberculosis (IM4TB)

TBA-354

Nitroimidazole
TB Alliance

Sutezolid (PNU-100480)

Oxazolidinone
Sequella

SQ109

Ethylenediamine
Sequella, NIH

SQ109

Ethylenediamines
Sequella

Rifapentine for DS-TB

Rifamycin
CDC, Sanofi-aventis

AZD5847

Oxazolidinone
Astrazeneca

Bedaquiline -
Pretomanid -
Pyrazinamide
TB Alliance

NCE

NCE

NCE

NCE

REG

NCE

Bedaquiline (TMC207)

with OBR for MDR-TB
Disrupts mycobacterial
Background: Resistant
Janssen

Delamanid (OPC-67683)

with OBR for MDR-TB
Nitro-dihydro-imidazo[4,5-b]pyridine
Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

Rifapentine for LTBI

Rifamycin
CDC, Sanofi-aventis

Pretomanid -

Moxifloxacin -

Pyrazinamide

New chemical entity
TB Alliance, STAND Trial

NCE

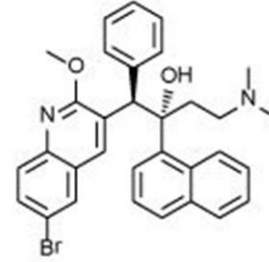
NCE

REG

REG

APPROVED

Bedaquiline (TMC 207)



TMC207
(Bedaquiline)

© **Diarilkinolin**

© **ÇİD-TB tedavisinde**

© **Yeni bir etki mekanizması:**

© **ATP sentaz proton pompası inhibitörü**

© **Güçlü bakterisidal & sterilizan etki**

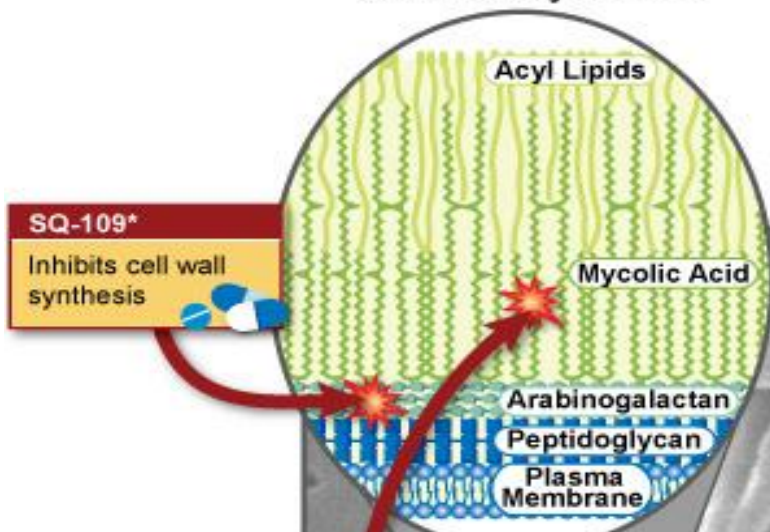
© **Mycobacterium ATP sentaz'ına → >20 kat seçicilik**

© **Çoğalan=Etki=Latent**

© **Farelerde → uygun doku dağılımı & uzun yarı ömür**

© **Tüm yararları bilinmiyor**

Cell Wall Synthesis



SQ-109*

Inhibits cell wall synthesis

Nitroimidazoles
(E.g. PA-824*, OPC 67683)

Novel, complex mechanisms of action
Inhibit cell wall synthesis
AND
Inhibit cell respiration

Mycolic Acid

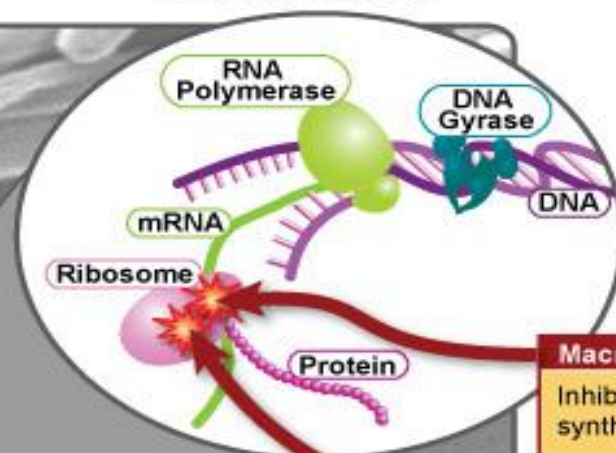
Arabinogalactan

Peptidoglycan

Plasma Membrane

Mycobacterium tuberculosis

DNA Coiling, Transcription, and Translation



RNA Polymerase

DNA Gyrase

DNA

mRNA

Ribosome

Protein

Macrolides

Inhibit protein synthesis

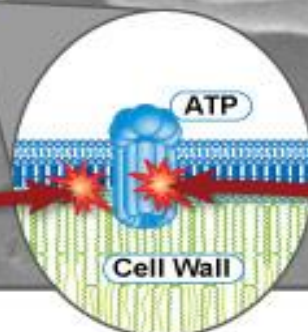
Oxazolidinones

Inhibit protein synthesis

Pyrroles

Mechanism of action uncertain

ATP Synthesis



ATP

Cell Wall

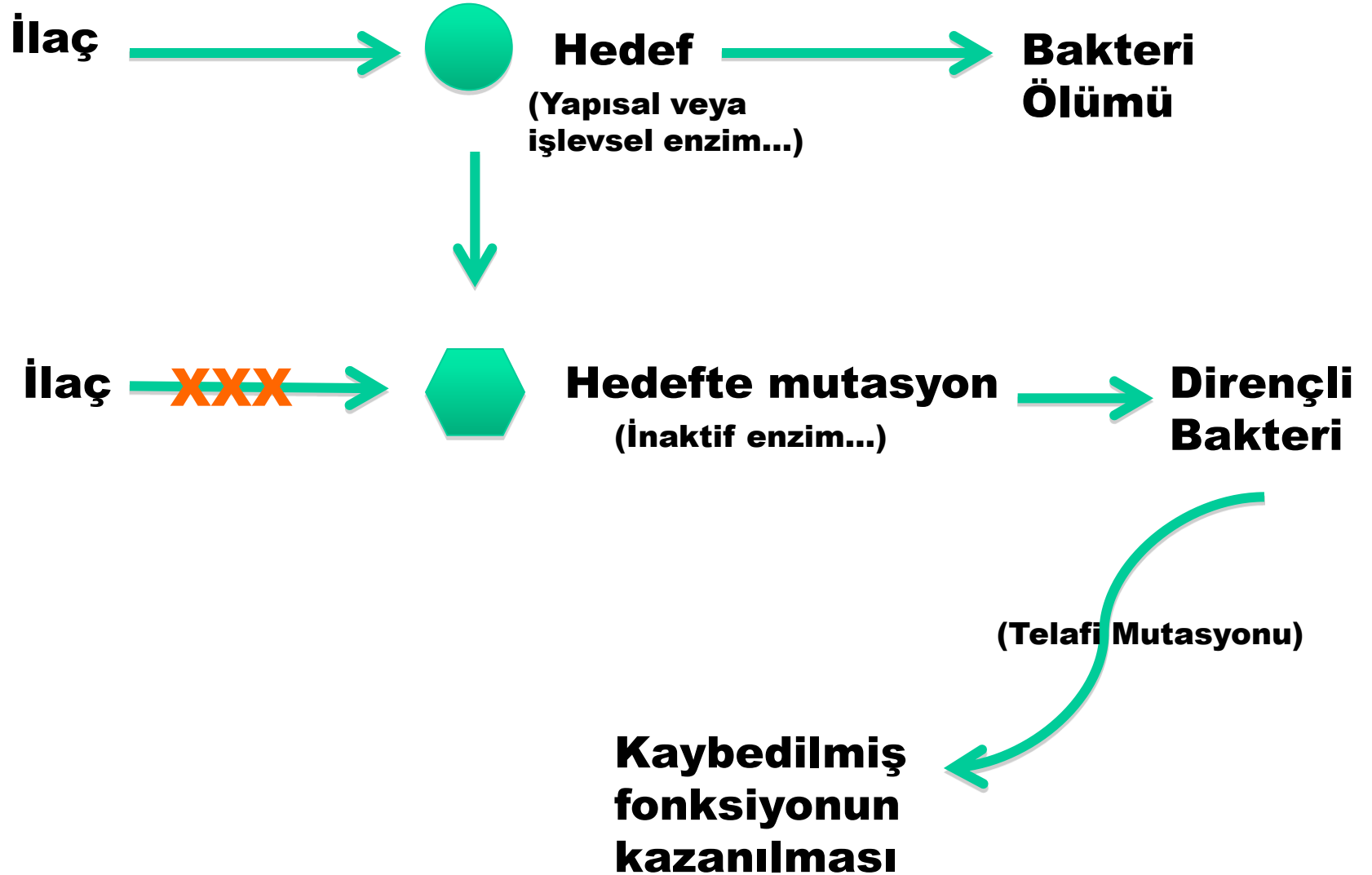
Diarylquinoline
(TMC 207)

Inhibits ATP synthase

Bir Bakterinin Başarı Ölçütleri

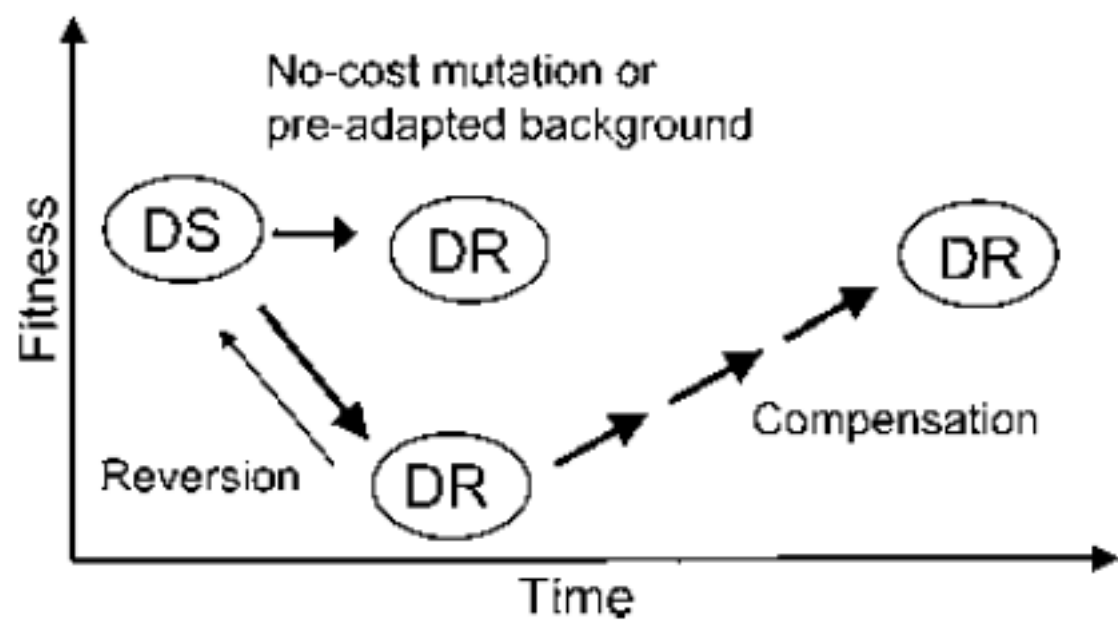
- **Farklı ortamlarda canlı kalabilmesi ve çoğalabilmesi**
- **Duyarlı diğer konaklara yayılabilmesi.**
- **Bu faaliyetlerin gerçekleştirilebilmesi, bakterinin bölünme hızının optimal bir düzeyde tutulabilmesiyle ilişkilidir. Bu nedenle bir bakterinin bölünme zamanı, **zindelik (fitness)** ölçütü olarak alınabilir.**

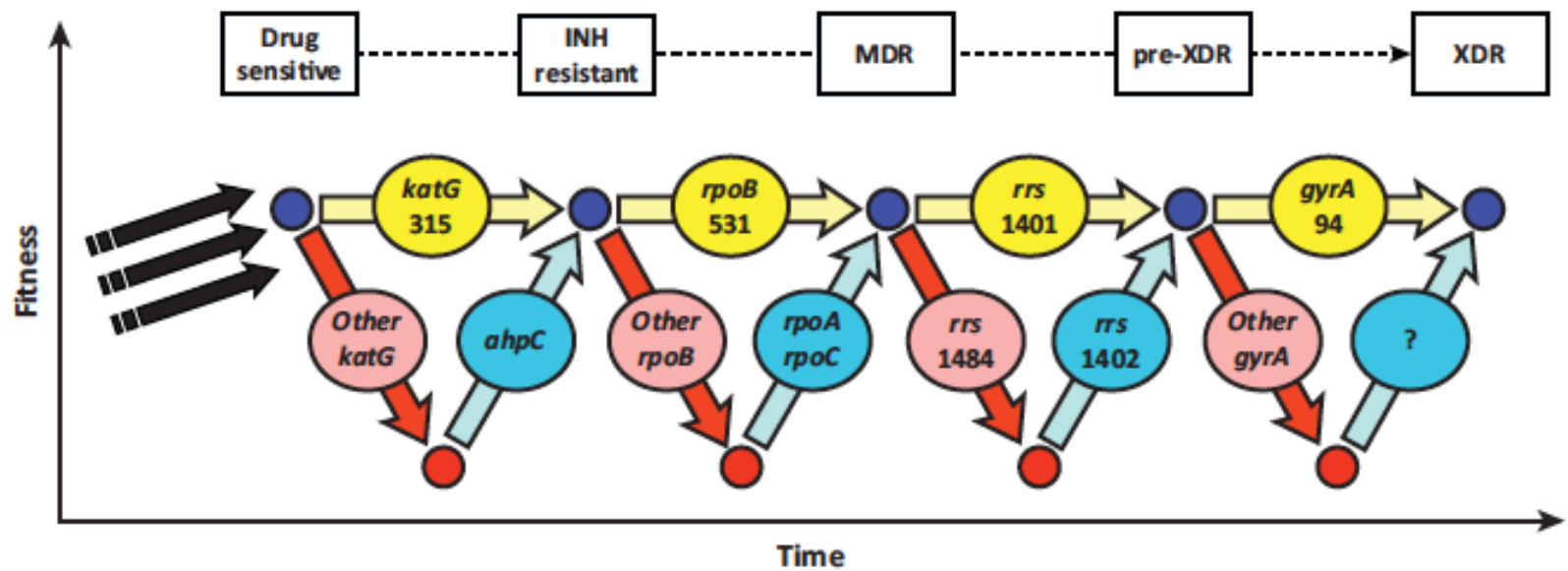
M. tuberculosis'te İlaç Direnci Sonrası Zindelik (Fitness)



Zindeliği geri kazanmak için telafi mutasyonları

- **Dirence neden olan bir mutasyon, aslında bakteriye bir bedel ödetir.**
- **Ancak bakteriler, bu bedelin sonucu olan olumsuz koşulları yenebilmek için farklı telafi mekanizmalarına sahiptirler.**
- **Bu **telafi mekanizmaları**, kazanılmış olan antimikrobiyal direnç mekanizmasına zarar vermeden, oluşan olumsuz koşulu ortadan kaldıracılabilmektedir.**
- **Bir bakteri popölasyonunda dirençli bir suşun baskın hale gelmesi, minimal düzeyde bir bedel ödediğini gösterir ve bu bakteri popölasyonu konaktan konağa yayılım gösterebilir.**

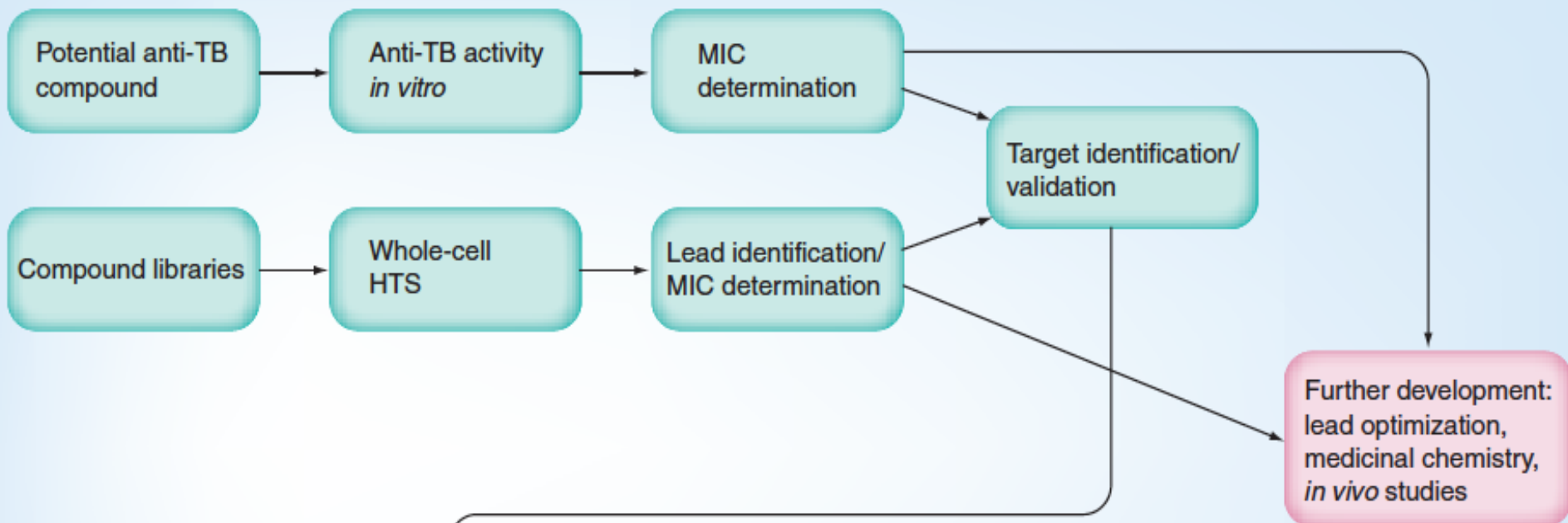




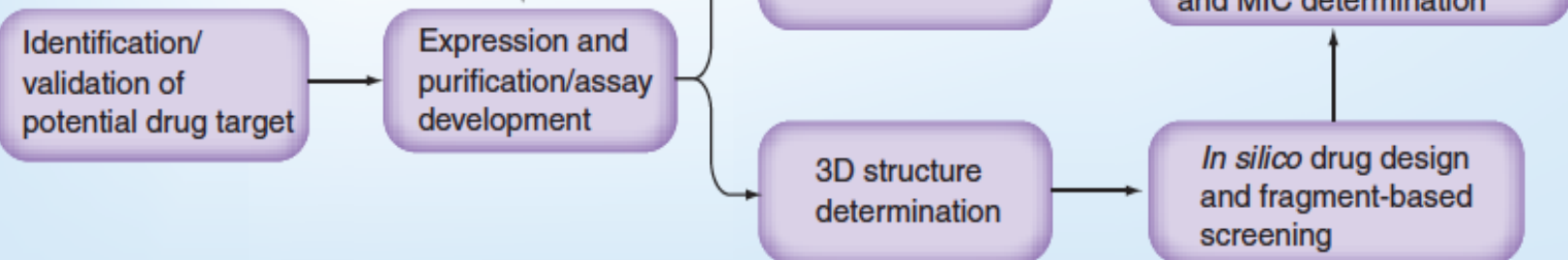
TRENDS in Genetics

Müller B, et al. The heterogenous evolution of multidrug-resistant *M. tuberculosis*. Trends in Genetics 2013; 29:160-169.

From drug to target



From target to drug



Rifampisin Dirençli İzolatlarda in vivo Telafi Mutasyonları Gelişimi

- **Laboratuvar şartlarında üretilen rifampisin-dirençli suşlar kullanılarak farelerde tüberküloz oluşturuldu.**
- **Farelerden 14, 28, 56, 96 ve 126. günlerde alınan örnekler kültürde üretildi.**
- **Üreyen koloniler seçilerek dizi analizi uygulandı.**
- **Elde edilen diziler, başlangıç dizileriyle karşılaştırılarak telafi mutasyonlarının varlığı araştırıldı.**

Rifampisin Dirençli İzolatlarda in vivo Telafi Mutasyonları Gelişimi

- **Hipotez-1:** Laboratuvar şartlarında oluşturulan rifampisin-dirençli suşlarda, başlangıçta telafi mutasyonları yoktur.
- **Doğrulama-1:** Dizi analizi sonucunda saptanan mutasyonlar, rpoB geninin 81 baz çiftlik RRDR bölgesinde gözlenen ve dirence neden olduğu bilinen mutasyonlar oldu.

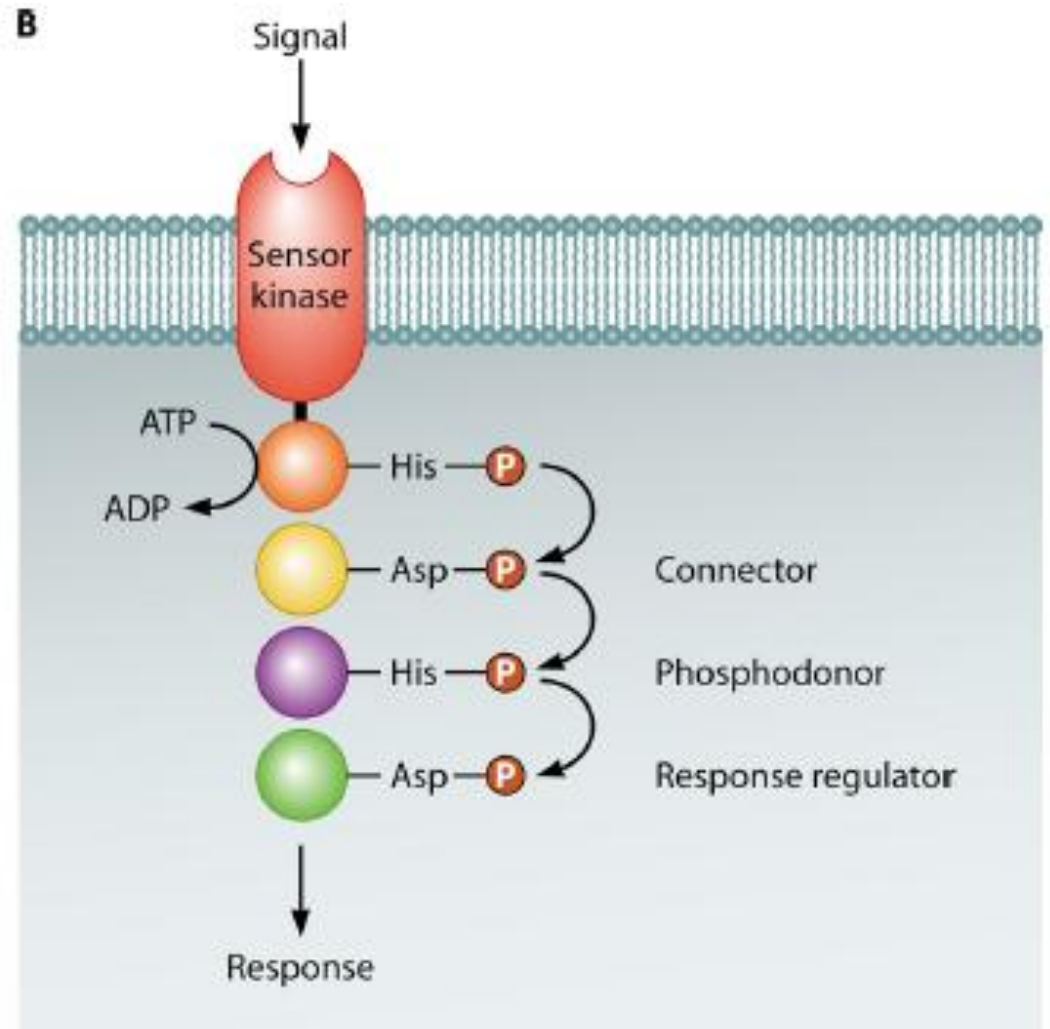
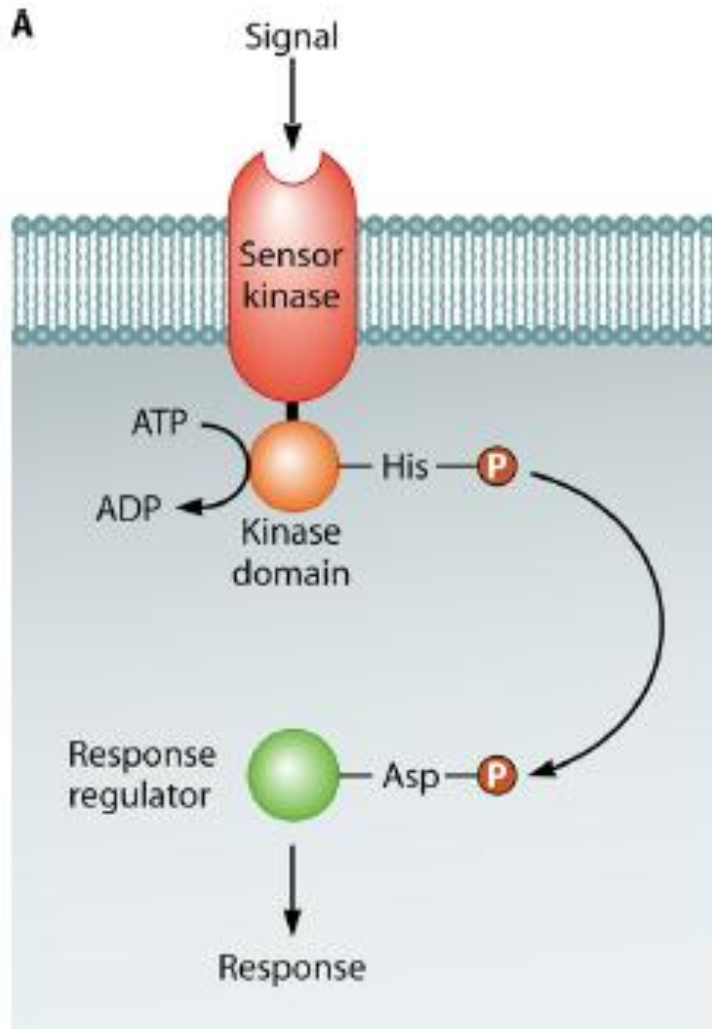
rpoA, rpoB ve rpoC genlerinde başka bir mutasyon saptanmadı.

Rifampisin Dirençli İzolatlarda in vivo Telafi Mutasyonları Gelişimi

- **Hipotez-2:** Laboratuvar şartlarında oluşturulan rifampisin-dirençli suşlar, in vivo ortamda bir süre sonra telafi mutasyonları geliştirirler.
- **Doğrulama-2:** Dizi analizi sonucunda, telafi mutasyonlarının oluştuğu gözlemlendi.

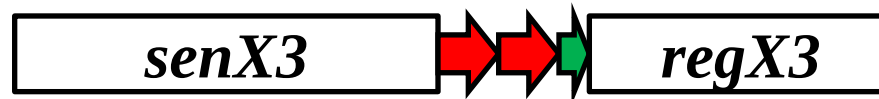
İki Parçalı Düzenleyici Sistemler

- **Algılayıcı (sensor; histidin kinaz):** özgül bir uyarıya cevap verir.
- **Düzenleyici (regulator):** belirli genlerin ekspresyonunu kontrol eder.
- **Algılayıcı protein uyarım sonrasında otofosforilizasyona uğrar ve sonrasında bu fosfat, düzenleyici proteine transfer edilir.**
- **Düzenleyici, DNA bağlayan bir proteindir ve gen ekspresyonunu arttırabilir veya azaltabilir.**

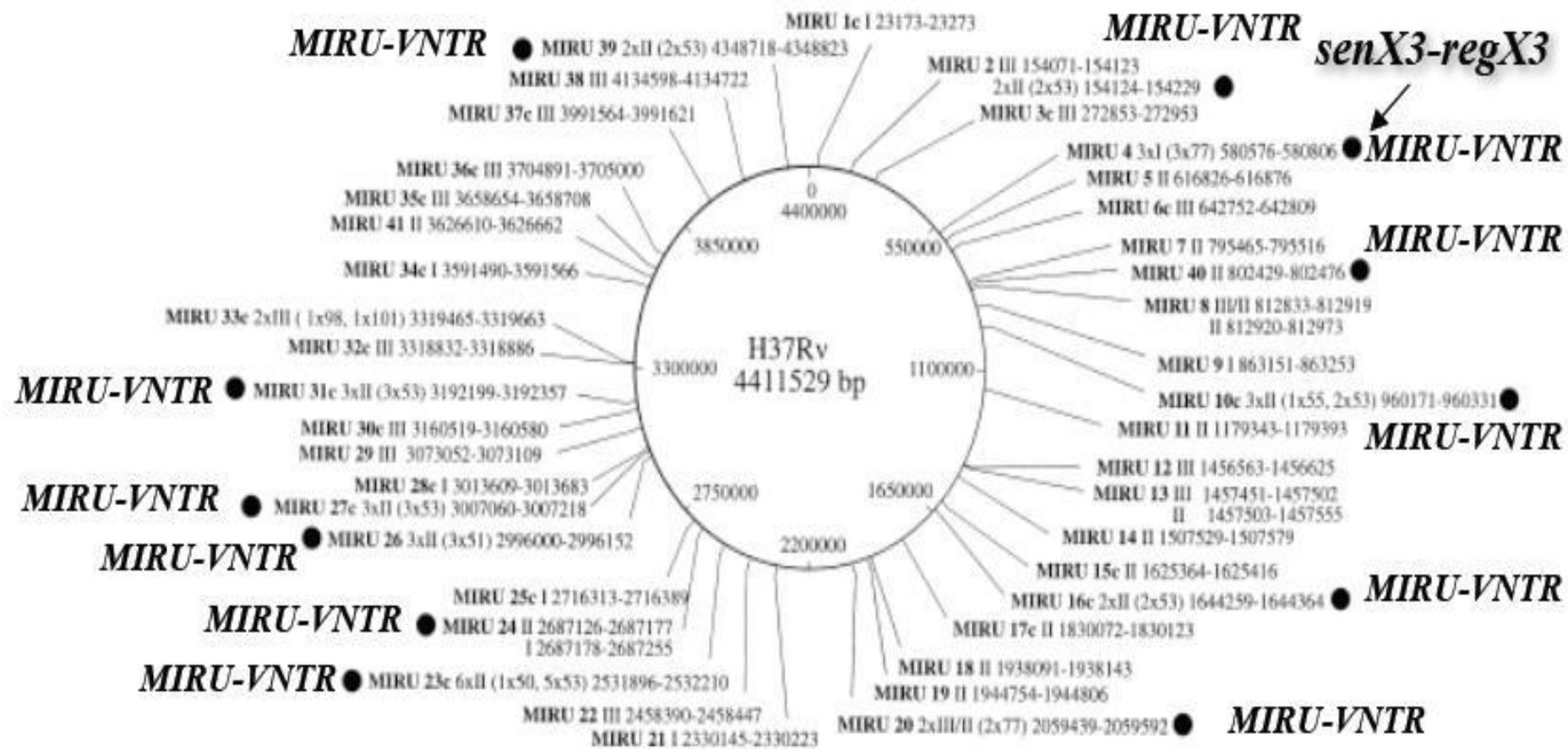


senX3-regX3 :
***M. tuberculosis'te* iki parçalı bir
düzenleyici sistem**

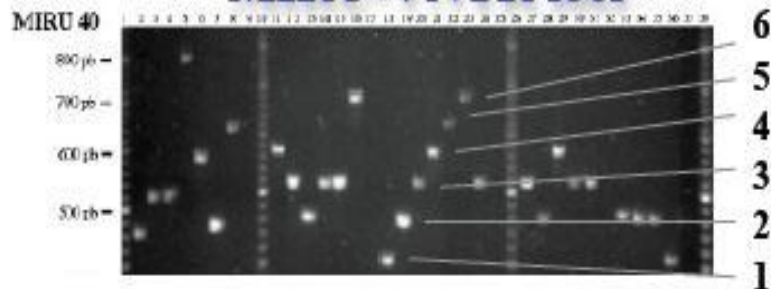
- **senX3: algılayıcı kinaz**
- **regX3: düzenleyici**
- **Bu iki gen birbirinden, üç adet MIRU (mycobacterial interspersed repeat unit) içeren bir dizi ile ayrılır.**



Mycobacterial interspersed repetitive units in the *M. tuberculosis* genome



MIRU-VNTR loci

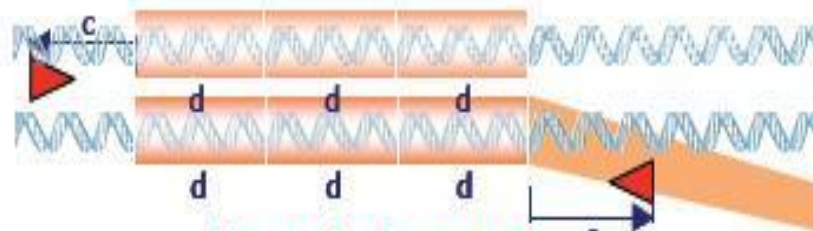


- MIRUs: interspersed repetitive elements
- MIRU-VNTRs: polymorphic MIRU loci
- Repeat unit sizes 50-100 bp: minisatellites

MIRU-VNTR

Supply, Mol Microbiol, 2000

(Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit
- Variable Number of Tandem Repeat)

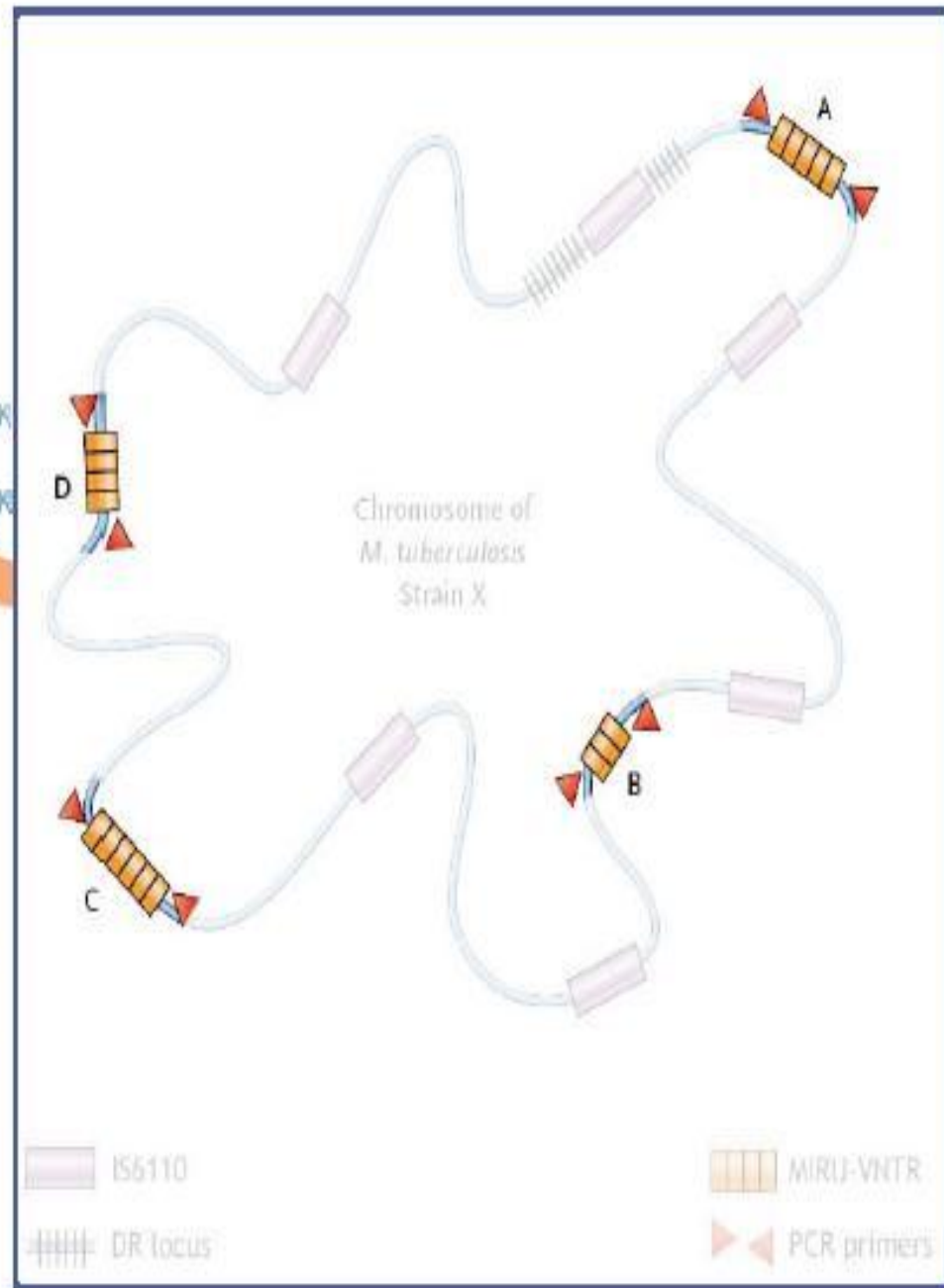


Numerical genotype
Comparison with Excel® or Bionumerics®

MIRU-VNTR

Isolats	4	10	16	26	31	40	0424	0577	1955	1982	2163b	2165	2401	3690	4052	4156
BCG	3'	2	3	5	3	2	0	6	1	3	3	5	2	2	5	0
H37Rv	3'	3	2	3	3	1	2	4	2	5	5	3	2	5	5	2

- Comparable to micro- and minisat gt
- First bacterial VNTR system
- Increasingly used for other bacteria

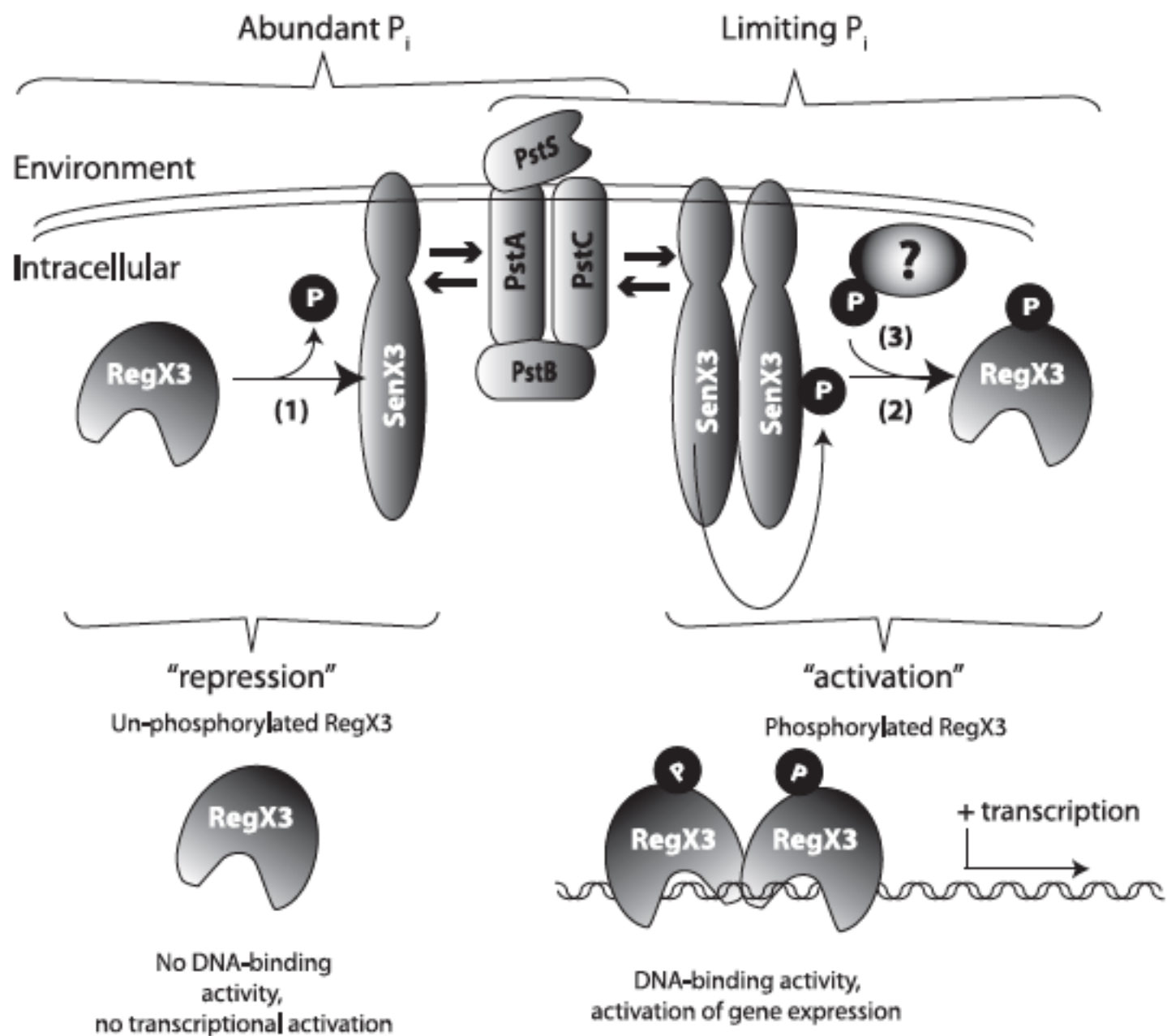


Adapted from Barnes, N Engl J Med, 2003

senX3-regX3 :
M. tuberculosis'te iki parçalı bir
düzenleyici sistem

- **senX3-regX3 düzenleyici sistemi fosfat-bağımlı gen ekspresyonunu düzenler.**
- **Fosfatın hücre içine transportu mikobakterilerin üremesi için gereklidir ve ortamdaki inorganik Pi konsantrasyonu ile düzenlenir.**

Thayil S, Morrison N, Schechter N, Rubin H, Karakousis P. PLoS One 2011, 6 (11): e28076. doi:10.1371/journal.pone.0028076



“regX-3 geninin aşırı derecede ekspresyonu ve sonuçları”

Amaç:

- regX3 regulonunun stres şartlarındaki davranışının araştırılması**
- regX3 geninin bir ilaç hedefi olup olamayacağının anlaşılması**

regX-3 geninin klonlanması

Yöntemler:

- **E. coli tetrasiklin vektörünün higromisin içeren LB sıvı besiyerinde üretilmesi**
- **Plazmid saflaştırılması ve plazmid vektörünün restriksiyonu**
- **regX3 geninin PCR ile çoğaltılması ve jelden DNA izolasyonu**
- **DNA saflaştırılması**
- **T4 ligaz enzimi ile plazmid vektörüne ligasyon**
- **E. coli genomuna entegrasyon ve LB besiyerine ekim**

regX-3 geninin klonlanması

...Yöntemler:

- **Oluşan kolonilerin LB sıvı besiyerine pasajı ve inkübasyonu**
- **Transformasyon: LB katı besiyerine ekim ve inkübasyon sonrasında DNA saflaştırılması**
- **Doğrulama amacıyla DNA dizi analizi**
- **İzole edilen plazmidin açığa çıkarılması**
- **Plazmidin M. tuberculosis CDC 1551 suşuna elektroporasyon yoluyla entegre edilmesi**

regX-3 geninin aşırı derecede ekspresyonu

- **Bakterilerin OD 1.0'e kadar inkübasyonu**
- **1 ml bakterinin 10 ml 7H9 besiyerine pasajlanması**
- **OD 1.0 olduğunda, OD 0.01'e sulandırım ve a. tetrasiklin eklenmesi (250 ng/ml)**
- **OD tekrar 1.0 olduğunda, OD 0.1'e sulandırım ve a. tetrasiklin eklenmesi (250 ng/ml)**
- **OD 0.5'te bakterilerin toplanması ve RNA izolasyonu.**

regX-3 geninin aşırı derecede ekspresyonu

Bakterilerin üretildiği besiyerleri:

- 1.%0.05 Tween 80 içeren PBS (besinsiz ortam)**
- 2.Fosfat (Pi) içermeyen 7H9 besiyeri (0-Pi besiyeri)**
- 3.50 μ M Pi içeren 7H9 besiyeri**
- 4.25 mM Pi içeren 7H9 besiyeri**

➤Her besiyeri, gen ekspresyonunun arttırılması amacıyla a. tetracycline (250 ng/ml) içermekteydi.

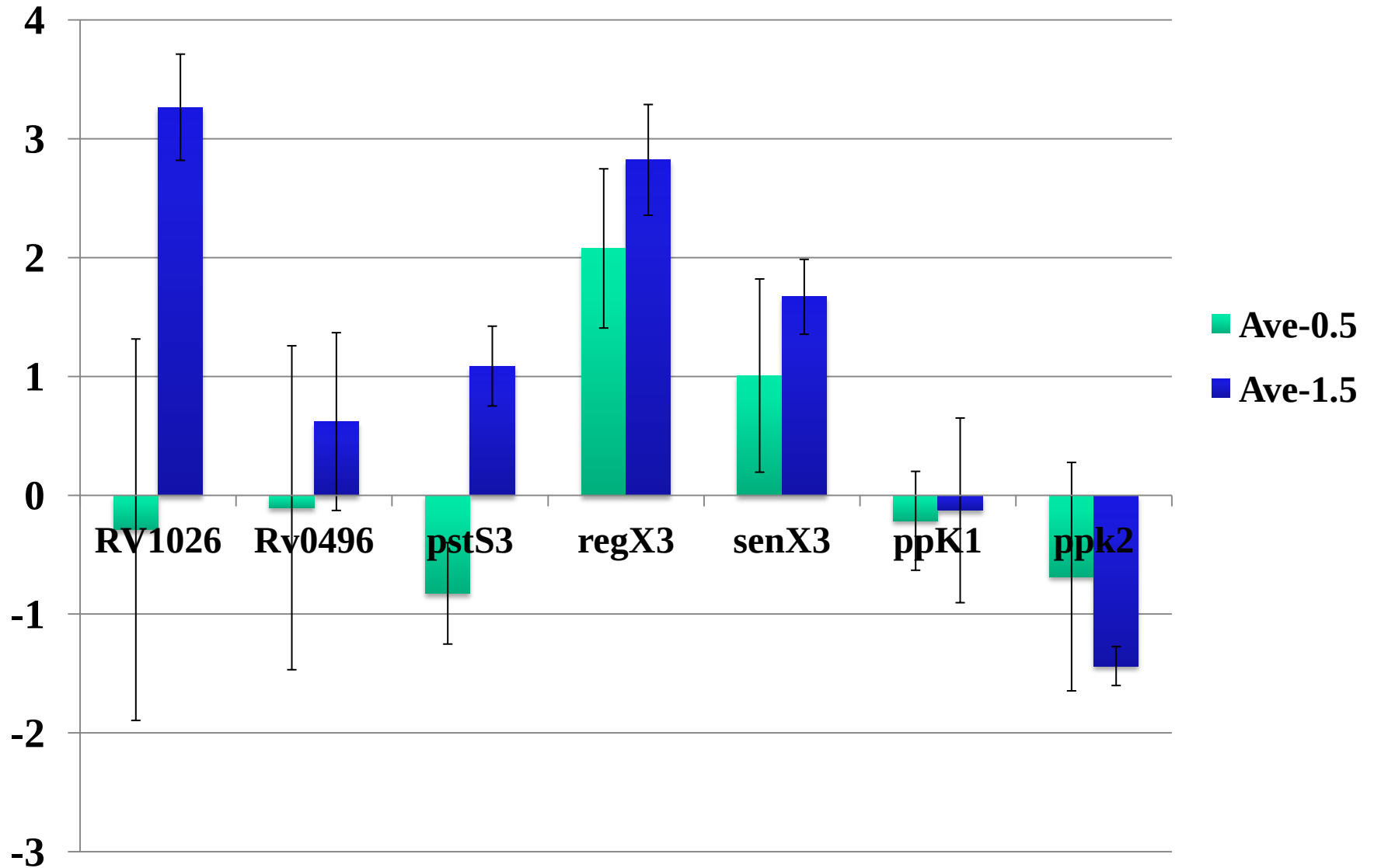
regX-3 geninin aşırı derecede ekspresyonu

- **RNA izolasyonu**
- **DNA uzaklaştırılması**
- **DNA yokluğunun doğrulanması amacıyla PCR**
- **Saf RNA'dan cDNA sentezi**
- **Gen-özel primerler kullanarak **kantitatif PCR****

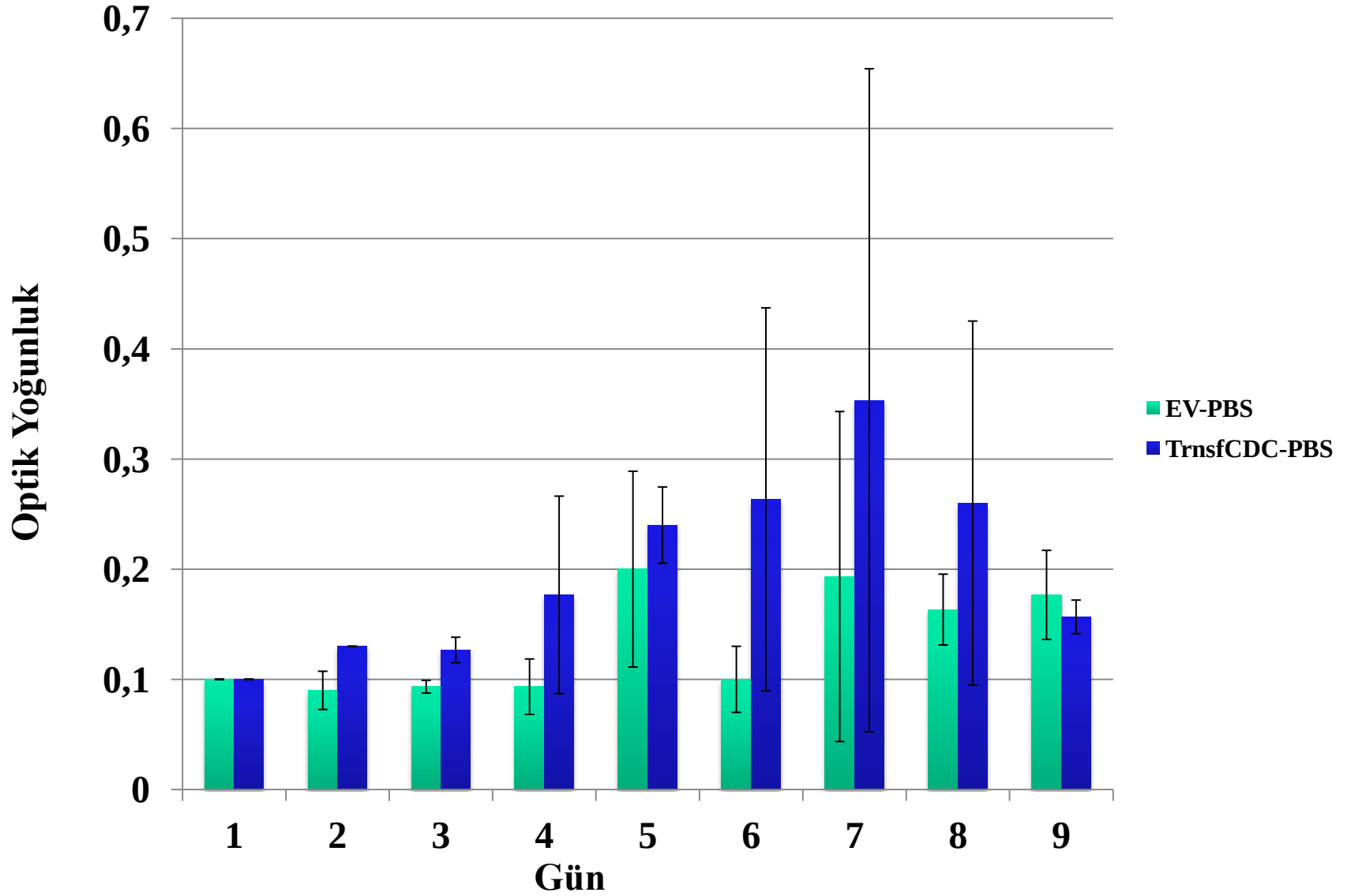
Ekspresyonu test edilen genler:

- ***regX3***
 - ***senX3***
 - ***pstS3***
 - ***ppx1 (rv1026)***
 - ***ppx2 (rv0496)***
 - ***ppk1***
 - ***ppk2***
-
- **İnternal kontrol: sigA ‘housekeeping’ geni**

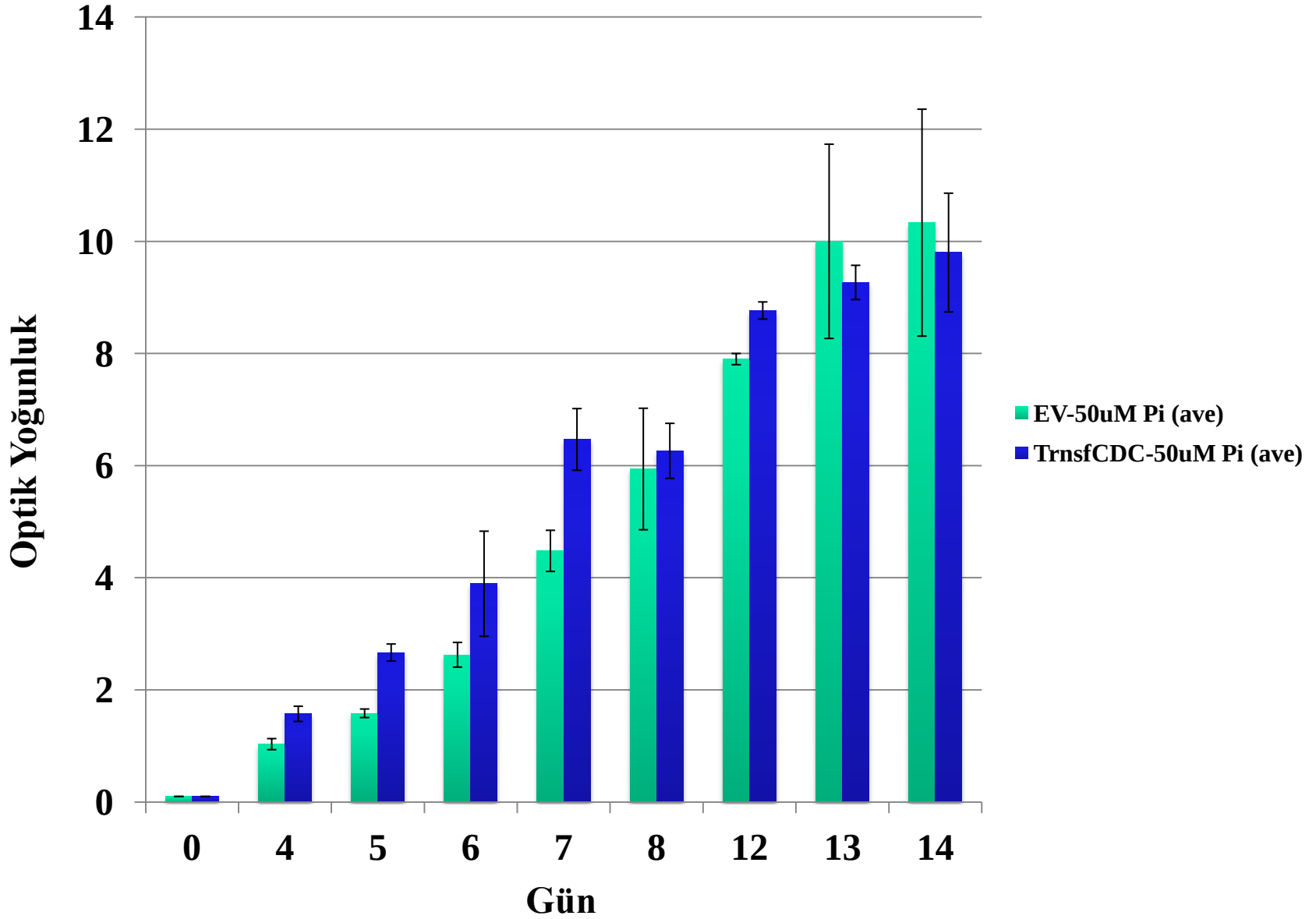
İki farklı zamanda gen ekspresyonları (kontrolle kıyaslandıktan sonra normalize edilmiş değerler)



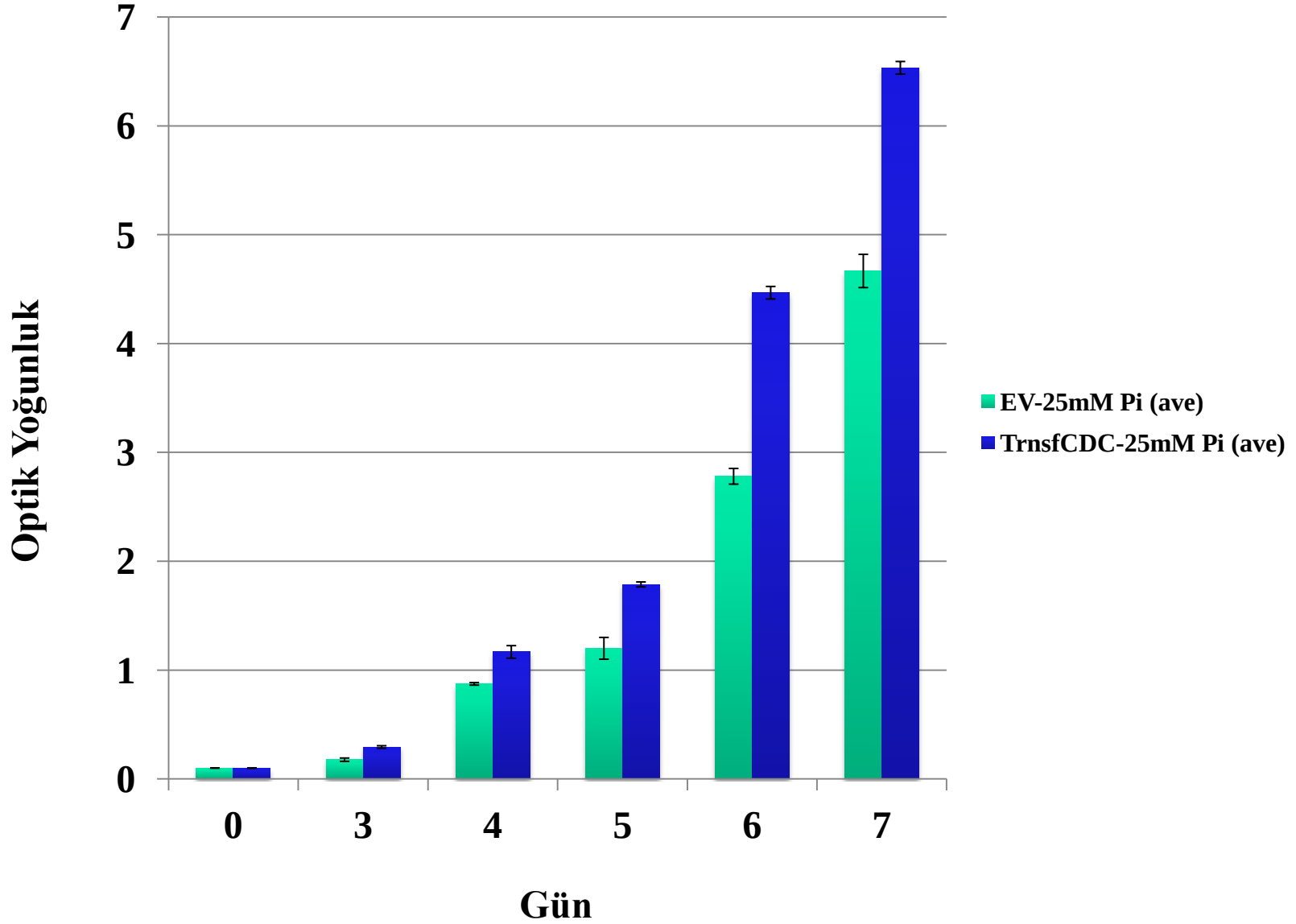
%0.05 Tween 80 içeren PBS'te Optik Yoğunluklar



50µM Pi Besiyerinde Optik Yoğunluklar



25mM Pi Besiyerinde Optik Yoğunluklar



Optik Yoğunluk Ölçümlerinin Sonuçları:

- **İlk 7 günde, aşırı eksprese edilmiş regX3 geni taşıyan M. tuberculosis optik yoğunlukları daha yüksek bulundu ve daha hızlı üredikleri saptandı.**
- **Bu veriler, regX3 geninin fonksiyonel bir gen olduğunu göstermektedir.**

Dışa Atım Pompaları (Efflux Pumps)

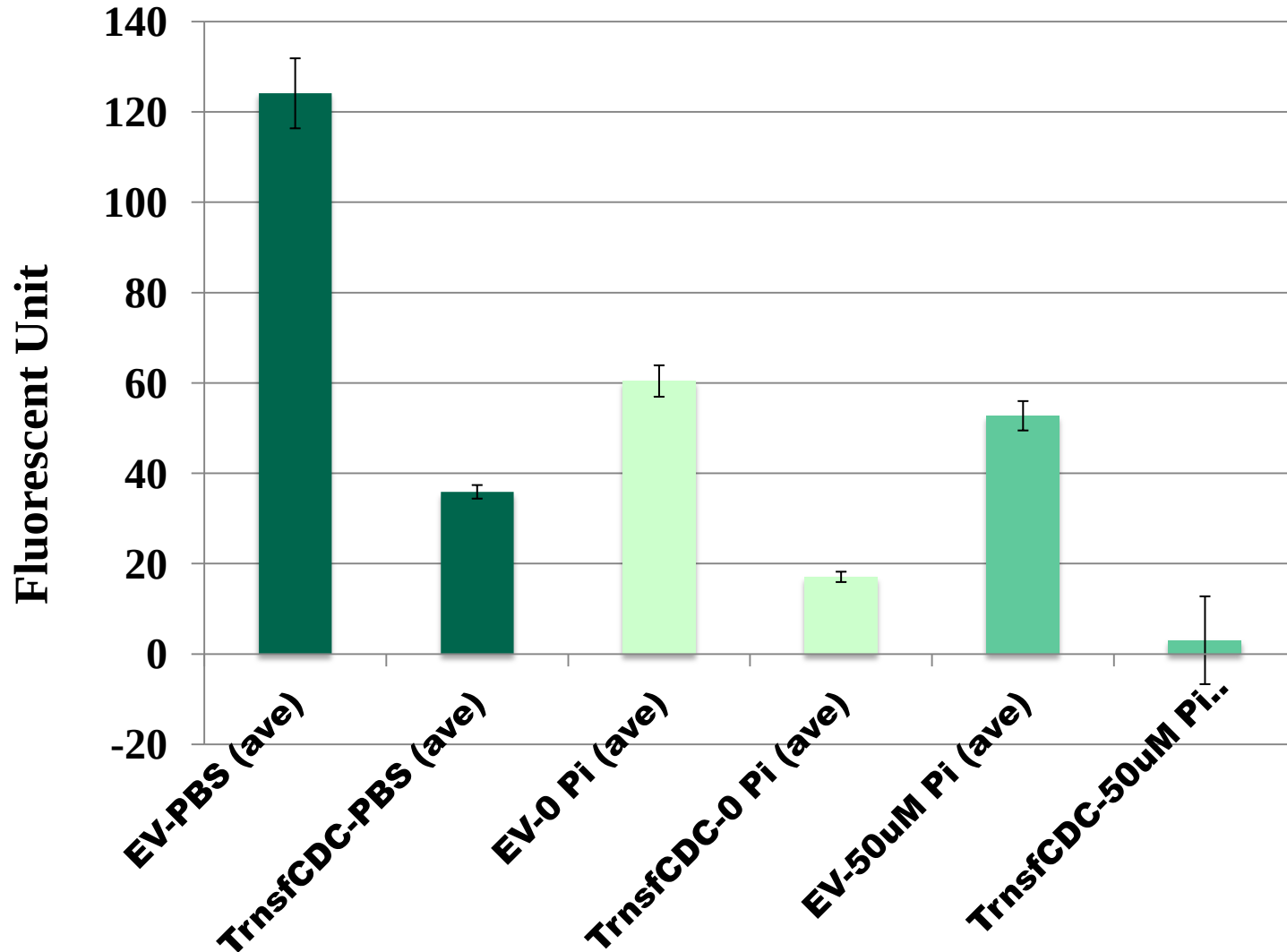
- **Dışa atım pompaları bakteriyi korumak amacıyla, hücre içine giren düşük yüklü toksik molekülleri sitoplazma dışına atar.**
- **Etidyum bromür hücre içine girip nükleik asitlere bağlandığında floresan ışıma yapan hücre-içi bir boyadır.**

Akım Sitometrisi (Flow Cytometry) Analizi

regX3 geninin aşırı ekspresyonu ile dışa atım pompası fonksiyonu arasındaki ilişki:

- **0.5 ml etidyum bromür (2 µg/ml) ve 0.5 ml *M. tuberculosis* (OD 0.5) bir FACS tüpünde karıştırıldı. (FACScalibur fluorescence activated cell sorter, Becton Dickinson);
software: Cell Quest version 7.5.3.**
- **Her suş için:**
 - **1 kontrol (etidyum bromürsüz)**
 - **3 örnek**

Hemen ölçülen değerler (PBS, 0 μ M Pi ve 50mM Pi)



Dışa Atım Pompası Analizlerinin Sonuçları:

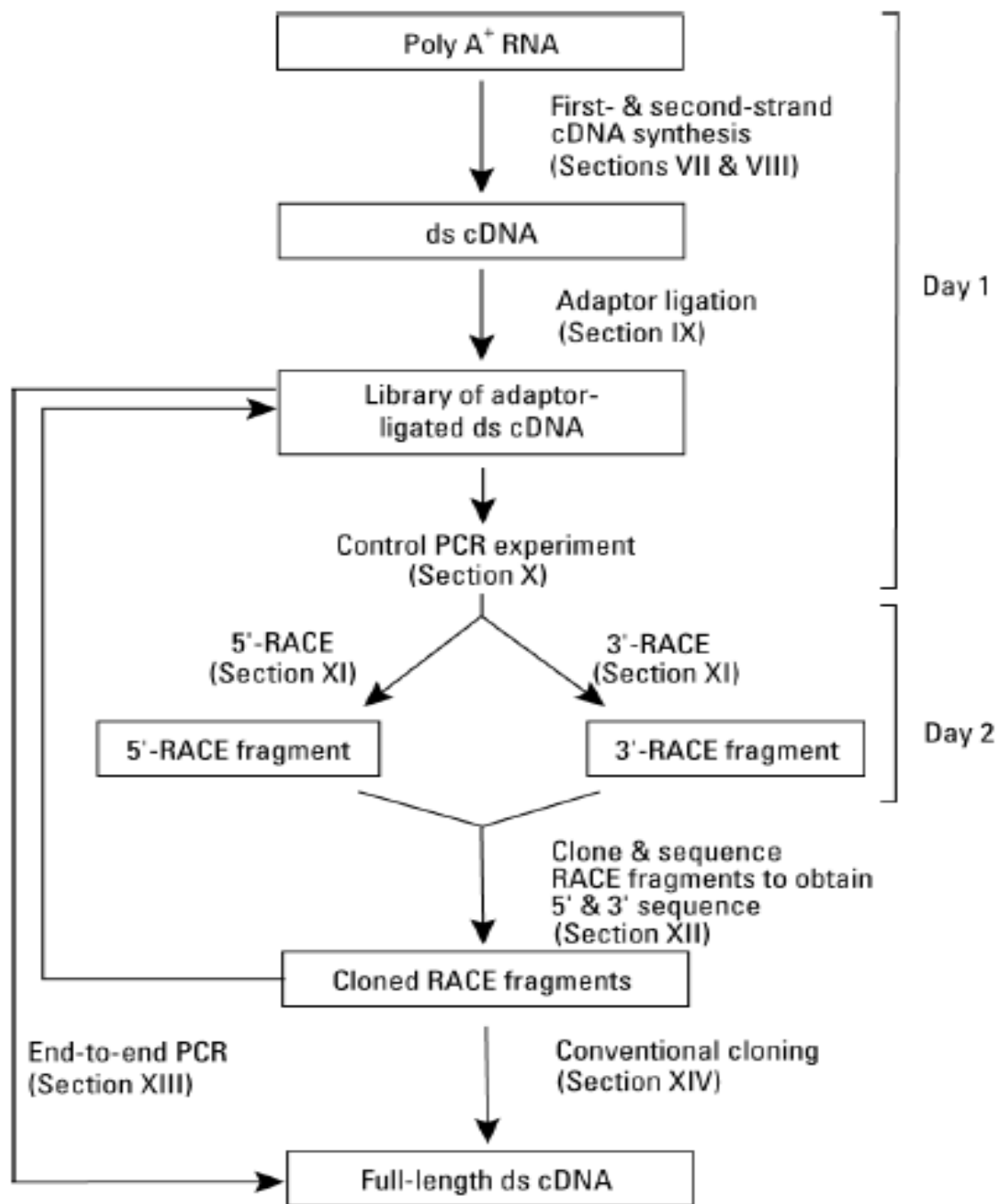
- **Aşırı regX3 ekspresyonu olan suşlardaki hücre-içi floresan sinyali her şartta daha düşük saptandı.**
- **regX3 geninin dışa atım pompası fonksiyonu üzerinde etkisi olabilir ve bazı ilaçlara karşı dirençte rol oynayabilir.**
- **regX3 geni olası bir ilaç hedefi olabilir.**

senX3-*regX3* operonunda yeni bir 'open reading frame' (orf) araştırılması

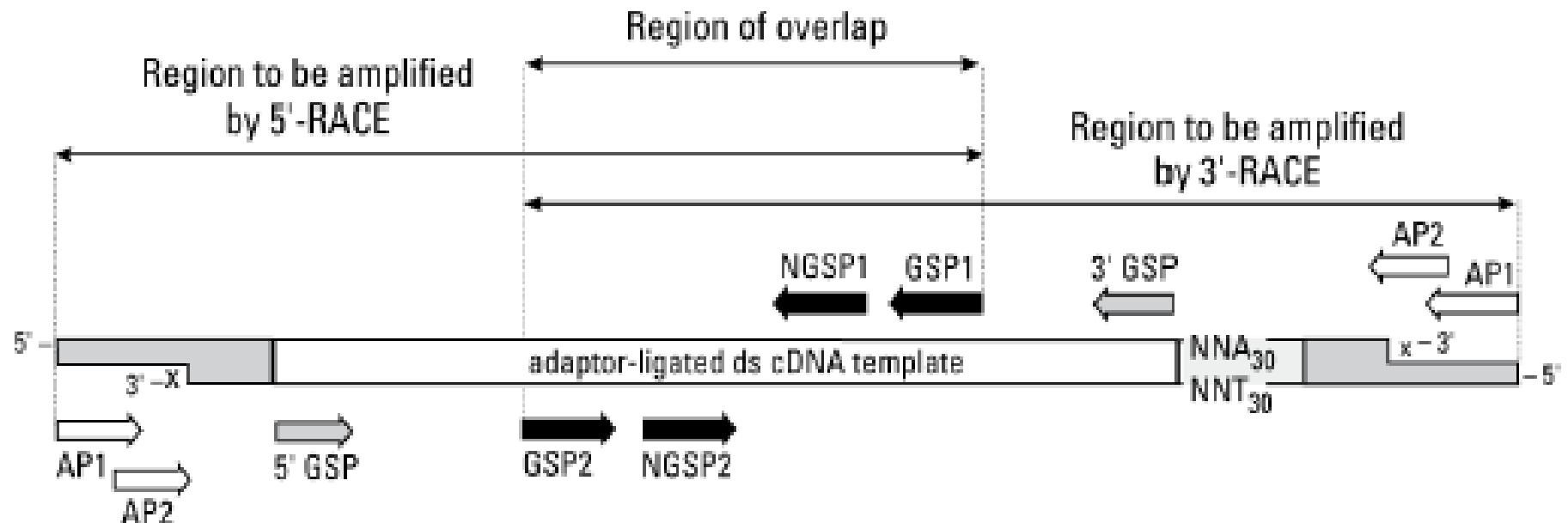
Yöntem:

- **5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE):**
Aynı kalıbın her iki ucundan cDNA'nın hızlı bir şekilde çoğaltılmasını sağlayan bir yöntem.

RACE



RACE



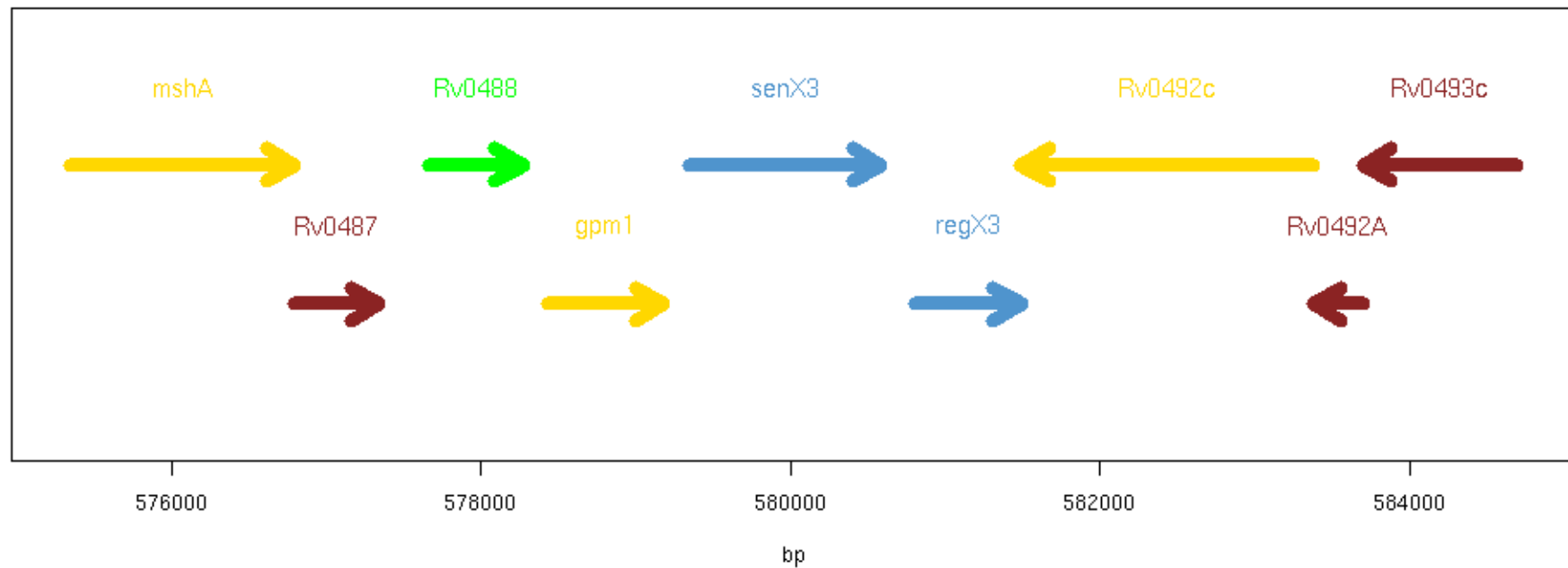
5' -  3' - X
Marathon cDNA Adaptor
x = NH₂ blocking group

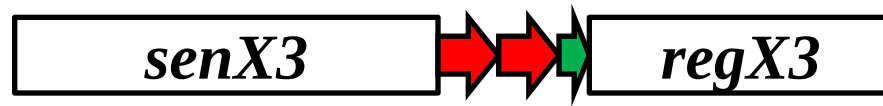
 cDNA Synthesis Primer
(plus second strand)

 Adaptor Primers (AP1 and AP2).
AP2 is optional for analysis of RACE
products or nested RACE PCR.

 Gene-specific primers (GSPs). Supplied by the
user. Nested GSPs (NGSPs) are optional and can
be used for characterization of RACE products
and for nested RACE PCR (if necessary).

 Flanking 5' and 3' GSPs are optional for the
generation of the full-length cDNA by end-to-end
PCR, and are based on sequence
data obtained from 5' and 3' RACE products.



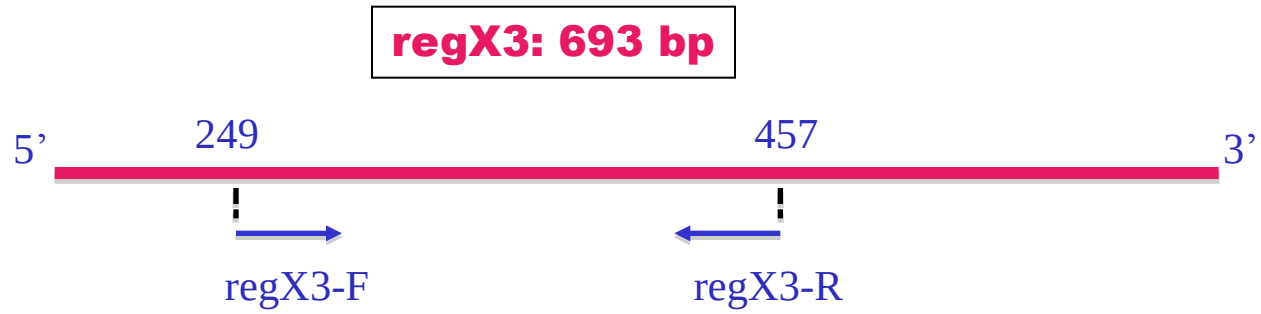


orf için primer dizaynı

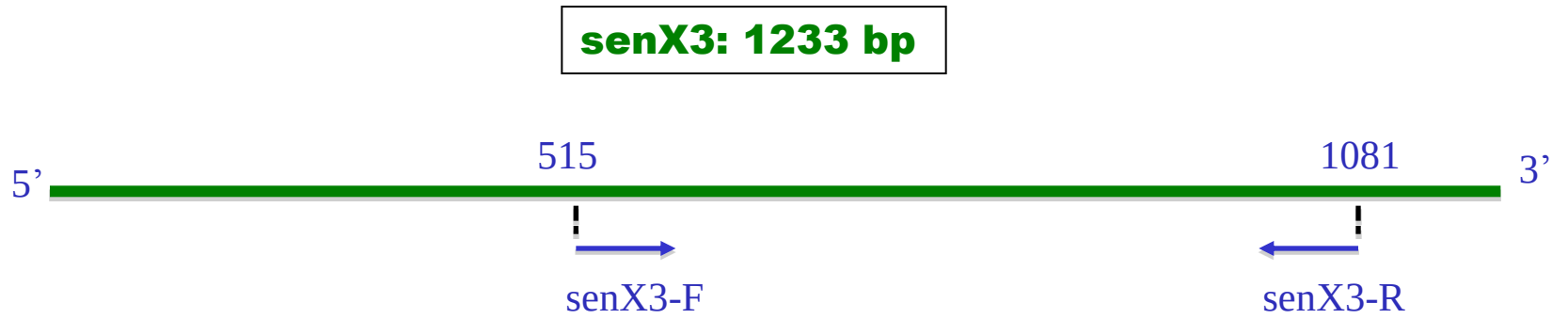
orf: 465 bp



regX3 için primer dizaynı



senX3 için primer dizaynı

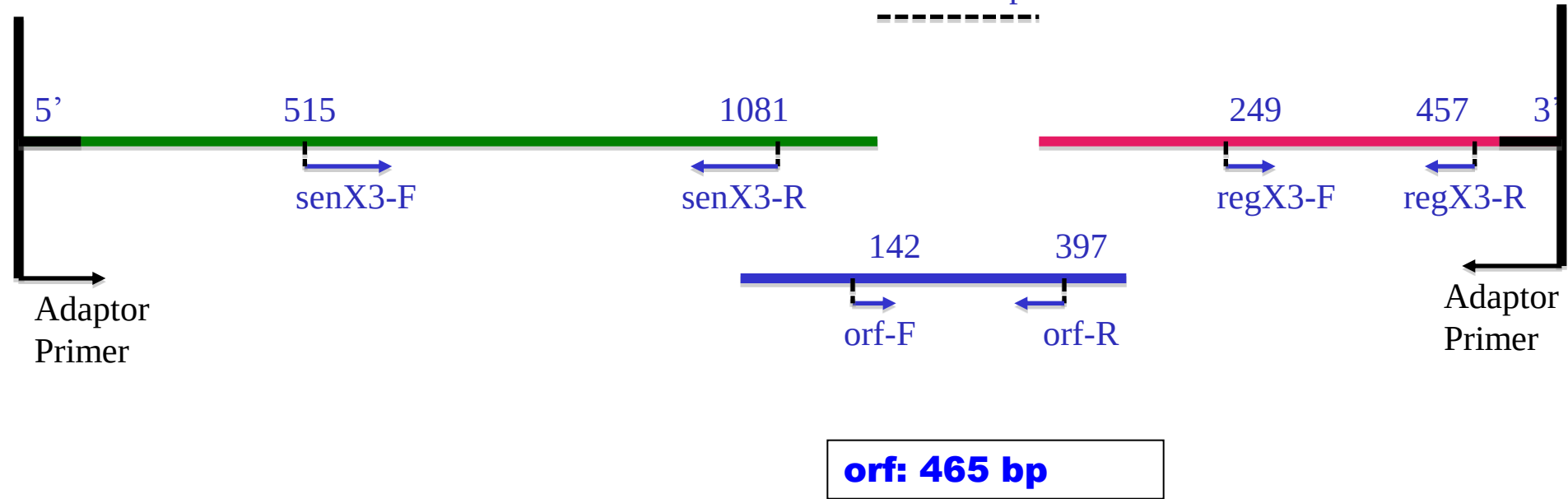


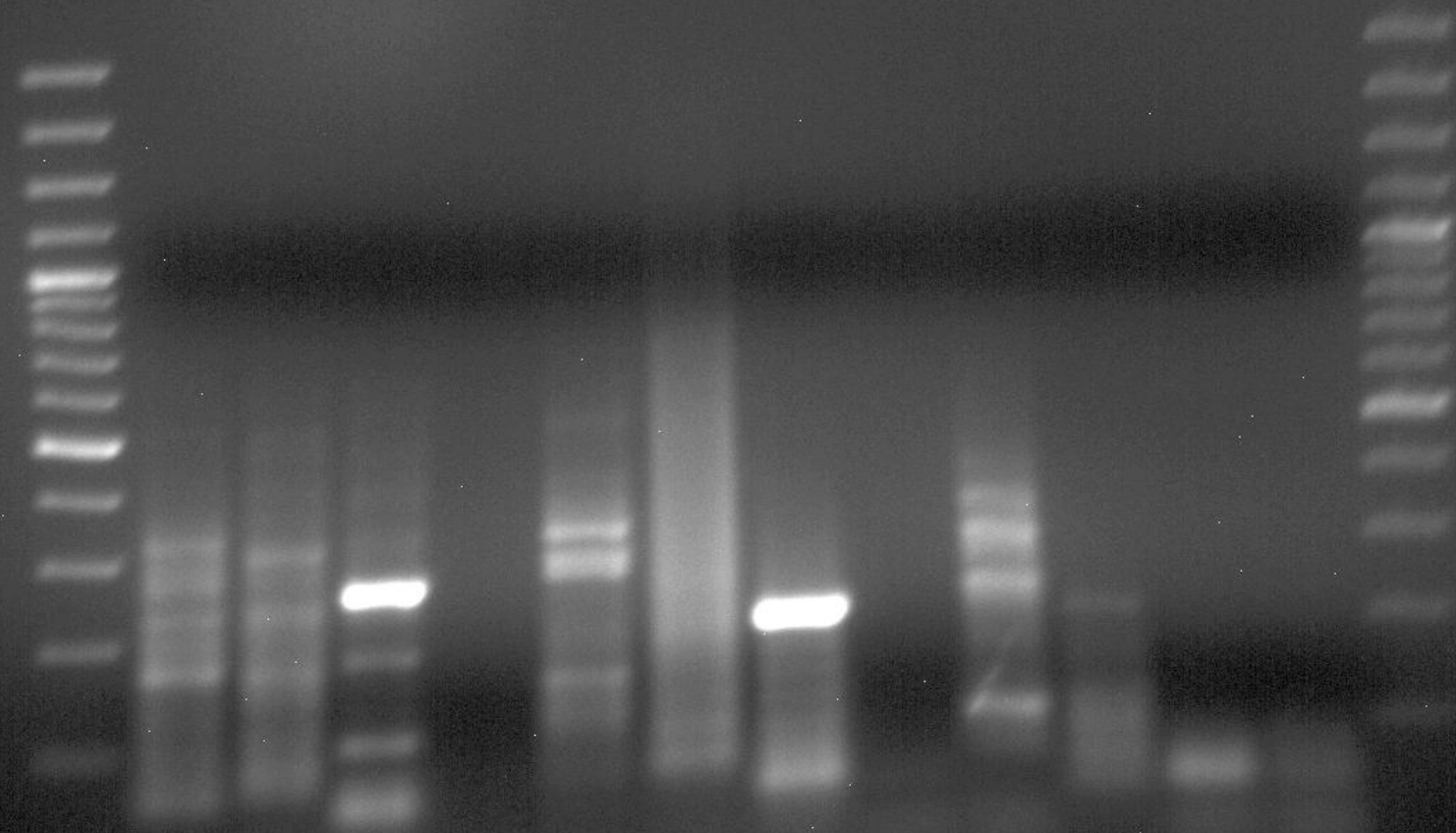
RACE

senX3: 1233 bp

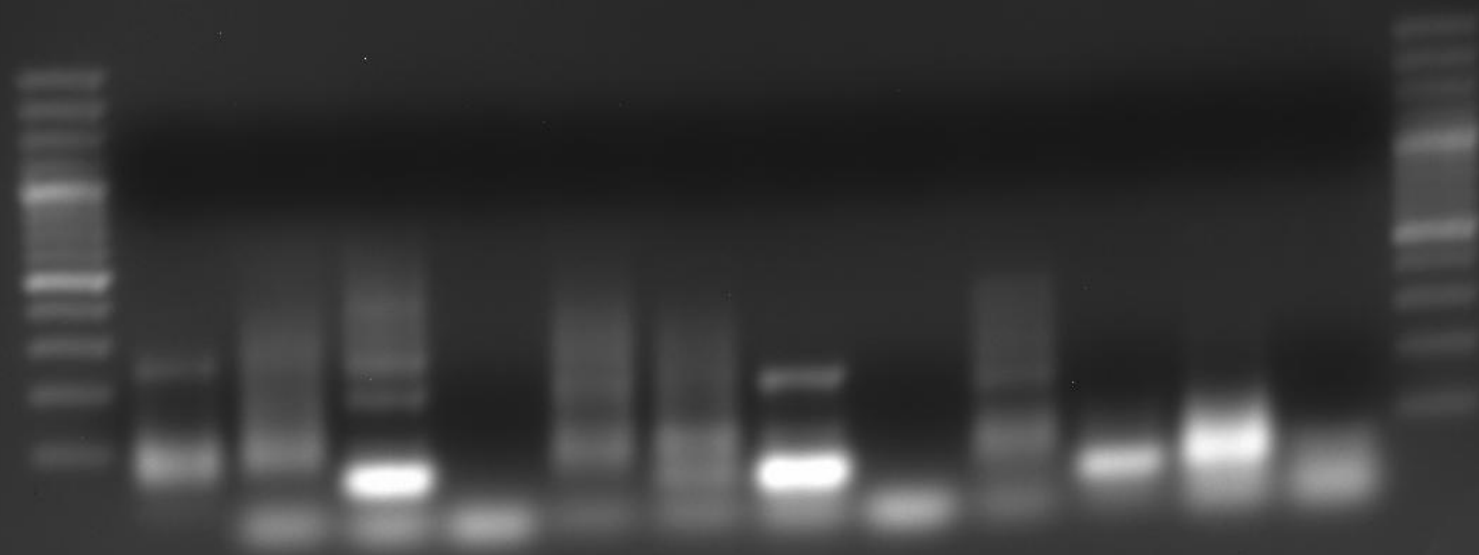
regX3: 693 bp

228 bp





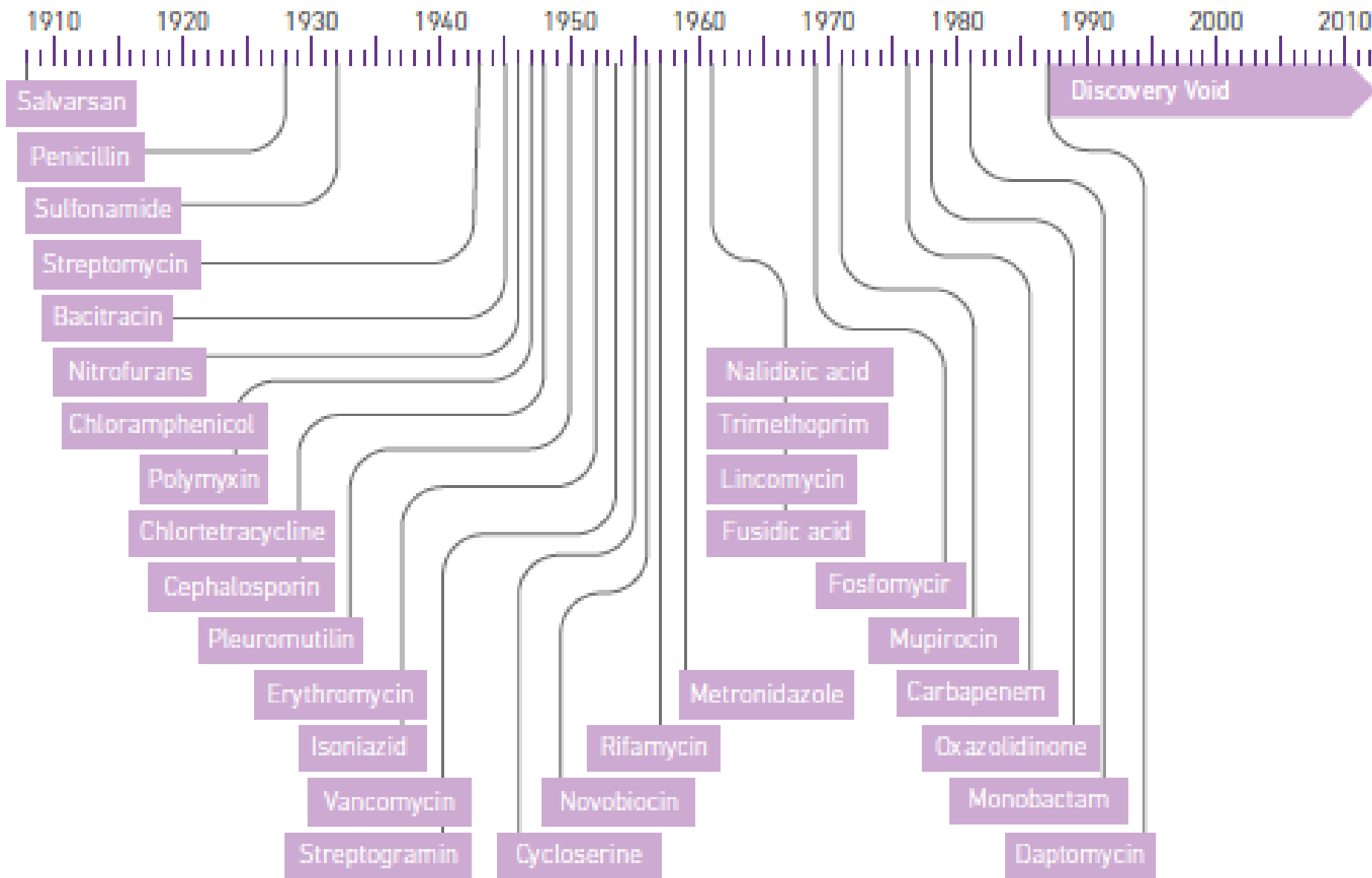
orf-5 orf-3 orf-IC orf-NC reg-5 reg-3 reg-IC reg-NC sen-5 sen-3 sen-IC sen-NC



orf-5 orf-3 orf-IC orf-NC reg-5 reg-3 reg-IC reg-NC sen-5 sen-3 sen-IC sen-NC

Dirençli tüberküloz basilinin evriminin bir sonu olabilir mi?

- **Cevap şimdilik HAYIR!**
- **Hatta, evrim devam ederse:
Antibiyotik Sonrası Döneme giriş riski!
(Post-antibiotic Era)**
- **30 Nisan 2014 DSÖ Raporu:
21. yüzyıl içinde Antibiyotik Sonrası Döneme
girilebilir!!**
- **<http://www.nature.com/news/who-warns-against-post-antibiotic-era-1.15135>**



WHO: Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014

