MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS'İN VİRULANS FAKTÖRLERİ VE İMMÜN YANITTAN KAÇIŞ MEKANİZMALARI

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS VIRULENCE FACTORS AND ITS IMMUNE EVASION MECHANISMS

*Şule ÇOLAKOĞLU**

ÖZET: Dünya nüfusunun üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* ile enfektedir. Tüberküloz enfeksiyonu sırasında, hastalığın lokalizasyonu, ciddiyeti ve sonucu bireysel olarak oldukça farklılık göstermektedir. *M.tuberculosis* enfeksiyonu sonrası gelişen bu farklı klinik durumları belirleyen, basil ve konak immün yanıtı arasındaki dengedir. Konak savunmasının kalitesi hastalığın sonucuna etki etmektedir. Yapılan çalışmalarda, patojenitede önemli olabilecek birçok mikobakteriyel hücre duvarı yapıları tanımlanmıştır. *M.tuberculosis*, immün sistemi sağlıklı kişilerde persistans gösterebilen bir patojendir. Bakteri, makrofajlar içinde yaşayabilir. *M. tuberculosis* ile enfekte konak, bu bakteriye karşı güçlü bir immün yanıt oluşturmaktadır. Bu yanıt aktif enfeksiyonun yayılmasının önlenmesinde ve kontrolünde oldukça başarılıdır, ancak bakteriyi elimine edemez. Bu da *M.tuberculosis*'in konak immün yanıtından kaçış mekanizmaları geliştirdiğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, *M.tuberculosis*'in, makrofajların en önemli iki mekanizması olan fagozom-lizozom füzyonu ve toksik reaktif nitrojen radikallerinin (RNI) üretiminden nasıl kaçtığını açıklayan yeni bulgular elde edilmiştir. Bu yazıda, *M.tuberculosis*'in fagozom-lizozom füzyonu ve RNI toksisitesinden kaçma mekanizmaları ve bakterinin MHC sınıf II ekspresyonunu inhibe ederek, enfekte makrofajların CD4 T lenfositleri tarafından tanınmasının önlemesi ile ilgili son gelişmeler tartışılmaktadır.

Anahtar sözcükler: Mycobacterium tuberculosis, virulans faktörleri, immüniteden kaçış mekanizmaları.

ABSTRACT: One-third of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*. When tuberculosis develops, the disease localization, severity, and outcome are highly variable between different individuals. The various manifestations of infection with *M.tuberculosis* reflect the balance between the bacilli and host defense mechanisms, in which the quality of host defense determines the outcome. Recent studies have identified several mycobacterial cell wall components that may be involved in the key steps of pathogenicity. *M.tuberculosis* is successful as a pathogen because of its ability to persist in an immunocompetent host. This

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Geliş Tarihi: 16.2.2004 Kabul Ediliş Tarihi: 18.3.2004

bacterium lives within the macrophages. Hosts infected with *M.tuberculosis* mount a strong immune response. This response is usually sufficient to prevent progression to active disease. The strong immune response can control, but not eliminate the bacilli, indicating that *M.tuberculosis* has evolved mechanisms to modulate or avoid detection by the host immune response. Recent advances have improved our understanding of how *M.tuberculosis* evades two major antimicrobial mechanisms of macrophages; phagolysosome fusion and the production of toxic reactive nitrogen intermediates (RNI). In this review, the recent evidence of *M.tuberculosis* evasion from phagolysosome fusion and RNI toxicity, as well as prevention of the recognition of infected macrophages by $CD4^+$ T lymphocytes by inhibiting MHC class II presentation, were discussed.

Key words: Mycobacterium tuberculosis, virulence factors, immune evasion mechanisms.

GİRİŞ

Bugün için dünya popülasyonunun üçte birinin *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte olduğu bilinmektedir. *M. tuberculosis*'in neden olduğu tüberküloz, tanı ve tedavisinde elde edilen gelişmelere rağmen dünya genelinde en önemli morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam eden bir enfeksiyon hastalığıdır[1,2].

M.tuberculosis, yavaş üreyen, zorunlu aerop, basil şeklinde bir bakteridir. Biyolojik olarak Gram pozitif bakteri grubunda yer alır. Bununla beraber mikobakteri hücre duvarının, bu gruptan farklı özellikleri vardır. En önemli farkı, yüksek oranda lipid içermesidir. *M.tuberculosis*'in hücre kılıfı başlıca üç kısımdan (sitoplazmik membran, duvar ve kapsül) meydana gelmektedir[3-5].

M. tuberculosis Hücre Duvarı Yapısı

Çok az mikroorganizma makrofajlar içinde, zengin asidik fagositik vakuollerin ve hidrolitik enzimlerin varlığında yaşayabilmektedir. *M.tuberculosis*' in, makrofaj içinde yaşayabilmesi ve çoğalabilmesinde gösterdiği başarıda, mikobakteriyel duvarın fizikokimyasal özelliklerinin de katkısı olduğu düşünülmektedir. Mikobakteri hücre duvarı başlıca iki kısımdan oluşmaktadır[1,6]:

a) Alt Kısım: Sitoplazmik membranın hemen üzerinde yer alan, peptidoglikan (PG), ona kovalent bağlarla bağlı arabinogalaktan (AG) ve AG' a ester bağları ile bağlı mikolik asitlerden oluşur. Bu yapıya "hücre duvarı çekirdeği (mAGP kompleksi)" denir. Hücre duvarı çözücülerle parçalandığında duvarın çözünmeyen yapılarını bu mAGP kompleksi oluşturur. Bu kompleks bakterinin canlılığını sürdürmesi için gereklidir. Bu nedenle bu yapıların biyosentezinde görev alan enzimler ve bu enzimleri kodlayan genler yeni ilaç hedefleri olarak araştırılmaktadır.

b) Üst Kısım: Serbest lipidlerden meydana gelir. Serbest lipidler, phthiocerol dimycoceroseta (PDIM), disakkarid trehaloz (kord faktörü), sülfatidler ve lipoarabinomannan (LAM), mikolik asitlerin üstünde yer alır ve mikolik asid hidrokarbon zincirlerine komplementer tek sıra bir tabaka meydana getirir. Serbest lipidlerden ve mikolik asitlerden oluşan bu yapı, oldukça hidrofobikdir. Serbest lipidler,

ayrıca *M.tuberculosis* patogenezinde de önemlidir. Enfeksiyon sırasında oluşan konak immün yanıtının sinyale dayalı tüm basamaklarını indüklerler. Serbest lipidlerin üzerinde, karbonhidratların, proteinlerin (süperoksid dismutaz, alanin dehidrogenaz, antijen 85, taşıyıcı proteinler vb) ve lipidlerin dağınık olarak yerleştiği mikobakteri kapsülü vardır. Hücre duvarı çözücülerle parçalandığında, duvarın çözünen maddelerini bu yapılar meydana getirir. Bunlar tüberküloz patogenezinde etkili olan yapılardır. Bu yapıların biyosentezinde görev alan enzimlerin ve bu enzimleri kodlayan genlerin bilinmesi, tüberküloz patogenezini ve bakterinin konak immün yanıtından kaçma mekanizmalarını anlamamızı sağlayacaktır. Bu şekilde *M. tuberculosis'* e karşı etkili aşılar geliştirilebilir[3,6].

Sonuçta, mikobakteri duvarı, konağın bakterisidal mekanizmalarına ve çevre şartlarına karşı basili koruyan (doğal hidrofobik yapısı nedeniyle) kuvvetli bir bariyerdir. Ayrıca, konak immün sisteminin tanıdığı antijenleri içererek, basilin konak immün yanıtını yönlendirmesinde etkilidir. Tüm bu bilgilerin ışığında, mikobakteri duvarının, basilin patojenitesinden sorumlu en önemli yapı olduğu söylenebilir[3,5,6].

TÜBERKÜLOZ PATOGENEZİ

Tüberküloz, *M.tuberculosis* tarafından oluşturulan oldukça ciddi ve bulaşıcı bir hastalıktır. Tüberküloz, vücudun çoğu organında görülebilir, ama en sık görülen form pulmoner tüberkülozdur[7].

Pulmoner tüberküloz, basili içeren aerosollerin inhalasyonu ile başlamaktadır. Çapı 1-2 μm olan aerosoller üst solunum yolu savunmasını rahatlıkla atlatıp alt solunum yollarına ulaşabilmektedir. Büyük aerosoller ise nazofarinks ve üst solunum yolunun fiziksel bariyerlerince engellenmektedir. Ayrıca, küçük aerosoller, büyük partiküllere göre havada daha fazla asılı kalabilmektedir[1,3,8].

Bakteri akciğere ulaştıktan sonra, enfeksiyonda dört farklı evre gözlenebilir. *M.tuberculosis*, akciğerlerde ilk olarak alveolar makrofajlardan ve dendritik hücrelerden oluşan konağın doğal immünitesi ile karşılaşır. Basilin konağa yerleşmesini önleyen ve konağı başlangıçtaki pulmoner enfeksiyona karşı koruyan asıl faktörün bu doğal immünite olduğu düşünülmektedir. Bu evrede bakterinin yok edilmesi, alveolar makrofajların bakterisidal kapasitesine ve fagosite edilen basilin virulans faktörlerine bağlıdır. Eğer giren bakteri sayısı az ise ve alveolar makrofajlar bunları tamamen öldürebilirse, basil akciğerlere yerleşemez ve gerçek bir enfeksiyon meydan gelmeden basil durdurulur. Kişi bu evrede (1. evre) PPD negatiftir[8,9].

Eğer bu erken dönemde makrofaj içindeki basil, bakterisidal mekanizmalardan kaçabilir ve makrofaj içinde çoğalabilirse, artık alveolar makrofajlar bakterinin yok edilmesinde yetersiz kalır ve enfeksiyonun "primer tberküloz" evresi başlar (2. evre). Bu evrede, alveolar makrofajlardan salgılanan kemotaktik faktörlerin etkisiyle, dolaşımdan monositler, T lenfositleri ve diğer iltihap hücreleri (PMNL, vb) enfeksiyon alanına toplanır. Kan monositleri makrofajlara dönüşür. Bu makrofajlar basili fagosite edebilir, ama henüz aktive olmadıkları için öldüremezler. Bu simbiyotik dönemde, bakteri logaritmik olarak makrofajlar içinde çoğalır ve dolaşımdan enfeksiyon alanına kan kökenli makrofajların toplanması devam eder. Böylece lokal iltihabi yanıt

(granülom) oluşur. Enfeksiyondan 2-3 hafta sonra T hücre cevabı oluşur. Antijene özgül T hücreleri enfeksiyon alanına gelir ve makrofajları hücre içindeki bakterileri öldürülebilmeleri için aktive ederler. Makrofajlardan ve T hücrelerinden oluşan konak hücresel immün yanıtı, basilin erken logaritmik çoğalmasını durdurur. Oluşan pulmoner enfeksiyonun sınırlandırılmasında ve enfeksiyonun yayılmasının önlenmesinde asıl faktörün, bu koruyucu hücresel immün yanıt olduğu düşünülmektedir. Bu dönemde hastaların çoğu semptomsuzdur. Kişinin *M.tuberculosis* ile karşılaştığının tek kanıtı (basile karşı gelişmiş hücresel cevabın göstergesi) PPD pozitifliğidir. Bazen akciğer grafilerinde küçük kalsifikasyonlar görülebilir. Eğer enfeksiyonun başlangıcındaki hücresel immün yanıt yetersizse, primer tüberkülozu olan kişilerin düşük bir yüzdesinde "ilerleyici aktif tüberküloz" meydana gelir. Primer odak büyür, kazeöz nekroz ve akciğerlerde doku hasarı ortaya çıkar. Basil, solunum yollarına geçerek bronkopnömoni, lenf ve kan dolaşımına geçerek disemine enfeksiyon (miliary tuberculosis) meydana getirebilir[1,8,9].

Enfeksiyon çoğunlukla, kendisine karşı gelişen hücresel immün yanıt ve granülom sonucu başarıyla sınırlanır. Ama bu yanıt, patojeni konaktan elimine edemez. Bakteri, fibrin bir duvarla çevrili granülomda bulunan makrofajlar içinde latent olarak kalır. Bu dönem enfeksiyonun 3. evresi olan "latent dönem"dir. Klinik latentlik, kişinin hayatı boyunca devam eder. Hayatın herhangi bir döneminde hücresel immün yanıtta bir zayıflama olursa (immün süpresif tedavi, kortikosteroid tedavi, kanser, yaşlılık, malnütrisyon, AIDS, alkol ve ilaç bağımlılığı, vb) granülom içinde canlı kalmış bakteri reaktive olur ve tüberkülozun 4. evresi olan "sekonder tüberküloz" gelişir[1,8,9].

Sonuç olarak akciğerlerdeki enfeksiyonun niteliği, hafif bir infiltrasyondan, kronik yıkıcı bir enfeksiyona, hatta disemine enfeksiyona kadar değişebilmektedir. Tüberkülozdaki bu farklı klinik durumları belirleyen, basil ve konak savunması arasındaki dengedir. Konak savunmasının kalitesi hastalığın sonucunu belirlemektedir[9].

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS'İN VİRULANS FAKTÖRLERİ

M.tuberculosis'in virulansı, bilinen bir toksine bağlı değildir. Kord faktörü denilen mikosidler, hayvanlar için oldukça toksik olsalar da, patojenitede rol aldığına dair bir kanıt yoktur[3].

M. tuberculosis'in en önemli virulans faktörü, konak makrofajları içinde çoğalabilmesidir. Enfeksiyon sırasında meydana gelen doku hasarından ise, *M.tuberculosis*'e karşı oluşan hücresel immün yanıt (Tip IV hipersensitivite) sorumludur[10].

Bir hücre içi patojeni olan *M.tuberculosis*'in konakta bir enfeksiyon meydana getirebilmesi için, mukozal yüzeylerde kolonize olabilmesi, konak hücrelerine girebilmesi, hücre içi ortamda çoğalabilmesi, konağın kendisine karşı meydana getirdiği savunma mekanizmalarından kaçabilmesi ve konak dokusunda hasara neden olabilmesi gerekmektedir[8].

M. tuberculosis'in Konak Hücrelerine Tutunması ve Hücre İçine Girişi

M.tuberculosis, makrofaj içine birden fazla yüzey reseptörüne bağlanarak girebilir. Bu özellik, *M.tuberculosis*'in çeşitli hücreleri enfekte edebilmesini sağlar ve böylece bakteri enfeksiyonun herhangi bir döneminde tüm fagositik hücre tipleri için hazırdır.

Bu şekilde basilin hücre içine girişinin artışı, aktif tüberküloz enfeksiyonu geliştirme riskini de artırmaktadır. Ayrıca bakteri, farklı reseptörleri kullanarak hücre içinde farklı sinyal sistemlerini aktive etmektedir. Bu da, kendisine karşı oluşan immün yanıtın aktivasyonunda ve hücre içi yaşamını sürdürmesinde farklılıklara neden olmaktadır[9,10].

IgG ile opsanize olmuş partiküllerin fagositozunu kolaylaştıran Fcγ reseptörlerinin, *M.tuberculosis*'in hücre içine girişinde çok az rolü vardır[9]. Kompleman reseptörleri (CR1, CR3 ve CR49), C3b ile opsonize olmuş *M.tuberculosis*'in, makrofajlara girişini sağlamaktadır. Ayrıca, *M.tuberculosis* opsanize olmadan direk olarak da CR3 ve CR4 reseptörlerine bağlanabilmektedir[1,9].

Makrofaj mannoz reseptörleri (MR), opsonize olmamış *M.tuberculosis*'in hücre içine alınmasında en iyi bilinen reseptördür. *M. tuberculosis*'in hücre duvarında yer alan mannoz ünitelerini tanır. İnterferon gama (IFNγ), makrofajlarda mannoz reseptör ekspresyonunu azaltırken, IL-4 bu ekspresyonu artırmaktadır. Basil, bu reseptörler aracılığıyla hücre içine girdiğinde reaktif oksijen radikallerinin aktivasyonunu tetiklemez[1,9].

M. tuberculosis' in CR ve MR aracılı girişi bloke olduğunda, "tip A scavenger reseptörleri (SR)"ne tutunur[9]. Bakterinin, CR, MR ve SR aracılığıyla makrofaj içine girişi, sadece bakterinin fagositozunu sağlar, özgül konak immün yanıtının oluşmasını tetiklemez. Bu da bakteriye bir avantaj sağlamaktadır[9].

M. tuberculosis enfeksiyonu sırasında, etkili bir immün yanıtın oluşması için, bakterinin fagositozu yanında, basilin ve ürünlerinin immün sistemce tanınması gerekmektedir. *M.tuberculosis*'in immünolojik olarak tanınması ve bu immün yanıtta yer alacak hücrelerin aktivasyonu, basilin makrofaj yüzeyindeki "Toll like" reseptörleri (TLR) aracılığıyla tanınması sonucu meydana gelir. Bu reseptörler konağın doğal immünitesi ile kazanılmış hücresel immünitesini birbirine bağlayan en önemli proteinlerdir. *M. tuberculosis'* in LAM'nı TLR2'i ile, 19kDa lipoproteini TLR4 ile ve DNA'sı TLR9 ile makrofaj yüzey reseptörü CD14 aracılığıyla, tanınmaktadır. TLR uyarılınca IRAK (IL-1 receptor associated kinase)'a bağlanır. Bu da NFkB gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek sitokin sentezini indükler. Bu sitokinlerden en önemlisi T lenfosit aktivasyonunda görev alan IL-12'dir. TLR ve IRAK arasındaki bağlantıyı MyD88 (Myeloid Differentiation Protein 88) sağlar[9,11,12].

M. tuberculosis'in Hücre İçine Girişini Artıran Diğer Faktörler

Konağa Ait Faktörler: Bunlar yapısal olarak birbirine benzeyen bir protein grubu olan "kollektin" (surfactan protein A, mannoza bağlanan lektinler ve Cq1)'dir. Surfactan protein A (SpA), *M.tuberculosis*'in makrofajlara, tip II pnömositlere veya nötrofillere tutunarak hücre içine alınmasını kolaylaştırır. In-vitro deneylerde, SpA ile opsonize olan *M.tuberculosis*'in fagositozunun reaktif nitrojen radikallerinin sentezini süprese ettiği gösterilmiştir[9].

Bakteriye Ait Faktörler: M.tuberculosis, epitel hücreleri gibi profesyonel fagosit hücresi olmayan hücreleri de enfekte edebilmektedir. Bu konuda tanımlanmış iki faktörden birisi olan 30-31 kDa antijen 85 kompleksi, bakteri tarafından sentezlenip hücre dışına salgılanarak epitel hücresinin dış yüzeyinde bulunan fibronektine, diğeri olan 25 kDa heparine bağlanan adezin, konak hücresi yüzeyindeki sülfatlanmış glikokonjugatlara bağlanmaktadır[9].

Makrofajların Aktive Olması

Enfeksiyon bölgesine gelen kan kökenli makrofajlar, aktive makrofaj değildirler, yani bakteriyi fagosite edebilir ama öldüremezler. Böylece, *M.tuberculosis*'in çoğalabilmesi için uygun bir ortam oluştururlar. Makrofajların mikrobisidal fonksiyonu, özellikle $CD4^+$ Th1 lenfositlerinin salgıladığı IFNγ aracılığıyla artırılır. Ayrıca makrofaj aktivasyonunda, proinflamatuvar sitokinlerin (en önemlisi TNF-α) ve vitamin D'nin aktif metaboliti $1,25(OH)_2D3$'ün de etkili olduğu gösterilmiştir. IFNγ, fagolizozomda bakterisidal maddeleri sentezleyen enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonunu artırmaktadır. TNFα, T lenfositlerinin enfeksiyon alanına gelmesini artırarak, T lenfositlerinin salgıladığı IFNγ ile birlikte nitrik oksit sentetaz aktivasyonunu meydana getirmektedir. $1,25\ (OH)_2$ D3'ün, makrofajları aktive etme mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, ya IFNγ ve TNFα aracılığıyla ya da direk olarak makrofajlar üzerine etki ile olduğu düşünülmektedir[1,7,9,13].

Aktive makrofaj, *M.tuberculosis*'i fagosite ettikten sonra, basile karşı iki yol ile savaşmaktadır[9]. Bunlardan birincisi, fagozom içindeki basilin öldürülmesi ile bakterinin çoğalmasının durdurulması, diğeri ise sitokinler (TNFα, IL1) ve kemokinler (IL8) sentezleyerek, lokal iltihabi yanıt (granülom) ve T lenfosit aktivasyonuyla koruyucu hücresel yanıtı başlatmak suretiyle enfeksiyonun sınırlandırılmasıdır.

Makrofaj Fagozomu İçindeki M. tuberculosis'in Öldürülmesi

M.tuberculosis, makrofaj reseptörlerine tutunduktan sonra fagozom içinde hücre içine alınmaktadır. Daha sonra, fagozom lizozomla birleşerek fagolizozom oluşmaktadır. Fagolizozom içindeki basil, fagozom reseptörlerini uyarır. Bunun sonucunda fagolizozom içindeki bakterisidal maddeleri sentezleyen enzimler (fagosit oksidaz, nitrik oksit sentaz) ve lizozomal proteazlar aktive olur. Böylece aktive makrofajlar, reaktif oksijen radikalleri (fagosit oksidaz), reaktif nitrojen radikalleri (nitrik oksit sentaz) ve lizozomal hidrolitik enzimleri aracılığıyla basili öldürmeye çalışır. TNFα ve IFNγ, nitrik oksit sentazın potent aktivatörü iken, IL-4 ve IL-10, enzimi süprese etmektedir. Bu fonksiyona "Nramp" proteininin de katkısı vardır. Nramp proteini, makrofaj içine nitrit taşıyan bir proteindir. Nitrit, reaktif nitrojen radikallerinin sentezi için gereklidir. Nramp proteininin üretiminde veya fonksiyonlarında bir eksiklik olması, nitrik oksit üretiminin azalmasına ve *M.tuberculosis* gibi hücre içi patojenlere karşı hassasiyetin artmasına neden olacaktır. Bu bulgu, basili öldürmede konak faktörlerinin de etkili olabileceğini düşündürmektedir[1,6-9,14,15].

Eğer makrofaj fagosite ettiği basili öldürmede başarısız olursa, konak bu makrofajları ortadan kaldırmak için iki mekanizma kullanır; apoptozis ve granülozinler. Apoptozis, konağın basil içeren makrofajı ve diğer fagositer hücreleri yok ederek, *M.tuberculosis*' in çoğalmasını durdurmaya çalıştığı bir mekanizmadır. Apoptozisden esas sorumlu olan hücreler antijene özgül sitotoksik T hücreleridir. Sitotoksik T lenfositleri, makrofaj tarafından *M.tuberculosis* antijenleri sunulunca aktive olarak granüllerinde bulunan perforin ve granülozin enzimlerini hücre dışına salgılar. Perforin ortamda bulunan Ca^{+2} ile birleşerek bir polimer oluşturur ve enfekte makrofaj membranında bir por meydana getirir. Bu pordan fagositer hücre içine granülozin girerek "caspas" sistemini aktive eder. Böylece hücre apoptozise uğrar. TNFα,

apoptozisi indükleyen en önemli sitokindir. *M.tuberculosis*, IL10 sentezini indükleyerek TNFα sentezini azaltır. Ayrıca bakterinin LAM yapısı, Ca^{+2} aracılı mekanizmayı inhibe edebilmektedir. Böylece basil, fagozomunda yaşadığı makrofajı apoptozisden korumaya çalışmaktadır[2,6,16-19].

M. tuberculosis' in fagozom içinde canlı kalabilmesi, lizozomal enzimlerin, reaktif oksijen ve nitrojen radikallerinin zararlı etkilerinden kaçabilme kabiliyetine bağlıdır. Bu kabiliyet, *M.tuberculosis* patojenitesinde en önemli basamaklardan biridir.

M.tuberculosis'in Fagozom İçinde Canlı Kalabilmek İçin Geliştirdiği Kaçış Mekanizmaları

a) Fagozom-Lizozom Füzyonunun İnhibisyonu

Yapılan in-vitro çalışmalarda, canlı *M.tuberculosis* içeren fagozomların lizozomlarla füzyona uğramadığı gösterilmiştir. Fagozom-lizozom birleşmesi basit bir olay, ama fagozom-lizozom füzyonu dinamik bir süreçtir. Bunun olabilmesi için, bakterinin fagositozunu takiben fagozomun birtakım biyokimyasal değişiklikler geçirerek olgunlaşması gerekmektedir. *M.tuberculosis,* bu olgunlaşma sürecini durdurarak fagozom-lizozom füzyonunu engelliyor olabilir[1,7,20].

Yapılan in-vitro deneylerde, *M.tuberculosis'*in duvarında bulunan sülfatidlerin fagozom-lizozom füzyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, *M.tuberculosis* içeren fagozomlarda yüksek oranda amonyak olduğu tespit edilmiştir. Fagozomun olgunlaşmasında ve lizozom ile füzyonunda, fagozom içi pH'nın asidik olması önemlidir. Bu yüksek orandaki amonyak, mikobakteriyel fagozomun içini alkali yapmaktadır. Böylece fagozom-lizozom füzyonu engeleniyor olabilir. Ayrıca, lizozomal enzimlerin etkisi de azalıyor olabilir. Çünkü, lizozomal enzimlerin fonksiyonu için fagolizozom içinin asidik pH (4.5-5)'da olması gerekmektedir. Bu asidik pH, fagolizozom membranında bulunan H^+-ATPaz pompası ile sağlanır. *M.tuberculosis* içeren fagozomlarda bu pompanın olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca, in-vitro çalışmalarda, *M.tuberculosis* içeren fagozomların yüzeyinde Rab5 (olgunlaşmamış fagozomların membranında bulunmaktadır) olduğu, olgun fagozomlarda bulunan Rab7'nin olmadığı gösterilmiştir. Tüm bu bulgular, bakterinin bir şekilde fagozom olgunlaşmasını durdurduğunu kuvvetle düşündürmektedir[1,7,20].

TACO (tryptophan aspartate-containing coat) proteini, mikobakteriyel fagozomların lizozomlarla füzyonunun olmamasını açıklayan en önemli hipotez olmuştur. Fagozom, sitoplazmadaki hareketini çevresinde bulunan aktin ağı aracılığıyla yapar. TACO, bu aktine bağlanan proteinlerden biridir. TACO, enfekte olmamış makrofajların kortikal tübül ağı ile ilişkilidir. *M.tuberculosis* hücre içine alınırken, kortikal alandan canlı basil içeren fagozom membranına TACO transferi olmaktadır. Böylece, aktin filamanlarının aşırı stabilizasyonu sonucu fagozom çevresinde fiziksel bir bariyer oluşmakta ve böylece fagozom-lizozom füzyonu inhibe olmaktadır. *M. tuberculosis'* i içeren fagozomun, TACO'yu hangi mekanizma ile aldığı veya membranda tutabildiği bilinmemektedir[1,7,20].

b) Reaktif Oksijen Radikallerinin Nötralizasyonu

In-vitro çalışmalarda, *M.tuberculosis*'in süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen radikalleriyle öldürülmeye dirençli olduğu gösterilmiştir. Sülfatidler, fenolik glikolipidler, lipoarabinomannan gibi birçok mikobakteri ürününün, reaktif oksijen radikallerini nötralize ettiği gösterilmiştir[1,7,21,23].

c) Reaktif Nitrojen Radikallerinin Nötralizasyonu

Reaktif nitrojen radikallerinin, makrofajların fagozom içindeki *M. tuberculosis*' i öldürmede kullandığı en etkili mekanizma olduğu düşünülmektedir. *M.tuberculosis*, AhpC proteinleri ile en potent reaktif nitrojen radikali olan peroksinitrit anyonunu ($ONOO^-$) katabolize etmektedir. Ayrıca *M.tuberculosis* peptidi olan metionin sülfoksit redüktaz, $ONOO^-$ ile proteinlerin metionin aminoasitleri arasındaki reaksiyon sonucu oluşan metionin sülfoksitlerin redüksiyonunu katalizleyerek, bu potent toksik radikalin etkisine karşı dirençte önemli bir rol alabilir[22].

d) Sitoplazmaya Kaçış

M. tuberculosis, makrofajda primer olarak fagozom içinde yerleşir. Yapılan çalışmalarda, basilin sitoplazmada da bulunabileceğini destekler nitelikte bulgular elde edilmiştir. Tüberkülozda $CD4^+$ T lenfosit yanıtı yanında, $CD8^+$ T lenfosit yanıtı da oluşmaktadır. $CD8^+$ T lenfosit cevabı, sitoplazmada veya çekirdekte çoğalan patojenlere ait antijenlerin sunumu sonucu meydana gelmektedir. Tüberküloz sırasında bu cevabın oluşması, bazı basillerin fagozomdan kaçarak sitoplazmada replike olduğunu kuvvetle düşündürmektedir[3,10].

M.tuberculosis genom analizinde, *L.monocytogenesis*' in fagozomdan kaçışına yardım eden bir hemolizini (Listerolizin) kodlayan gene benzer bir gen dizisi gösterilmiştir. Bu bulgu, basilin bir hemolizin sentezleyerek fagozomdan sitoplazmaya kaçtığını desteklemektedir[10]. Dolayısıyla, bu mekanizmaları kullanarak bakterinin sitoplazmaya kaçıyor olması, bakteriyi fagozom içindeki bakterisidal mekanizmalardan korumaktadır.

Makrofajlardan ve T Hücrelerinden Salgılanan Sitokinlerin Etkisi

M.tuberculosis'in makrofajlarca tanınması, hücrenin aktivasyonuna, bunun sonucunda makrofajlardan sitokin ve kemokin salınımına neden olmaktadır. Bu sitokin ağının, basile karşı oluşan immün yanıtta ve enfeksiyonun sonucunu belirlemede çok önemli bir rolü vardır. *M.tuberculosis* bu sitokin ağını etkileyerek immün yanıtı kendi lehine çevirmeye çalışır. Bu da tüberkülozun patogenezinde önemli olan bir diğer noktadır[1,9,27].

Bakteriyi fagosite etmiş makrofajlardan salgılanan en önemli proinflamatuvar sitokinler TNFα, IL-1b ve IL-12'dir. TNFα, granülom oluşumu ve makrofaj aktivasyonu için çok önemli bir sitokindir. IL-12, antijene özgül $CD4^+$Th1 cevabının oluşmasını sağlayarak, IFNγ salgılanmasını artırır. Ayrıca tüberküloz enfeksiyonu sırasında doğal ve adaptif hücresel yanıtı birleştiren düzenleyici bir sitokindir. IFNγ, enfeksiyon sırasında başlıca Th1 lenfositlerinden salgılanan ve makrofajların aktive olmasını sağlayan önemli bir proinflamatuvar sitokindir[1,9,24,27].

Enfeksiyon sırasında salgılanan en önemli antiinflamatuvar sitokinler; IL-10, TGFβ ve IL-4'dür. IL-10 sitokini, TNFα, IL-12 ve IFNγ sentezini azaltır. TGFα ise IL-10 salınımını artırır, IL-10 ile sinerjistik olarak IFNγ sentezini azaltır ve makrofajların antijen sunumunu, proinflamatuvar sitokin salınımını azaltır[1,7,9,14,27]. Enfeksiyon sırasında makrofajların salgıladığı kemokinler ise IL-8, MCP-1 ve RANTES' tir[7,9,25].

In-vitro deneylerde, *M.tuberculosis* ile enfekte makrofajlarda antiinflamatuvar sitokinlerin salınımında artış (özellikle IL-10 ve TGFα) ve proinflamatuvar sitokinlerin (özellikle IL-12, TNFα ve IFNγ) salınımında azalma olduğu gösterilmiştir. *M.tuberculosis* 19 kDa lipoproteini ile enfekte insan makrofajlarında, muhtemelen Th1 lenfosit aktivasyonunun azalması sonucu, IL-12 ve TNFα üretiminin azaldığı gösterilmiştir. Bu değişikliklerin sonucunda, TNFα seviyesinde azalma, disfonksiyonel granülom oluşumuna neden olur. IL-12 seviyesindeki azalma sonucunda, T hücre aktivasyonunu, IFNγ sentezi, makrofajların IFNγ'ya verdikleri yanıt, makrofajların T hücrelerine antijen sunumu ve makrofaj aktivasyonunda azalmalar meydana gelir. Sadece aktive makrofajlar basili öldürebildiği için, *M.tuberculosis'* in makrofaj aktivasyonunu önlemesi oldukça önemlidir. Makrofaj aktivasyonundaki en önemli faktör aktive $CD4^+$ Th1 lenfositlerinin salgıladığı IFNγ'dır. O nedenle bakteri T lenfosit aktivasyonunu inhibe etmeye ve böylece IFNγ sentezini azaltarak makrofaj aktivasyonunu önlemeye çalışır. Ayrıca *M.tuberculosis* antijen 85 proteini, antikor cevabına yol açan güçlü bir uyarıcıdır. Bu protein, konağın koruyucu tipteki hücresel immün yanıtının antikor üretimi ile karakterize humoral yanıta çevrilmesine yol açıyor olabilir[9,10,13,26,29].

Granülom Oluşumu

Enfeksiyonun başlangıcında alveolar makrofajlar, kemokin (IL-8) ve sitokinler (TNFα, IL-1) salgılayarak, kan monositlerinin, T lenfositlerinin ve diğer iltihap hücrelerinin (PMNL, vb), ayrıca trombosit aktive edici faktörü salgılayarak, epiteloid hücrelerin ve fibroblastların enfeksiyon alanına toplanmasını sağlamaktadır. Enfeksiyon alanına önce nötrofiller daha sonra monositler gelir ve granülom oluşumunun 2-3. günlerinde makrofajlara farklılaşırlar. Dokuzuncu günde, makrofajlar, epiteloid hücreler, epiteloid hücrelerin birleşmesiyle oluşmuş dev hücreler ve $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfositlerinden oluşmuş bir granülom meydana gelir. Granülom, fibroblastların sentezlediği fibrin kapsül ile çevrelenir[8,16,30].

M. tuberculosis'e Karşı Kazanılmış T Hücre Yanıtı

*M.tuberculosis'*in akciğerlerde makrofajlara yerleştikten sonra tüberküloz enfeksiyonunun sınırlandırılması, enfekte makrofajlar ile T lenfositleri arasındaki etkileşimin başarısına bağlıdır[9]. Primer veya kazanılmış hücresel immün yetmezliği (AIDS) olan kişilerde aktif tüberküloz enfeksiyonu geçirme oranının (%40) ve ölüm oranının (%80) yüksek olması, tüberkülozda hücresel immünitenin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir[9].

*M.tuberculosis'*e karşı doğal immün yanıtta yer alan makrofaj ve dendritik hücreler, konağın basile karşı geliştirdiği T lenfosit yanıtının başlatılmasında da kritik rol oynamaktadır[9,31]. Kazanılmış T lenfosit yanıtını başlatan üç temel olay; antijen

sunumu, ko-stimülasyon ve sitokin sentezidir. Aktif tüberkülozu olan hastalarda, T hücre yanıtı ya yetersizdir ya da hiç yoktur. Bu üç olaydan birinde meydana gelen eksiklik veya dinamik bir inhibisyon, T hücre yanıtında yetersizlikle sonuçlanmaktadır[9].

Antijen Sunumu: T hücre yanıtı çoğunlukla antijene özgüldür ve MHC (Major Histocompatibility Complex) aracılığıyla gelişmektedir. Makrofaj ve dendritik hücreler, fagozomdaki mikobakteriyel proteinleri MHC sınıf II molekülü aracılığıyla $CD4^+$ T lenfositlerine, sitoplazmadaki mikobakteriyel proteinleri (antijen 85B) de MHC sınıf I aracılığıyla $CD8^+$ T lenfositlerine sunmaktadır[9, 31,32].

M.tuberculosis ile enfekte konakta MHC allellerinin ekspresyonunu, kişinin genetik yapısı, proinflamatuvar sitokinler (IFNγ) (MHC ekspresyonunu artırarak) ve antiinflamatuvar sitokinler (TGFβ) (MHC ekspresyonu azaltarak) etkilemektedir. Tüberküloz enfeksiyonu sırasında, makrofajlardan antiinflamatuvar sitokinlerin salınımı indüklenerek (LAM) ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımı inhibe edilerek (*M.tuberculosis* 19 kDa proteini) MHC ekspresyonu azalırken, bunun tam tersi olarak dendritik hücrelerde MHC ekspresyonu artmaktadır. Bu nedenle enfeksiyon sırasında antijen sunumu ile ilgili bir sorun yaşanmamaktadır[9,33].

Ko-stimülasyon: T hücre stimülasyonu için en çok bilinen ko-stimülatörler, CD80 (B-7.1) ve CD 86 (B-7.2)'dır. Bu moleküller aktive makrofaj ve dendritik hücrelerden sentezlenir ve T hücre yüzeyindeki CD28 ve CTLA-4' e bağlanır. Eğer yeterli bir ko-stimülasyon olmazsa T hücreleri apoptozise gider[9].

In-vitro deneylerde *M.tuberculosis* ile enfekte makrofajlardan B-7.1 salınımı azalırken, bakteri ile enfekte dendritik hücrelerden B-7.1 salınımının arttığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda *M.tuberculosis* enfeksiyonu sırasında ko-stimülasyonda bir problem olmamaktadır[9].

Sitokin Sentezi: Th1 aktivasyonu için, aktive makrofajlardan IL-12, IL-1 ve TNFα salgılanılmaktadır. Th1 lenfositleri, IFNγ sentezleyerek makrofaj aktivasyonunu ve nitrik oksit sentetazı aktive etmekte, ayrıca, enfekte fagositer hücreyi apoptozis, perforin ve granülozinler aracılığıyla yok ederek *M.tuberculosis*'in çoğalmasını durdurmaya çalışmaktadır. Th1 lenfositleri, B lenfosit yanıtını aktive ederek antikor sentezini de sağlamaktadır. Ancak *M.tuberculosis* bir hücre içi patojeni olduğu için, oluşan bu humoral immün yanıtın enfeksiyona karşı bir koruyuculuğu yoktur[7,9].

Makrofajlar ayrıca IL-4 salgılayarak Th2 cevabını da aktive eder. Th2, IL-4 ve IL-10 aracılığıyla IFNγ sentezini azaltarak makrofaj aktivasyonunu inhibe eder ve Th1 yanıtı sonucu oluşan doku hasarını sınırlamaya çalışır[9].

M.tuberculosis enfeksiyonu sırasında antiinflamatuvar sitokinlerin etkisiyle, Th1 aktivasyonu ve bu hücrelerden IFNγ sentezi azalmaktadır. Ama enfeksiyon sırasında, doğal öldürücü (NK) hücrelerden ve $CD8^+$ T lenfositlerinden de bir miktar IFNγ sentezi olduğu için, tüberkülozda IFNγ seviyesinde ciddi bir azalma meydana gelmediği ve esas sorunun makrofajların IFNγ'ya verdikleri cevapta azalma olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir[7,28,34-37].

CD8+ T Hücre Cevabı

Yapılan çalışmalar, *M.tuberculosis*'e karşı oluşan koruyucu immün yanıtta CD8 T hücrelerinin de katkısı olduğunu ortaya koymuştur. CD8 T hücreleri, akciğerlerde sınırlı düzeyde IFNγ sentezi yapar. Ayrıca salgıladıkları perforin ve granülozin aracılığıyla, enfeksiyon alanında fagosite ettiği basili öldürmede başarısız olan makrofajları lizise uğratır[1,7,9,32,38,39].

Sonuç olarak, eğer kişide primer veya kazanılmış bir immün yetmezlik durumu yoksa, *M.tuberculosis* enfeksiyonu sırasında yeterli bir T lenfosit cevabı oluştuğu görülmektedir. Enfeksiyonu sınırlandırmada başarısızlığa neden olan konağa veya basile ait faktörler, muhtemelen ya makrofajların bakteriyi tanıması ve hücresel immün yanıt ile lokal iltihabi yanıtı başlatması safhasında ya da makrofajların aktivasyonu safhasında etkili olmaktadır. Bu basamaklarda etkili olan faktörlerin açığa çıkarılması, *M.tuberculosis* patogenezini daha iyi anlamamızı, böylece basile karşı yeni tedavi stratejilerinin ve etkili aşıların geliştirilmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Fenton MJ, Vermeulen MW: Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. Infect Immun 1996, 64: 683-690.
2. Hirsch CS, Toossi Z, Johnson L, et al: Augmentation of apoptosis and interferon-γ production at sites of active *Mycobacterium tuberculosis* infection in human tuberculosis. J Infect Dis 2001, 183: 779-788.
3. Brennan PJ: Ultrastructure of *Mycobacterium tuberculosis*, p. 271-284. In: Bloom BR (ed), Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control. 1994, ASM Press, Washington DC.
4. Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ: Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. Glycobiology 2001, 11: 107-118.
5. Daffe M, Etienne G: The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. Tubercle Lung Dis 1999, 79: 153-169.
6. Brennan PJ: Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis 2003, 83: 91-97.
7. Flynn JL, Chan J: Immunology of tuberculosis. Ann Rev Immunol 2001, 19: 93-129.
8. Schluger NW, Rom WN: The host immune response to tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med 1998, 157: 679-691.
9. Reinout C, Tom HM, Jos WM: Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev 2002, 15: 294-309.
10. Salyers AA, Whitt DD (eds): Tuberculosis, p. 291-310. In: Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach. 2002, ASM Press, Washington DC.
11. Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, et al: Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptors. Science 2001, 291: 1544-1547.
12. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, et al: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. Science 1999, 285: 732-736.
13. Bean AGD, Roach DR, Briscoe H, et al: Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-target mice underline the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. J Immunol 1999, 162: 3504-3511.
14. Orme IM, Cooper AM: Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. Immunol Today 1999, 20: 307-312.

15. Arias M, Rojas M, Zabaleta J, et al: Inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Bcg^r and Bcg^s macrophages correlates with nitric oxide production. J Infect Dis 1997, 176: 1552-1558.

16. Abbas AK, Lichtman AH: Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system. 2001, WB Saunders Company, Philadelphia.

17. Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, et al: Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-α. J Immunol 1998, 161: 2636-2641.

18. Keane J, Remold HG, Kornfeld H, et al: Virulant *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-α. J Immunol 2000, 164: 2016-2020.

19. Keane J, Balcewic-Sablinski K, Remold HG, et al: Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. Infect Immun 1997, 65: 298-304.

20. Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S: Phagosome maturation: Aging gracefully. Biochem J 2002, 366: 689-704.

21. Bryk R, Lima CD, Erdjument-Bromage H, et al: Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. Science 2002, 295: 1073-1077.

22. Fliyn JL, Chan J: Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: Living with the enemy. Curr Opin Immunol 2003, 15: 450-455.

23. Scanga CA, Mohan VP, Tanaka K, et al: The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Infect Immun 2001, 69: 7711-7717.

24. Ladel CH, Szalay G, Riedel D, et al: IL-12 secretion *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. Infect Immun 1997, 65: 1936-1938.

25. Algood HMS, Chan J, Flynn JL: Chemokines and tuberculosis. Cytokine and Growth Factor Reviews 2003, 14: 467-477.

26. Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, et al: Depressed T-cell interferon-γ responses in pulmonary tuberculosis: Analysis of underlying mechanism and modulation with therapy. J Infect Dis 1999, 180: 2069-2073.

27. Rook GAW: The pathogenesis of tuberculosis. Ann Rev Microbiol 1996, 50: 259-284.

28. Altare F, Ensser A, Breiman A, et al: IL-12 receptor β1 deficiency in a patient with abdominal tuberculosis. J Infect Dis 2001, 184: 231-236.

29. Post FA, Manca C, Neyrolles O, et al: *Mycobacterium tuberculosis* 19 kDa lipoprotein inhibits *Mycobacterium smegmatis*-induced cytokine production by human macrophages in vitro. Infect Immun 2001, 69:1433-1439.

30. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (eds): Lungs and the upper respiratory tract, p. 420-425. In: Basic Pathology. 1997, 6th ed. WB Saunders Company, Philadelphia.

31. Jiao X, Lo-Man R, Guermonprez P, et al: Dendritic cells are host cells for *Mycobacterium* in vivo that trigger innate and acquired immunity. J Immunol 2002, 168: 1294-1301.

32. Geluk A, Meijgaarden KE, Franken KLMC, et al: Identification of major epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B that are recognized by HLA-A 0201-restricted $CD8^+$T cells in HLA-transgenic mice and humans. J Immunol 2000, 165: 6463-6471.

33. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, et al: Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol 2001, 167: 910-918.

34. Zhang M, Gong J, Presky DH, et al: Expression of the IL-12 receptor β1 and β2 subunits in human tuberculosis. J Immunol 1999, 162: 2441-2447.

35. Iho S, Yamamoto T, Takahashi T, et al: Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-γ production in vitro. J Immunol 1999, 163: 3642-3652.

36. Holland SM, Dorman SE, Kwon A, et al: Abnormal regulation of interferon-γ, interleukin-12, and tumor necrosis factor-α in human interferon-γ receptor 1 deficiency. J Infect Dis 1998, 178: 1095-1104.

37. Altare F, Durandy A, Lammas D, et al: Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. Science 1998, 280: 1432-1435.

38. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, et al: Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. Science 1997, 276: 1684-1687.

39. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science 1998, 282: 121-125.