

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇUKUROVA BÖLGESİ'NDEKİ *Mycobacterium tuberculosis*
SUŞLARININ FİLOGENETİK İLİŞKİSİNİN SNP İLE
İNCELENMESİ**

Nimet Büşra KARARMAZ

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Doç. Dr. Toğrul NAĞIYEV**

ADANA-2025

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇUKUROVA BÖLGESİ'NDEKİ *Mycobacterium tuberculosis* SUŞLARININ FİLOGENETİK İLİŞKİSİNİN SNP İLE İNCELENMESİ

Nimet Büşra KARARMAZ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Doç. Dr. Toğrul NAĞIYEV

**Bu çalışma TDK-2021-14347 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA-2025

KABUL VE ONAY



T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. .../.../2025

Nimet Büşra KARAMAZ

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesi sürecinde, bana yol gösteren, akademik bilgi ve deneyimlerini paylaşan, doktora tezinin en önemli yapı taşlarından olan “çalışmadan elde edilen verilerin yorumlanması, literatür ile kıyaslanması ve eleştirel düşünme” noktasında katkılarıyla yolumu aydınlatan değerli tez danışmanım Doç. Dr. Toğrul NAĞIYEV’e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimine başlamamdaki en büyük katkıyı sağlayan ve tez konumu belirlememde yardımcı olan ilk danışmanım Prof. Dr. Fatih KÖKSAL’a şükranlarımı sunarım.

Çukurova Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fügen YARKIN ve değerli öğretim üyelerine, doktora eğitimim boyunca verdikleri destek ve katkıları için teşekkür ederim.

Araştırmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen, bilimsel katkıları ve yönlendirmeleriyle bana yol gösteren hocalarıma şükran borçluyum. Laboratuvar çalışmalarında birlikte emek verdiğimiz, iş birliği ve dostluklarıyla bu süreci daha verimli ve keyifli kılan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca sabır ve anlayışla yanımda olan, manevi desteklerini her daim hissettiren aileme minnettarım. Bu sürecin son aşamasında hayatıma katılıp neşe kaynağım olan yeğenim Ertuğrul’a 2025 yılından sevgiyle selam gönderiyorum. Bu zorlu süreçte kendi önceliklerini bir kenara bırakarak beni sürekli motive eden Hakan YAVUZ’a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını yapma imkanı sunan Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın yürütülmesinde sağlanan imkânlar için Çukurova Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’na ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
ETİK BEYANI	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2 GENEL BİLGİLER	2
2.1.Tüberküloz ve Genetiği.....	2
2.2.Tek Nokta Polimorfizmi.....	3
2.3.Tüberkülozis Virülans Genleri	5
2.4.mce1 geni	6
2.4.1.mce1 Geninin Yapısı ve Fonksiyonu	7
2.4.2.mce1 Geninin İmmünolojik Etkileri.....	8
2.4.3.mce1 Geninin Klinik Önemi	8
2.5.phoPR Geni	8
2.5.1.phoPR Yapı ve Fonksiyonu	9
3 GEREÇ ve YÖNTEM.....	11
3.1.Örneklerin Toplanması.....	11
3.2.DNA Ekstraksiyonu	12
3.3.PCR Amplifikasyonu	12
3.4.Dizi Analizi	14
3.5.Yazılım ve Çalışma Ortamı	15
4 BULGULAR.....	16
4.1.İstatistiksel Analiz:	39
4.1.1.Post-hoc Test Sonuçları (H37Rv)	39
5 TARTIŞMA	41
6 SONUÇ ve ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	48
EKLER.....	52
ÖZGEÇMİŞ	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Çalışmada kullanılan primerlerin NCBI <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (Erişim numarası: NC_000962) referans suşunun genomu üzerinde gösterimleri.....	13
Şekil 2. Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait sekans uzunluğu ham veri histogramı.....	17
Şekil 3. Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait sekans uzunluğu ham veri boxplot analizi	18
Şekil 4. Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait GC içeriğini histogram ham veri grafiği.....	18
Şekil 5. Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait GC içeriğini boxplot ham veri grafiği.....	19
Şekil 6. Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait sekans uzunluğu dedup veri histogramı.....	21
Şekil 7. Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait sekans uzunluğu dedup veri boxplot grafiği ...	21
Şekil 8. Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait GC içeriğini dedup veri histogramı.....	22
Şekil 9. Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait GC içeriğini dedup veri boxplot grafiği.....	23
Şekil 10. Sekiz gen grubuna ait SNP yoğunluklarının referans suşlarla karşılaştırmalı boxplot gösterimi	26
Şekil 11. Sekiz gen grubuna ait pident dağılımlarının H37Rv ve H37Ra referans suşları ile karşılaştırmalı gösterimi	26
Şekil 12. Sekiz gen grubunun hizalama kalitesi: coverage ve pident değerlerinin H37Rv ve H37Ra referanslarıyla karşılaştırılması	27
Şekil 13. 4 numaralı örneğe ait yrbE1A gen bölgesinin <i>Mycobacterium canetti</i> ve <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv suşları ile BLAST hizalaması.....	38
Şekil 14. 4 numaralı örneğe ait yrbE1A gen bölgesi kromatogram datasının 640-660 baz diziliminden bir kesit	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan klinik izolatların direnç tablosu.....	11
Çizelge 2. Çalışmada kullanılan primerlerin listesi	13
Çizelge 3. PCR Reaksiyon Bileşenleri.....	14
Çizelge 4. PCR Döngü Koşulları	14
Çizelge 5. Çalışmada Kullanılan Yazılım Paketleri ve Çalışma Ortamları	15
Çizelge 6. Sekiz gen grubuna ait dizi uzunluğu ve GC içeriği özet istatistikleri.....	16
Çizelge 7. Çalışmada incelenen sekiz gen grubunun dizilemesi başarılı/başarısız örnek sayısı özetini	20
Çizelge 8. Çalışmada incelenen 8 gen grubunun sekans sonuçlarının.....	23
Çizelge 9. H37Rv referansına göre gen gruplarının SNP, GC ve uzunluk özet istatistikleri.....	24
Çizelge 10. H37Ra referansına göre gen gruplarının SNP, GC ve uzunluk özet istatistikleri.....	24
Çizelge 11. H37Rv referansına göre ilaç direnci dağılımı.....	25
Çizelge 12. <i>mce1R</i> gen gölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar	28
Çizelge 13. <i>mce1A</i> gen gölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar	30
Çizelge 14. <i>yrbE1A</i> gen gölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar	31
Çizelge 15. <i>yrbE1B</i> gen gölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar	32
Çizelge 16: <i>phoP</i> gen gölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar	34
Çizelge 17: <i>phoR</i> gen gölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar	36
Çizelge 18. Gruplara göre SNP yoğunluğu özet istatistikleri	39
Çizelge 19. SNP yoğunluğu için Dunn testi (Bonferroni düzeltmeli) sonuçları.....	39

KISALTMALAR

TB	Tuberculosis (Tüberküloz)
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleksi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
INS	İnserisyon
DEL	Delesyon
SUB	Substitüsyon
WGS	Whole Genome Sequencing (Tüm Genom Dizileme)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RT-PCR	Real Time PCR (Gerçek Zamanlı PCR)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
H37Rv	Virülan referans suş (<i>M. tuberculosis</i>)
H37Ra	Avirülan referans suş (<i>M. tuberculosis</i>)
mce1	Mammalian Cell Entry 1 Operonu
<i>phoPR</i>	İki Bileşenli Düzenleyici Sistem (<i>phoP</i> ve <i>phoR</i> genleri)
TCS	Two-Component System (İki Bileşenli Sistem)
ESX-1	Type VII Secretion System (Tip VII Salgı Sistemi)
CFP-10	Culture Filtrate Protein 10
ESAT-6	Early Secreted Antigenic Target 6
GC (%)	Guanin-Sitozin Oranı
bp	Base Pair (Baz Çifti)
ORF	Open Reading Frame (Açık Okuma Çerçevesi)
OMV	Outer Membrane Vesicle (Dış Zar Vezikülü)

ÖZET

Çukurova Bölgesi'ndeki *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının filogenetik ilişkisinin SNP ile incelenmesi

Tüberküloz, küresel ölçekte en önemli enfeksiyon hastalıklarından biri olmayı sürdürmektedir ve etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), yüksek genetik kararlılığına rağmen zaman içinde çeşitli mutasyonlara uğramaktadır. Bu mutasyonlardan özellikle tek nükleotid polimorfizm (SNP)'ler, bakterinin virülans mekanizmaları üzerinde belirleyici etkilere sahip olabilir. SNP'ler insersiyon, delesyon ve substitüsyon gibi farklı tiplerde ortaya çıkabilmekte ve protein yapısı, gen ekspresyonu ya da regülasyon yolları üzerinden patojenin biyolojisini etkilemektedir. Bu çalışmada, Çukurova Bölgesi'nde izole edilen, en az bir antitüberküloz ilaca dirençli *M. tuberculosis* suşlarının virülansla ilişkili olduğu öngörülen *mce1R*, *mce1A*, *yrbE1A*, *yrbE1A*, *phoP* ve *phoR* gen bölgelerinde SNP varlığının araştırılması, varsa suşlar arasındaki filogenetik ilişkinin incelenmesi amaçlandı. Bunun için DNA Dizi Analizi yöntemi uygulandı. NCBI veritabanına dayanılarak, H37Rv ve H37Ra referans suşlarındaki bu gen dizilimlerinin karşılaştırılması sonucunda yalnızca *phoP* geninde tek bir noktada transversiyon (C→T) olduğu belirlenmiş olup, bütün klinik izolatlarımız bu pozisyonda virülan H37Rv suşu ile aynı dizilimi gösterdi. *phoR* geninde, H37Rv referans suşunun 852910. pozisyonundaki C nükleotidinin bütün klinik örneklerimizde T ile yer değiştirdiği, ayrıca farklı klinik örneklerimizde *yrbE1A* geni başta olmak üzere bütün gen bölgelerinde çeşitli SNP'ler tespit edildiği gözlemlendi. Sonuç olarak, bu tez kapsamında *mce1* gen kümesi ve *phoPR* sistemi üzerinde yapılan SNP analizleri, insersiyon, delesyon ve substitüsyon şeklindeki bu farklı SNP tiplerinin *M. tuberculosis*'in virülans mekanizmalarını etkileyebileceğine dair ön veriler sağlamıştır.

Anahtar Sözcükler: *mce1*, *Mycobacterium tuberculosis*, *phoPR*, SNP, virülans

ABSTRACT

SNP-Based Phylogenetic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strains in the Çukurova Region

Tuberculosis remains one of the most significant infectious diseases worldwide, and its causative agent, the *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), undergoes various mutations over time despite its high genetic stability. Among these mutations, single nucleotide polymorphisms (SNPs) may have decisive effects on the bacterial virulence mechanisms. SNPs can occur as insertions, deletions, or substitutions, and may influence the pathogen's biology by altering protein structure, gene expression, or regulatory pathways. In this study, we aimed to investigate the presence of SNPs in the *mce1R*, *mce1A*, *yrbE1A*, *yrbE1A*, *phoP*, and *phoR* gene regions—predicted to be associated with virulence—in *M. tuberculosis* strains isolated from the Çukurova Region that are resistant to at least one anti-tuberculosis drug, and to examine possible phylogenetic relationships among these strains. For this purpose, DNA sequence analysis was performed. According to the NCBI database, comparison of these genes in the H37Rv and H37Ra reference strains revealed a single transversion (C→T) at one site in the *phoP* gene, where all our clinical isolates showed the same sequence as the virulent H37Rv strain. In the *phoR* gene, the C nucleotide at position 852910 in the H37Rv reference strain was replaced by T in all clinical samples. Moreover, various SNPs were detected across all gene regions, particularly in the *yrbE1A* gene, in different clinical isolates. In conclusion, the SNP analyses conducted on the *mce1* gene cluster and the *phoPR* system within the scope of this thesis provided preliminary evidence that these different SNP types insertions, deletions, and substitutions may influence the virulence mechanisms of *M. tuberculosis*.

Keywords: *mce1*, *Mycobacterium tuberculosis*, *phoPR*, SNP, virulence

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz, günümüzde küresel ölçekte en önemli enfeksiyon hastalıklarından biri olmaya devam etmektedir. Etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), DNA'sındaki yüksek G/C oranı nedeniyle genetik olarak kararlı bir yapıya sahip olmasına rağmen, zaman içerisinde çeşitli mutasyonlar geçirmektedir. Bu mutasyonlar arasında özellikle tek nükleotid polimorfizmleri (single-nucleotide polymorphism, SNP'ler), bakterinin patogeneğinde ve evrimsel süreçlerinde belirleyici rol oynamaktadır. SNP'ler; insersiyon, delesyon ve substitüsyon gibi farklı tiplerde ortaya çıkabilmekte; protein yapısı, gen ekspresyonu ve düzenleyici mekanizmalar üzerinde etkiler yaratarak patojenin biyolojisini şekillendirmektedir.

M. tuberculosis genomunda yatay gen transferi oldukça nadirdir; bu nedenle patojenite, ilaç direnci ve virülans ile ilişkili evrimsel kazanımların büyük ölçüde SNP'ler gibi nokta mutasyonlarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu özellik, *M. tuberculosis* popülasyon yapısının hiyerarşik bir formda şekillenmesine yol açmakta ve SNP'leri güçlü filogenetik belirteçler haline getirmektedir. SNP'ler yalnızca bakterinin evrimsel geçmişini anlamada değil, aynı zamanda farklı klinik suşların sınıflandırılmasında ve virülans mekanizmalarının anlaşılmasında da kritik öneme sahiptir.

Bu çalışmada, Çukurova Bölgesi'nden izole edilen ve en az bir antitüberküloz ilaca dirençli *M. tuberculosis* suşlarında, virülans ile ilişkili olduğu öngörülen *mce1R*, *mce1A*, *yrbE1A*, *yrbE1A*, *phoP* ve *phoR* gen bölgelerindeki SNP'lerin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, belirlenen varyasyonların klinik suşlar arasındaki filogenetik ilişkiye katkı sağlayıp sağlamadığının incelenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda DNA dizi analizi yöntemi kullanılarak, elde edilen bulguların *M. tuberculosis*'in virülans mekanizmaları ve genetik çeşitliliği üzerine yeni veriler sunması beklenmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberküloz ve Genetiği

Tüberküloz (TB), çoğunlukla *Mycobacterium tuberculosis* kompleksine ait türlerin yol açtığı, yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sebep olan önemli bir küresel sağlık sorunudur. Hastalık, özellikle çok ilaca dirençli suşların (multi drug resistance - MDR) ortaya çıkışı nedeniyle tedavi protokollerini ve halk sağlığı çalışmalarını zorlaştıran çok yönlü sorunlar barındırmaktadır. *M. tuberculosis*'in hem virülansının hem de ilaç direncinin genetik temellerini anlamak, etkili tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

M. tuberculosis'in genetiği, adaptasyon ve patojenitesine katkıda bulunan belirgin çeşitlilik ile karakterizedir (1). Tüm genom dizileme (Whole Genome Sequence, WGS), *M. tuberculosis* suşları arasındaki genetik çeşitliliği karakterize etmede güçlü bir yöntem olarak gelişmiş ve ilaç direnci ile ilişkili mutasyonların tanımlanmasına imkân sağlamıştır (2, 3). Örneğin, çalışmalar farklı *M. tuberculosis* soylarının çeşitli mutasyon hızlarına sahip olduğunu ve izoniazid (Isoniazid, INH) ile rifampisin (Rifampicin, RIF) gibi birinci basamak ilaçlara direnç kazandıran spesifik genetik belirleyiciler taşıdığını göstermiştir (4, 5). Bu genetik varyasyonlar arasında, ilaç direncinin doğru biçimde tanımlanmasında kritik öneme sahip olan katG ve rpoB gibi temel genlerdeki tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) bulunmaktadır (6, 7).

Ayrıca, *M. tuberculosis*'te genetik varyasyon yalnızca dirençe sınırlı değildir; virülansı da kapsamaktadır. Araştırmalar, belirli genetik mutasyonların, bakterinin konak bağışıklık yanıtlarından kaçma ve tedavi sırasında kalıcılığını artırma yeteneğini güçlendiren hipervirülan suşlara yol açabileceğini göstermektedir (8, 9). Örneğin, Öyäs ve ark. ile Copin ve ark. yaptığı çalışmalar belirli SNP'leri hem artan virülansla hem de stresli ortamlara uyum sağlama kapasitesiyle ilişkilendirmiştir; bu da *M. tuberculosis*'in genetik yapısının hem patojenik potansiyelini hem de tedavi sonuçlarını etkilediğini düşündürmektedir (10, 11).

Klinik uygulamalarda yönetim genellikle MDR izolatlarının varlığını belirlemek amacıyla hızlı genotiplendirme ile başlamaktadır; bu durum tedavi etkinliği ve hasta bakımı açısından belirleyici olmaktadır (2, 12). Genetik altyapı anlaşılmadan başlatılan

tedaviler etkisiz rejimlere yol açabilmektedir, çünkü bazı suşlar sık kullanılan anti-tüberküloz ilaçlarına direnç göstermektedir. Bu nedenle, moleküler tanı teknikleri, ilaç dirençli suşların hızla tanımlanması ve tedavinin buna göre düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadır (13). Moleküler genetikteki bu ilerlemeler, ayrıca tüberküloz hastaları için tedavi planlarının kişiselleştirilmesine katkı sağlayabilen farmakogenomik yaklaşımlarla da desteklenmektedir (14, 12).

Sonuç olarak, tüberküloz genetiği, klinik yönetim uygulamaları ve tıbbi müdahalenin ilk adımları arasındaki kesişim, TB epidemisinin etkin bir şekilde ele alınmasında kritik öneme sahiptir. Genomik araştırmalar, *M. tuberculosis*'in genetik çeşitliliğinin karmaşık yapısını aydınlatmaya devam ettikçe, elde edilen genomik verilerin klinik uygulamalara dahil edilmesinin tüberkülozun tanı, tedavi ve kontrol stratejilerinin doğruluğunu ve etkinliğini artıracak her geçen gün daha açık biçimde anlaşılmaktadır.

2.2.Tek Nokta Polimorfizmi

Tek nükleotid polimorfizmleri (single-nucleotide polymorphism, SNP), genomda tek bir nükleotid pozisyonunda meydana gelen ve aynı türün bireyleri arasında DNA dizisinde farklılık oluşturan varyasyonlardır. İnsan genomundaki genetik varyasyonun %90'ından fazlasını temsil eden, en yaygın genetik çeşitlilik türlerinden biridir (1). SNP'ler, genlerin kodlayıcı bölgelerinde ortaya çıkabilir ve aminoasit dizilerini etkileyebilir; ayrıca kodlamayan bölgelerde de bulunarak gen düzenlenmesi ve ekspresyonunu etkileyebilir.

SNP'ler, biyolojik süreçlerde önemli roller üstlenmekte olup genetik çeşitlilik ve belirli hastalıklara yatkınlık için kritik belirteçlerdir. Bulundukları konuma ve fonksiyonel bağlama göre farklı sonuçlar doğurabilirler. Örneğin, non-sinonim SNP'ler - yani kodlanan proteinde bir aminoasit değişikliğine yol açanlar- protein fonksiyonunu değiştirebilir ve bu durum bireylerin hastalıklara ya da ilaçlara verdiği yanıtı etkileyebilir (2, 3). Her ne kadar aminoasit dizisini değiştirmeseler de, sinonim SNP'ler mRNA stabilitesi veya translasyon verimliliği üzerinde rol oynayarak gen ekspresyonunu etkileyebilir.

M. tuberculosis bağlamında SNP'ler, genetik çeşitliliğin ve ilaç direncinin evrimsel süreçlerinin anlaşılmasında temel belirteçlerdir. Örneğin, tüm genom dizileme,

klirik izolatlari ayirt eden spesifik SNP'lerin tanimlanmasina imkan vermekte; bu sayede farklı suşlar arasındaki ilişkileri ortaya koyan filogenetik ağaçların oluşturulması mümkün olmaktadır (15). Genetik belirteçler aynı zamanda bulaşma yollarının aydınlatılmasına da katkı sağlamaktadır. Wang ve arkadaşlarının (16) 2009–2018 yılları arasında Şanghay'da yürüttükleri moleküler epidemiyolojik çalışmada, kültür-pozitif *Mycobacterium tuberculosis* olguları tüm genom dizilemesi ile incelenmiştir. Bu kapsamda, iki izolat arasında tüm genom karşılaştırması sonucunda 12 veya daha az SNP farkı saptandığında, bu isolatlar aynı bulaşım kümesi (transmission cluster) olarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 345 hastanın 94'ü (%27,25), bu eşik değere göre 42 genomik küme içerisinde sınıflandırılmış ve yerel bulaşın varlığı ortaya konmuştur. Bulgular, sağlık sisteminde 14 günden uzun süren gecikmelerin, 14 günden kısa sürenlere kıyasla kümeleşme riskini anlamlı biçimde artırdığını göstermiştir. Ayrıca 65 yaş altında olmak, yerleşik ikamet statüsüne sahip bulunmak, Pekin genotipine ait suşlarla enfekte olmak ve izoniazid direncine sahip olmak kümeleşme ile ilişkili ek risk faktörleri olarak belirlenmiştir. Çalışma, sağlık sistemindeki gecikmelerin tüberkülozun yayılımında kritik rol oynadığını ve izoniazid dirençli hastaların temas araştırmalarında öncelikli gruplar olarak ele alınması gerektiğini vurgulamaktadır. Bu bulgular, epidemiyolojik araştırmalar açısından büyük önem taşımakta ve hem bulaş zincirlerinin hem de hastalık kontrol stratejilerinin belirlenmesinde yol gösterici nitelik taşımaktadır.

SNP'ler, *M. tuberculosis*'in patogenezinin ve konağın bağışıklık sistemiyle etkileşiminin anlaşılmasında kilit unsurlardır. Örneğin, sitokinleri kodlayan konak genlerindeki bazı SNP'lerin TB'ye duyarlılık farklılıklarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. IL-1 β ve Toll-like reseptör 2 genlerindeki polimorfizmler, akciğer dışı TB riskinin artışıyla ilişkilendirilmiştir (17). Bu varyasyonlar, bağışıklık yanıtında görevli sitokin düzeylerini değiştirebilir ve konağın enfeksiyonu kontrol etme kapasitesini etkileyebilir. Özellikle interlökin-6 promotör bölgesindeki rs1800796 SNP'si, TB'ye duyarlılıkla anlamlı biçimde ilişkilendirilmiştir. Bu da enflamatuvar yanıt farklılıklarının hastalık fenotipini etkileyebileceğini göstermektedir (18).

Konak SNP'leri ile *M. tuberculosis* SNP'lerinin kesişimi, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde dikkat çekmektedir. Patojen genomundaki SNP'ler, rifampisin ve izoniazid gibi birinci basamak ilaçlara direnç kazandırarak tedavi rejimlerini zorlaştırabilmektedir (19). Dirençle ilişkili SNP'lerin belirlenmesi,

klinisyenlerin tedavi protokollerini buna göre uyarlamasına olanak tanımakta ve klinik sonuçların iyileştirilmesini sağlayabilmektedir. Bu genetik varyasyonların anlaşılması, kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımının TB'ye uygulanmasına katkıda bulunmakta ve ilaç dirençli suşların küresel ölçekte oluşturduğu zorlukların daha etkili biçimde ele alınmasına yardımcı olmaktadır.

Ayrıca, konağın bağışıklık yanıtını kolaylaştıran veya engelleyen genetik faktörler de hastalığın epidemiyolojisine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Konak SNP'leri ile patojen SNP'lerinin etkileşimi, TB'ye yatkınlık ve dirençteki genetik karmaşıklığı gözler önüne sermektedir (20). Konak ve patojenin birlikte evrimi, TB'nin kontrolüne yönelik halk sağlığı müdahalelerinde genetik araştırmaların önemini ortaya koymaktadır.

Özetle, hem *M. tuberculosis* hem de konak genomundaki SNP'ler, TB'nin genetik yapısının anlaşılmasında temel bir yere sahiptir. Bu SNP'ler yalnızca patojenin evrimsel dinamikleri ve epidemiyolojik ağları hakkında bilgi sağlamakla kalmamakta, aynı zamanda TB yönetim stratejilerini küresel ölçekte güçlendirebilecek potansiyel müdahale hedeflerini de ortaya çıkarmaktadır.

2.3. Tüberkülozis Virülans Genleri

Tüberkülozun (TB) etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*)'in virülansı çok faktörlüdür. Patojenin konağı enfekte etme, hayatta kalma ve bağışıklık sisteminden kaçma kapasitesini artıran çeşitli genler ve genetik belirleyiciler virülansı oluşturan belli başlı faktörlerdir. Araştırmalar, *M. tuberculosis*'in patojenitesinde rol oynayan bazı temel virülans genlerini ve işlevlerini ortaya koyarak tüberküloz enfeksiyonlarının altında yatan karmaşık mekanizmaları aydınlatmıştır.

M. tuberculosis'teki kritik virülans faktörlerinden biri ESX-1 (ESAT-6 Secretion System, ESAT-6 Salgı Sistemi) salgı sistemidir. Bu sistem, bakterinin makrofajlar içinde hayatta kalması için zorunludur. ESAT-6 (Early Secreted Antigenic Target 6 kDa, Erken Sekretuar Antijenik Hedef 6 kDa) ve CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10 kDa, Kültür Filtrat Proteini 10 kDa) gibi proteinlerin salgılanmasını sağlayarak konak bağışıklık yanıtlarını manipüle etmekte ve fagosom bütünlüğünü bozarak hücre içi kalıcılığı desteklemektedir (21, 22). ESX-1'in fagosom olgunlaşmasını bozması, bakterinin bağışıklık hücreleri içinde kalıcı hale gelmesine ve çoğalmasına imkân tanımaktadır (22).

Bunun yanı sıra, lipoarabinomannan (LAM) gibi lipoproteinler de önemli virülans faktörleridir. LAM, fagosom olgunlaşmasını engelleyebilmekte ve enflamatuvar yolları aktive ederek bakterinin enfeksiyonu başlatma kapasitesini artırabilmektedir [Welin et al., (22)]. Ayrıca mikobakteri hücre duvarında bulunan trehaloz dimikolat (TDM) da fagosom olgunlaşmasını bloke etmekte ve *M. tuberculosis*'in bağışıklıktan kaçmasına yardımcı olmaktadır (23).

M. tuberculosis'in genom analizleri, RD1 gibi farklılık bölgelerini (region of difference) ortaya çıkarmıştır. RD1 bölgesi birçok suşta virülansla ilişkili olup, BCG (Bacillus Calmette-Guérin) aşı suşunda bu bölgenin kaybı onun avirulan olmasına katkıda bulunmaktadır (24). Ayrıca fosfolipaz C gen ailesi (*plcA*, *plcB*, *plcC* ve *plcD*) üzerine yapılan çalışmalar, bu genlerin bakterinin konak hücreleriyle etkileşimini kolaylaştırarak *M. tuberculosis* virülansına topluca katkıda bulunduğunu göstermiştir (25).

Virülansın bir diğer önemli yönü, PE-PGRS protein ailesi ile ilişkilidir. Hücre yüzeyinde bulunan bu proteinler, bakteriyel adezyonu ve bağışıklıktan kaçışı etkilemektedir (26). Benzer şekilde, Mce (mammalian cell entry) proteinleri de *M. tuberculosis*'in makrofajlara girişini ve bu hücrelerde yaşamını sürdürmesini kolaylaştırmakta, bu da patojenitesi açısından kritik bir belirleyici olmaktadır (27).

Ayrıca, virülans gen ekspresyonunun düzenlenmesi de *M. tuberculosis* patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Sigma faktörleri gibi çeşitli düzenleyici proteinler, çevresel uyaranlara yanıt olarak virülans genlerinin transkripsiyonunu düzenlemekte ve bakterinin konak içinde adaptasyonunu etkilemektedir (28, 29).

Sonuç olarak, *Mycobacterium tuberculosis* virülansı, konağın dokularını istila etmeyi, bağışıklık yanıtından kaçmayı ve kronik enfeksiyonlar kurmayı mümkün kılan genetik faktörlerin karmaşık etkileşimleriyle belirlenmektedir. Bu virülans genleri ve mekanizmalarının anlaşılması, yalnızca tüberküloz patogenezinin dair bilgilerimizi derinleştirmekle kalmaz, aynı zamanda yeni tedavi ve aşı stratejileri için potansiyel hedefleri de ortaya koyar.

2.4.mce1 geni

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*)'in *mce1* operonu, bakterinin memeli hücrelerine girebilme kapasitesi ve virülansına katkısı ile ilişkili önemli bir genetik bileşendir. Bu operon, patojenin yaşam döngüsü için, özellikle konak hücrelerle

etkileşiminde kritik öneme sahip olan altı farklı proteini (*mce1A*'dan *mce1F*'ye) kodlamaktadır.

2.4.1. *mce1* Geninin Yapısı ve Fonksiyonu

Lipit alımı ve taşınmasında görev alan membran proteinlerini kodlayan birçok gen *mce1* geninde bulunmaktadır (30, 31). Bu operonun ekspresyonu, bakterinin enfeksiyon sırasında konağa ait lipitleri kullanabilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Özellikle *mce1* operonu, lipitlerin alınmasını ve metabolizmasını kolaylaştırmakta, bu da *M. tuberculosis*'in konak içerisinde hayatta kalması için yaşamsal önem taşımaktadır (32, 33). Çalışmalar, *mce1* geninin kodladığı proteinlerin bakterinin hücre duvarında yer aldığını ve bu konumlarının, konak bağışıklık sistemiyle etkileşimdeki rollerini belirginleştirdiğini göstermektedir (30, 34).

Virülans üzerinde değişikliklerini gözlemlemek amacıyla *mce1* geni silindiğinde, farklılıklar görülmüştür. Örneğin, *mce1* operonundan yoksun mutant bir suş, deneysel modellerde hipervirulan fenotip sergilemiş; enfeksiyonu kontrol etme kapasitesinde azalma ve hastalığın daha fazla yayılımı ile karakterize edilmiştir (35, 36). Buna karşılık, sağlam bir *mce1* operonunun varlığı daha kontrollü bir enfeksiyonla ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular, *mce1* gen bölgesine ait ürünlerin *M. tuberculosis* enfeksiyonu sırasında konağın aşırı inflamatuvar yanıtını baskılayarak, bağışıklık tepkisini daha düzenli ve granülom oluşumuna yatkın bir şekilde yönlendirdiğini göstermektedir. Böylece, konak dokusunda bakteri için elverişli bir yaşam nişi oluşturulurken, doku hasarının ölümcül boyutlara ulaşması da geciktirilmektedir.

Ekstraselüler ve intraselüler koşullar arasında, *mce1* genlerinin ekspresyonu sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Makrofajlar içinde *mce1* operonunun baskılandığı gözlenmiş, bu da bakterinin agresif bağışıklık ortamına uyum sağlamasına olanak tanımaktadır (37, 38). Negatif bir transkripsiyonel düzenleyici olan *mce1R*, *M. tuberculosis* makrofajlar içinde bulunduğu bu genleri baskılamakta; bu da bakterinin konağın savunmalarına karşı metabolizmasını ve kaçış stratejilerini düzenleyebilme yeteneğini ortaya koymaktadır (38, 39).

2.4.2. *mce1* Geninin İmmünolojik Etkileri

mce1 operonu, konağın bağışıklık yanıtını da etkilemektedir. Petrilli ve ark. (40) ile Stavrum ve ark. (34) yaptığı çalışmalar, *mce1* proteinlerinin konak bileşenleriyle etkileşiminin inflamatuvar yanıtları modüle edebileceğini ve etkin bağışıklık mekanizmalarını zayıflatabileceğini öne sürmektedir. *mce1* proteinlerinin, makrofaj aktivasyon profillerini değiştirerek sitokin üretimini ve enfeksiyonun genel seyrini etkileyebileceği düşünülmektedir (40).

2.4.3. *mce1* Geninin Klinik Önemi

mce1 operonunun anlaşılması, tüberküloza karşı yeni müdahale stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Hücre girişini ve lipit metabolizmasını destekleyici rolü, enfeksiyonun bulaşmasını ve yerleşmesini engellemeye yönelik ilaç geliştirme çalışmaları için potansiyel hedefler sunmaktadır (41, 36). Ayrıca, *mce1* operonundaki SNP'ler üzerine yapılan korelasyon çalışmaları, farklı *M. tuberculosis* suşlarının genetik çeşitliliği ve evrimsel adaptasyonları hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu da aşı geliştirme ve tedavi stratejileri için önemli sonuçlar doğurabilir (41, 42).

mce1 operonu, *M. tuberculosis*'in virülansı ve adaptasyonu açısından kritik bir bileşendir. Bu operonun proteinleri yalnızca konağa girişe aracılık etmekle kalmayıp, aynı zamanda bakterinin bağışıklık yanıtlarını etkili şekilde modüle etmesine de olanak tanımaktadır. Böylece tüberküloz patogenezi doğrudan etkilemektedir. Bu operon üzerine devam eden araştırmalar, gelecekte tüberküloza yönelik terapötik ve koruyucu stratejiler için değerli bilgiler sağlayabilir.

2.5. *phoPR* Geni

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*)'in *phoPR* gen kümesi, bakterinin konak bağışıklık ortamına adaptasyonunu ve virülansını etkileyen iki bileşenli düzenleyici sistemin (two-component system, TCS) önemli bir parçasıdır. *phoPR* sistemi iki ana genden oluşmaktadır: *phoP*, bir yanıt düzenleyicisi; *phoR*, bir sensör kinazdır. Birlikte çevresel uyarılara, özellikle de konak hücre fagosomlarında karşılaşılan asidik koşullara yanıt olarak gen ekspresyonunu düzenleyen bir sinyal yolunu oluştururlar.

2.5.1. *phoPR* Yapı ve Fonksiyonu

phoP, virölans, lipid metabolizması ve direnç mekanizmalarında görev alan birçok akış aşağı (downstream) genin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörünü kodlar (43). *phoR*, çevresel değişiklikleri algılayan ve *phoP*'yi fosforile ederek onun transkripsiyonel düzenleyici fonksiyonlarını aktive eden sensör kinazdır (44). *phoPR* iki bileşenli düzenleyici sistemi, *M. tuberculosis* genomunun yaklaşık %2'sinde yer alan genlerin ekspresyonunu kontrol etmekte ve lipid biyosentezi, stres yanıt mekanizmaları ile virölans faktörlerinin sekresyonu gibi pek çok biyolojik süreci düzenlemektedir (45, 46). Özellikle fagosomun asidik pH'sına uyum sağlamada rol alan genleri düzenlediği ve böylece bakterinin hayatta kalmasına ve patojenitesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (47, 48).

Araştırmalar, *phoPR* iki bileşenli sisteminin enfeksiyon sırasında makrofajlarda oluşan asidik ortamda aktive olduğunu göstermektedir (48, 47). Bu aktivasyon, bakterinin bağışıklık hücreleri içinde hayatta kalabilmesi için gerekli genlerin ekspresyonunu indüklemektedir.

phoPR sistemi, ESX-1 salgı sistemi aracılığıyla virölans faktörlerinin taşınmasında görev alan genler dahil olmak üzere çeşitli virölans ilişkili genleri düzenlemektedir (47, 49). Bu salgı sistemi, *M. tuberculosis kompleks*'in bağışıklık sistemi tarafından tespit edilmesini ve ortadan kaldırılmasını engelleyen immünomodülatör proteinlerin iletilmesinde kritik öneme sahiptir.

phoPR, patojenin konakta karşılaştığı oksidatif ve nitroztatif stresle başa çıkma yeteneğiyle ilişkili genleri düzenlemektedir (50). Ayrıca lipid metabolizmasındaki rolü, hücre duvarı bütünlüğünün korunması açısından yaşamsaldır ve bu da konak savunmalarına dirençte kritik öneme sahiptir (43, 51).

phoPR'nin, bakteriyel virölans profilini düzenleyerek aşı güvenliği ve etkinliğini etkilediği bildirilmiştir (52). Düzenleyici mekanizmalarının anlaşılması, canlı atenüe aşılarda tasarımıda iyileştirmeler sağlayabilir. *phoPR*'deki mutasyonlar, farklı *M. tuberculosis* suşları arasında virölans farklılıklarıyla ilişkilendirilmiş olup, konak ortamlarına adaptasyondaki evrimsel önemini vurgulamaktadır (46, 53). *phoR* genindeki varyantlar, bakterinin pH yanıtını etkileyebilir ve virölansı değiştirebilir (45, 54).

Virölans faktörlerinin ve stres yanıtlarının düzenlenmesindeki merkezi rolü göz önüne alındığında, *phoPR* sistemi, bakterinin konak içinde hayatta kalma yeteneğini

devre dışı bırakmayı amaçlayan yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için umut verici bir hedef sunmaktadır (55, 56).

Mycobacterium tuberculosis'teki *phoPR* iki bileşenli sistemi, bakterinin konak kaynaklı stres faktörlerini algılayıp yanıt verme kapasitesinin ayrılmaz bir parçasıdır. Çeşitli virölans faktörleri ve adaptif yanıtları düzenleyerek bakterinin kalıcılığı ve patojenitesinde kritik bir rol oynamakta, bu nedenle tüberküloz araştırmalarında önemli bir odak noktası oluşturmaktadır.



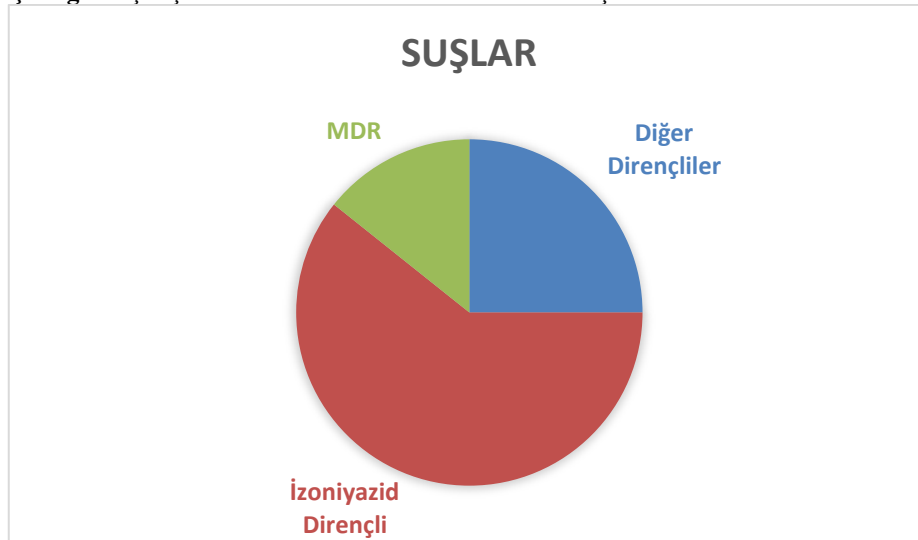
3 GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Örneklerin Toplanması

Bu çalışmaya, Ocak 2019 – Ocak 2022 arasında Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne gelen klinik izolatlardan birinci seçenек antitüberküloz ilaçlardan en az birine dirençli 28 örnek dahil edildi.

Ocak 2019 – Ocak 2022 arasında Çukurova Üniversitesi Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne gönderilen balgam örnekleri, rutin tüberküloz tanısına göre incelemeye alındı. Direkt yayması gerçekleştirilen örneklerin, %4 NaOH-NALC yöntemine göre dekontaminasyon- homojenizasyon ve konsantrasyon işlemleri sonrasında teksif yaymaları yapılarak bir sıvı (BACTEC MGIT 960 otomatize sistem) bir katı besiyerine (Löwenstein-Jensen) ekimleri yapıldı. Kültür sonucu pozitif olan örneklerin *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi (MTBC) ve Tüberküloz Dışı Mikobakteri (TDM) ayrımını yapabilmek için BD MGIT TBc Identification (MPT64) kart testiyle fenotipik ayrımı gerçekleştirildi. MTBC grubundan olduğu saptanan örneklerin, birinci seçenек antimikobakteriyel ilaç duyarlılık testi yapıldı. Test sonucunda; 0,1 µg/ml izoniyazid, 2 µg/ml rifampisin, 2,5 µg/ml etambutol ya da 2 µg/ml streptomisin varlığında elde edilen üreme indeksi kontrol tüpünden fazla ise (>%1) örnek en az bir antimikobakteriyel ilaca dirençli olarak kabul edildi.

Çizelge 1: Çalışmada kullanılan klinik izolatların direnç tablosu



3.2.DNA Ekstraksiyonu

En az bir antimikobakteriyel ilaca dirençli olduğu belirlenen ve rastgele seçilen 28 örneğe MICKLE ekstraksiyon protokolü uygulandı.

Antimikobakteriyel duyarlılık testi gerçekleştirilen örneklerin kontrol tüpleri santrifüj edildi:

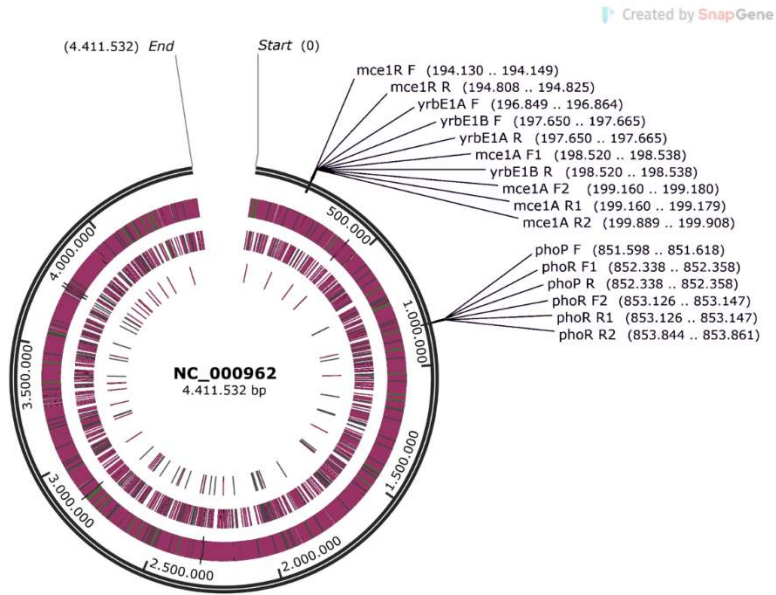
1. Santrifüj edilen örneğin süpernatant kısmının bir bölümü döküldü
2. Pastör pipetiyle pellet kısmından 0,5 ml alınıp eppendorf tüpüne alındı
3. 80 °C ısı bloğunda 30 dakika bekletildi
4. Örnekler 12700 rpm'de (15000 g (Eppendorf Soğutmalı Micro santrifüj cihazında, GERMANY)) 15 dakika santrifüj edilip üsteki sıvı döküldü
5. Kalan pellet üzerine 500µl Tris-EDTA (TE) Buffer eklendi ve pipetaj işlemi yapıldı
6. 12700 rpm (15000 g) 15 dakika santrifüj edilip üsteki sıvı döküldü
7. Pellet üzerine 250µl TE Buffer eklendi ve pipetaj yapıldı
8. 100-150 hacimde cam boncuk eklenip 2 dakika Mickle cihazında mekanik işleme tabi tutuldu
9. 12700 rpm'de (15000 g) 15 dakika santrifüj edildi
10. Santrifüj işleminden sonra üstteki sıvı DNA olarak alındı
11. -20 °C'de muhafaza edildi

3.3. PCR Amplifikasyonu

Amplifikasyon için *mce* ve *phoP* gen bölgelerinden SnapGene ve BLAST programı aracılığıyla primer çiftleri tasarlandı. Primer dizileri Çizelge 2'de sunulmuştur. Çalışmada kullanılan primerlerin NCBI *Mycobacterium tuberculosis*H37Rv (Erişim numarası: NC_000962) referans suşunun genomu üzerinde gösterimleri Şekil 2'de yer almaktadır.

Çizelge 2: Çalışmada kullanılan primerlerin listesi

Primer Listesi		
Gen Bölgesinin Adı	Primer Dizisi	Ürün Boyutu
<i>mce1 R</i> Transkripsiyonel regülatör	F: 5'cgaagacttcggtctcagcc R: 5'ggcaagccacgtgaacg	696 bp
<i>yrbE1A</i> membran proteini	F: 5' gagggagccgcggtga R: 5' cgacatgtcagcgccc	817 bp
<i>yrbE1A</i> membran proteini	F: 5' gggcgctgacatgtcg R: 5' gtcatgcggctacaccgtg	889 bp
<i>mce1 A</i> mammalian cell entry	F1: 5'cacggtgtagccgcatgac R1: 5'ccgccaattgctgaatgtcg F2: 5'cgacattcagcaattggcggc R2: 5'ccagtgatttcatgggttg	660 bp 749 bp
<i>phoP</i>	F: 5'cggtcaaccaatgcggaaggg R: 5'ccaagactcatcgaggctccc	761 bp
<i>phoR</i>	F: 5'gggagcctcgatgagtcttgg R: 5'cgcatccggctcctctgaatccc F: 5'gggattcagaggaccggatgcg R: 5'ggccaagatcaggggcggc	810 bp 736 bp



Şekil 1: Çalışmada kullanılan primerlerin NCBI Mycobacterium tuberculosisH37Rv (Erişim numarası: NC_000962) referans suşunun genomu üzerinde gösterimleri

Çizelge 3: PCR Reaksiyon Bileşenleri

Bileşen	Hacim / Oran
Taq DNA 5X Master Mix	10 µl
Primer (F)	1.25 µl (25 pmol)
Primer (R)	1.25 µl (25 pmol)
DMSO	2.5 µl
Şablon DNA	12.5 µl
Nükleaz içermeyen su	22.5 µl
Toplam hacim	50 µl

Çizelge 4: PCR Döngü Koşulları

PCR Döngü Koşulları	Süre	Sıcaklık	30 Döngü
Başlangıç denatürasyonu	5 dk	95 °C	
Denatürasyon	30 sn	95 °C	
Primer bağlanması	30 sn	55 °C	
Uzama	1 dk	72 °C	
Final uzama	5 dk	72 °C	
Bekleme	∞	4 °C	

3.4.Dizi Analizi

ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) otomatize sistemi kullanılarak, “F.Sanger’in dideoksi zincir sonlandırma yöntemi” prensiplerine göre tek yönlü (yalnızca F primeri kullanılarak) dizi analizi yapıldı.

PCR ile çoğaltılan ürünler, ileriye dönük dizi analizi için hazırlandı. Bu kapsamda, her örnekten >20 µl PCR ürünü elde edilmiş ve her hedef gen için 10 pmol ileri (F) primer ayrılmıştır. Elde edilen ampliconlar, saflaştırma ve dizi reaksiyonlarının kurulumu için Telomer Yaşam Bilimleri Lab. Cihazları Ve Kim. firması aracılığı ile Humanizing Genomics MacroGen firmasının Ankara şubesindeki hizmet laboratuvarına gönderilmiştir. Dizi analizi, ilgili firma tarafından Sanger yöntemi (BigDye Terminator Cycle Sequencing) kullanılarak tek yönlü (ileri primer) şekilde gerçekleştirilmiştir.

Dizi analizi ile elde edilen veriler, “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) web sayfasındaki BLAST programı kullanılarak (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) gen bankası veri tabanı ile karşılaştırılacaktır. Karşılaştırmak için “nucleotide-nucleotide blast” (blastn) programı seçildi.

3.5. Yazılım ve Çalışma Ortamı

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen veri analizi ve görselleştirme işlemleri, Python programlama dili (sürüm 3.11) kullanılarak yürütülmüştür. Biyoenformatik ön işleme ve hizalama adımlarında BLAST+ (2.14.1), seqkit (2.8.1) ve Biopython (1.85) kütüphaneleri kullanılmıştır. İstatistiksel analiz ve veri düzenleme aşamaları için pandas (2.3.2) ve numpy (2.3.2) tercih edilmiştir. Grafiksel görselleştirmeler matplotlib (3.10.5) ve seaborn (0.13.2) kütüphaneleri ile üretilmiş, elde edilen sonuçların tablo formatına dönüştürülmesinde openpyxl (3.1.5) ve xlsxwriter (3.2.2) kütüphanelerinden yararlanılmıştır. Tüm analizler Linux tabanlı Ubuntu 22.04 (64-bit) işletim sistemi üzerinde, Miniconda ortamı (bio environment) kullanılarak tekrarlanabilir bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5: Çalışmada Kullanılan Yazılım Paketleri ve Çalışma Ortamları

Yazılım / Paket	Versiyon	Kullanım Amacı
Python	3.11	Programlama, veri analizi ve görselleştirme
pandas	2.3.2	Tablo verilerini işleme ve analiz
seaborn	0.13.2	İstatistiksel görselleştirme (boxplot, histogram, vb.)
matplotlib	3.10.5	Genel grafik çizimi ve özelleştirme
openpyxl	3.1.5	Excel dosyalarına yazma/okuma
xlsxwriter	-	Excel çıktıları üretme motoru
biopython (SeqIO)	-	FASTA dosyalarının okunması ve işlenmesi
NCBI BLAST+ (blastn, makeblastdb)	-	Referanslarla hizalama ve veritabanı oluşturma
SeqKit	-	FASTA kalite kontrol, uzunluk ve GC analizi, motif arama
awk / bash / coreutils	-	Dosya temizleme, QC filtreleme, otomasyon
Ubuntu (WSL2)	-	Çalışma ortamı (işletim sistemi)
Conda ortamı	bio	Paket yönetimi ve sanal ortam

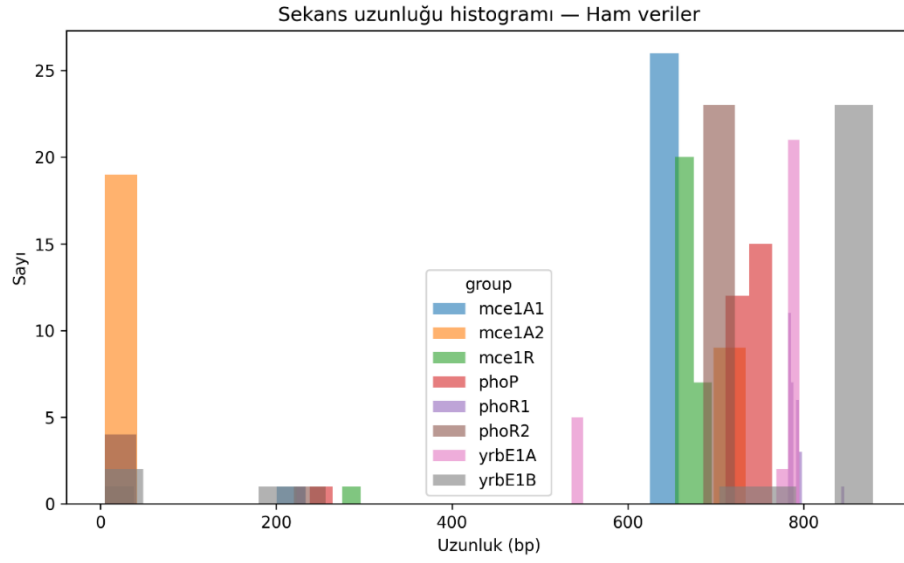
4 BULGULAR

“Çukurova Bölgesi’ndeki Mycobacterium tuberculosis Suşlarının Filogenetik İlişkisinin Snp İle İncelenmesi” adlı doktora tez çalışmasında elde edilen PCR ürünleri sekanslanmış ve her gen grubuna ait dizi uzunluğu ile GC içerikleri değerlendirilmiştir. Çizelge 6’da sunulan özet istatistikler, sekansların genel kalite ve biyolojik uyumunu ortaya koymaktadır. Bulgulara göre, çoğu gen grubunda dizi uzunlukları beklenen amplikon boylarıyla uyumlu bulunurken, *mce1 A2* grubunda ortalama uzunluğun belirgin şekilde düşük ve standart sapmanın yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, özellikle *mce1 A2* için amplifikasyon veya sekanslama sırasında teknik sorunların yaşanmış olabileceğini düşündürmektedir.

GC içerikleri incelendiğinde, gen gruplarının büyük çoğunluğu %58–66 bandında toplanmış olup bu değerler *M. tuberculosis* kompleksinin bilinen yüksek GC profiliyle uyumludur. Ancak *mce1 A2* grubunda hem düşük ortalama hem de sıfıra yakın medyan değerler dikkat çekmektedir; bu da biyolojik farklılıktan ziyade düşük kaliteli veya başarısız dizilerin etkisini işaret etmektedir. Genel olarak tablo, çalışmada kullanılan dizilerin çoğunluğunun biyolojik açıdan güvenilir olduğunu, ancak bazı gruplarda teknik kaynaklı varyasyonların analizlere yansımış olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 6: Sekiz gen grubuna ait dizi uzunluğu ve GC içeriği özet istatistikleri

Grup	Dizi Uzunluğu			GC İçeriği			Gruptaki örnek sayısı
	ortalama	standart sapma (sd ±)	medyan	ortalama	standart sapma (sd ±)	medyan	
<i>mce1A1</i>	602.50	141.70	638.0	56.20	11.06	58.39	28
<i>mce1A2</i>	238.18	345.02	5.0	19.82	29.33	0.00	28
<i>phoR1</i>	790.21	11.74	787.0	65.24	0.47	65.25	28
<i>phoR2</i>	596.21	262.74	714.0	56.67	23.57	65.90	28
<i>mce1 R</i>	659.54	75.71	671.5	65.98	0.87	66.15	28
<i>phoP</i>	721.54	95.01	738.0	58.89	11.55	61.16	28
<i>yrbE1A</i>	745.36	97.12	789.5	60.93	2.37	62.20	28
<i>yrbE1A</i>	776.29	253.24	870.0	58.23	16.48	62.59	28



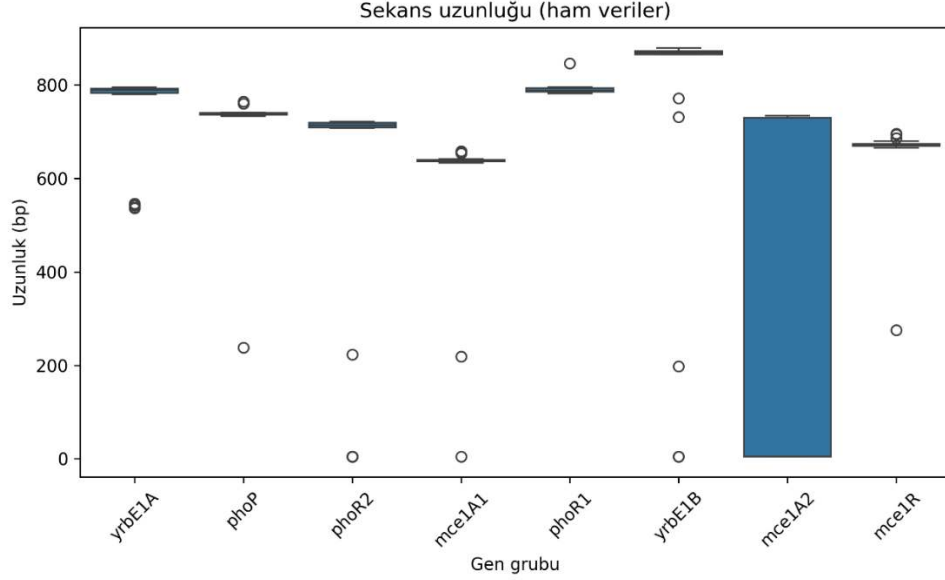
Şekil 2: Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait sekans uzunluğu ham veri histogramı

Şekil 2’de örneklerin sekans uzunluklarının büyük çoğunluğu ~650–880 bp bandında kümелendiği görülmektedir. Bu değerler PCR ile hedeflenen amplicon boylarıyla uyumludur. Bu durum, PCR amplifikasyonunun ve Sanger sekanslamanın genel olarak başarılı olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak özellikle *mce1A2* grubunda çok kısa fragmanlar (<100 bp) göze çarpmaktadır. Ayrıca bazı *yrbE1A/B* örneklerinde de düşük uzunluklu diziler gözlenmiştir. Bu kısa parçaların, ham verilerdeki kırılma, düşük sinyal veya hatalı sekanslama kaynaklı teknik sorunlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha sonraki filtreleme adımlarında düşük benzerlik ve düşük kapsama (pident/coverage eşikleri) değerleri nedeniyle bu örnekler otomatik olarak elenmiştir. Dolayısıyla, bu dağılım teknik kalite farklılıklarını işaret etmekte olup, biyolojik varyasyon yerine büyük ölçüde sekanslama sürecindeki trimleme/kırılma veya sinyal kaybı kaynaklıdır.

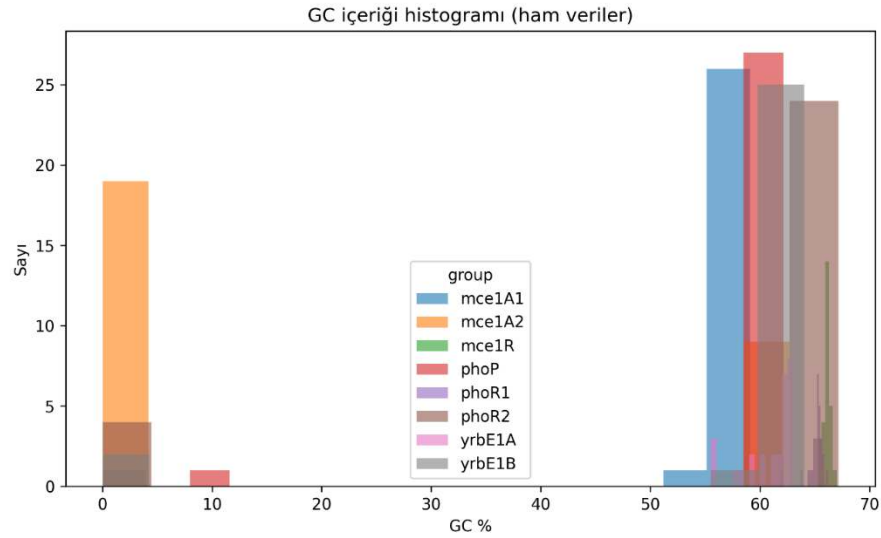
Şekil 3’te yer alan boxplot analizinde, grupların çoğunda veri kalitesinin tutarlı olduğu, *mce1A2* grubunun ise teknik olarak problemli olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. *mce1A2* grubunun sekanslarının büyük kısmı filtreleme adımlarında elenmiştir, bu nedenle sonraki analizlerde bu grubun temsil gücü sınırlı kalmıştır.

Sekans uzunluğu dağılımı gen grupları arasında büyük ölçüde homojen olup, çoğu grup beklenen amplicon boyu olan ~700–880 bp bandında toplanmıştır. Ancak *mce1A2* grubunda ciddi sapmalar gözlenmiş; bu grupta birçok çok kısa sekans (<100 bp) tespit

edilmiştir. Benzer şekilde *yrbE1A*, *yrbE1A* ve kısmen *phoR2* gruplarında da kutu dışında kalan aykırı değerler (outlier) görülmektedir.



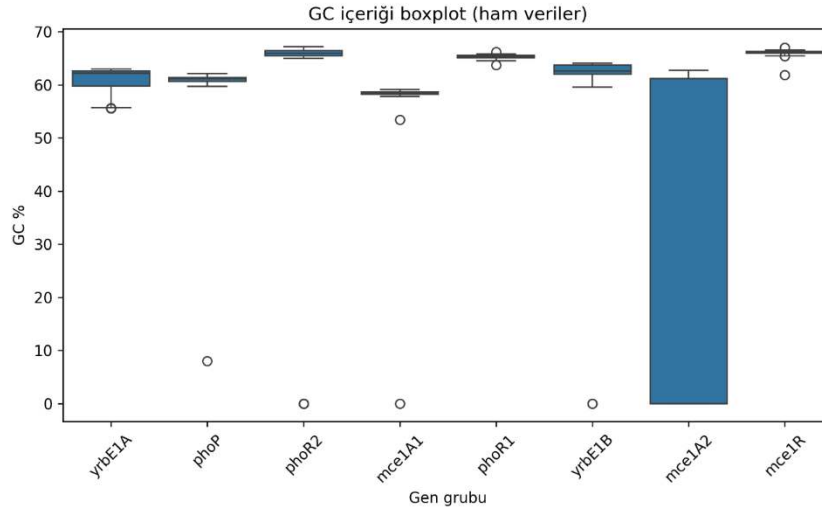
Şekil 3: Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait sekans uzunluğu ham veri boxplot analizi



Şekil 4: Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait GC içeriğini histogram ham veri grafiği

Şekil 4'te yer alan ham veri histogram grafiğinde, çoğu grup %58–66 GC bandında toplanmıştır. Bu dağılım *M. tuberculosis* genomunun bilinen yüksek GC içeriği (~%65) ile uyumludur. *mce1A2* grubunda çok düşük GC yüzdeleri (%0–5 bandında) göze

çarpmaktadır. Bu değerler biyolojik olarak imkânsızdır ve kısa/boş sekanslardan kaynaklanan teknik hataları (örn. başarısız PCR ürünleri, kırılmış diziler) işaret etmektedir. Az sayıda *phoP* ve *phoR2* örneğinde de %10 civarında GC oranı gözlenmiştir yine düşük kaliteli veya eksik dizilerle ilişkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 5: Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait GC içeriğini boxplot ham veri grafiği

Ana kitle %60–66 GC bandında yoğunlaşmıştır; bu değerler *M. tuberculosis kompleks*'in genomik profili ile uyumludur. *yrbE1A*, *phoR2*, *mce1R* gibi bazı gruplar daha dar varyans gösterirken, *phoP* ve *phoR1* gruplarında GC dağılımı daha geniştir. *mce1A2* grubu belirgin şekilde sorunlu görünmektedir: kutu grafiği geniş bir aralıkta yayılmış, hatta sıfıra yakın GC değerleri (boş veya hatalı sekans) uç değer olarak işaretlenmiştir. Bu durum, PCR/sekans başarısızlıklarının veya hatalı dosyaların varlığına işaret etmektedir. Benzer şekilde, birkaç *phoR2*, *mce1A1* ve *yrbE1A* örneğinde de sıfıra yakın uç değerler mevcuttur; bu da ham veride teknik bozuklukların göstergesidir.

Şekil 5'te boxplot, histogramda görülen farklılıkları doğrulamış, özellikle *mce1A2*'nin düşük kaliteli sekanslardan dolayı güvenilirlik sorunu yaşadığını güçlü şekilde ortaya koymuştur. Bu grubun sonraki SNP/direnç analizlerinde temsil gücünün yetersizliği beklenmektedir.

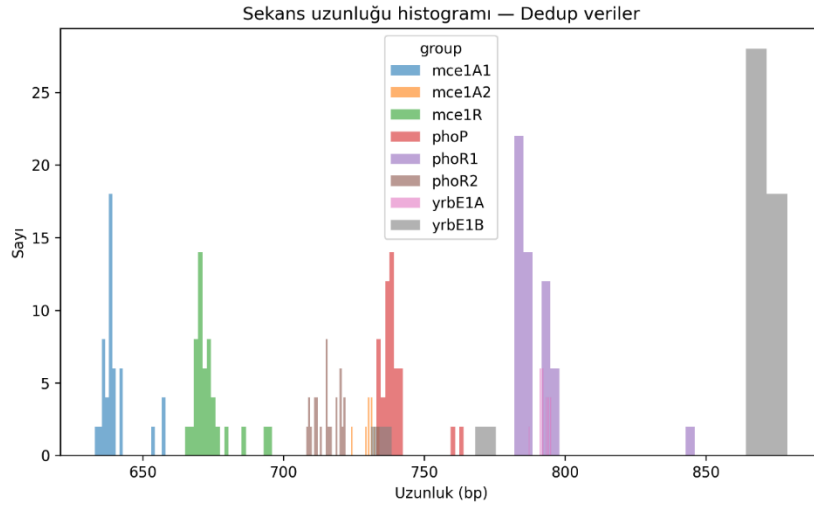
Kalite kontrol bulguları, verilerin büyük çoğunluğunun beklenen uzunluk ve GC içerik profillerine sahip olduğunu, ancak özellikle *mce1A2* grubunun düşük kaliteli sekanslardan etkilendiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle sonraki SNP ve direnç analizlerinde bu grubun eksik veya sınırlı temsil edilmesi beklenmektedir.

Çizelge 7: Çalışmada incelenen sekiz gen grubunun dizilemesi başarılı/başarısız örnek sayısı özeti

Gen Grubu	Dizilemesi Başarılı Örnek Sayısı	Dizilemesi Başarısız Örnek Sayısı	Toplam
<i>mce1A1</i>	26	2	28
<i>mce1A2</i>	9	19	28
<i>mce1 R</i>	27	1	28
<i>phoP</i>	27	1	28
<i>phoR1</i>	28	0	28
<i>phoR2</i>	23	5	28
<i>yrbE1A</i>	13	15	28
<i>yrbE1A</i>	25	3	28
Toplam	178	46	224

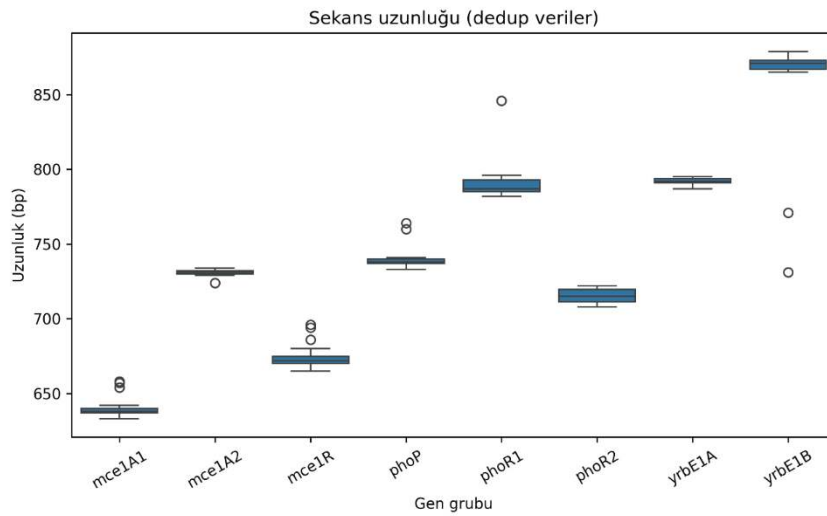
Toplam 224 PCR ürünü sekanslanmış olup, kalite kontrol sonrası 178 örnek analizlere dahil edilmiştir. Her gen grubundan teorik olarak 28 örnek beklenmesine rağmen, bazı gruplarda PCR/sekanslama başarısızlığı veya düşük kalite sebebiyle eksikler gözlenmiştir. Özellikle *mce1A2* (19 örnek eksik) ve *yrbE1A* (15 örnek eksik) gen gruplarında kayıp oranı diğer gruplara kıyasla belirgin olarak yüksektir. Bu bulgu, söz konusu bölgelerde amplifikasyonun ve sekanslamanın daha problemli olduğunu göstermektedir. Diğer gen gruplarında ise yalnızca 0–5 arasında eksik gözlenmiş, *phoR1* grubunda tüm örnekler başarılı bir şekilde analiz edilmiştir (Çizelge 7).

Geçerli kayıtların benzerlik oranları (pident: Hizalanan bölgede karşılaştırılan nükleotitlerin veya aminoasitlerin yüzde kaçının birebir aynı olduğunu gösterir) ortalama %98–100, kapsama oranları (coverage: sorgu dizisinin (query) toplam uzunluğunun ne kadarının referansla hizalanabildiğini gösterir) ise %97–99 aralığında bulunmuş olup, yüksek kaliteyi işaret etmektedir.



Şekil 6: Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait sekans uzunluğu dedup veri histogramı

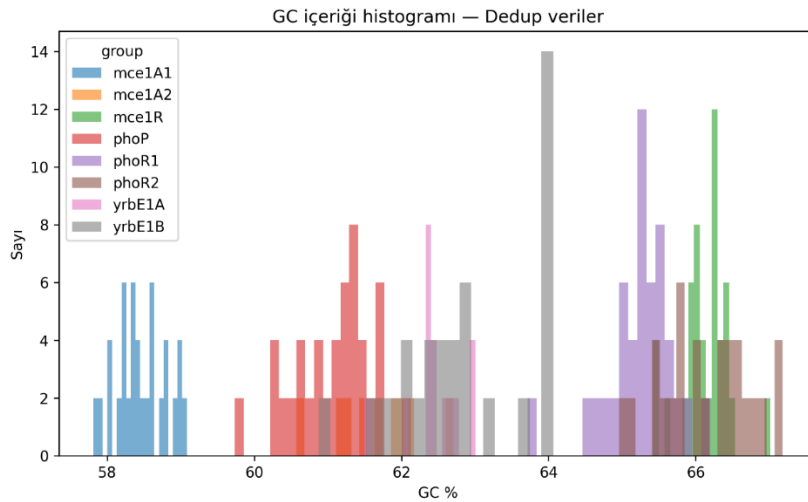
Dedup işleminden (Sekanslama verilerinde PCR çoğaltımı veya cihaz kaynaklı nedenlerle aynı fragman birden fazla kez kaydedilebilmektedir. Bu durum özellikle SNP yoğunluğu gibi ölçümleri yapay olarak arttırabilir. Deduplication işlemi, aynı dizilerin yalnızca bir kez tutulup tekrarların silinmesiyle verinin biyolojik gerçekliğe daha uygun hâle getirilmesini sağlar.) sonra histogramda artık “0–200 bp” gibi çok kısa sekans kümeleri tamamen ortadan kalkmış. Tüm gruplar, beklenen amplicon boylarına yakın aralıklarda (yaklaşık 630–880 bp) kümelenmiş hale gelmiştir.



Şekil 7: Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait sekans uzunluğu dedup veri boxplot grafiği

Ham veride gördüğümüz “uç değer bolluğu” ve çok kısa sekanslar (0–200 bp) dedup işleminden sonra veri kümesinden çıkarılmıştır. Şekil 7’de yer alan boxplot grafiğinde, grup dağılımları daha kompakt ve homojen hale gelmiştir.

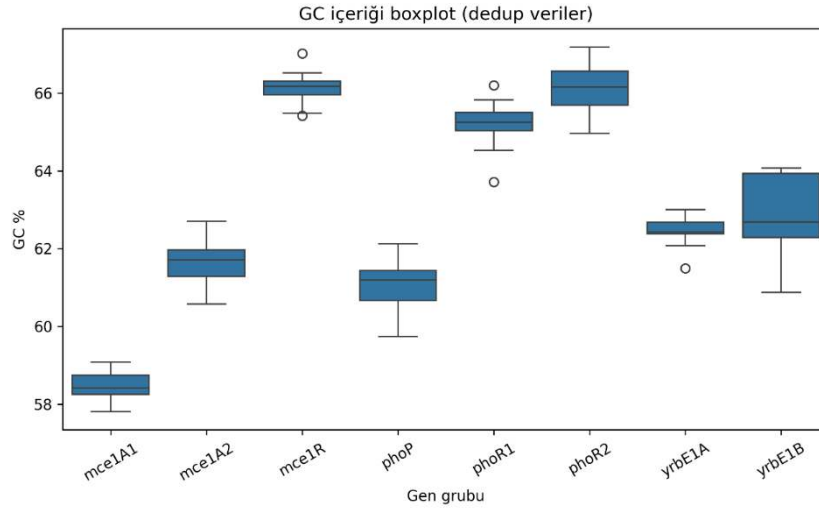
Dedup sonrası, her grubun ampikon boyu beklenen uzunluk aralığında sabitlenmiştir. Uç değerler minimal seviyede ve daha çok küçük varyasyonlardan ibaret hale gelmiştir. Bu da dizilemenin güvenilirliğini ve temizliğini göstermektedir.



Şekil 8: Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait GC içeriğini dedup veri histogramı

Şekil 8’de, dedup işleminden sonra GC dağılımları temizlenmiş ve gruplar arasında belirgin kümelenmeler gözlenmektedir. Ham verideki “0%–10% aralığındaki anormal GC içerikleri” ortadan kalkmıştır.

Bu histogram, her grubun ampikonlarının genetik olarak beklenen GC içeriklerini net biçimde göstermektedir. Uç değerlerin kaybolmasıyla, biyolojik varyasyon dışında teknik hata kaynaklı sapmaların elimine edildiğini söyleyebiliriz.



Şekil 9: Çalışmada incelenen 8 gen grubuna ait GC içeriğini dedup veri boxplot grafiği

Dedup sonrası tüm gruplar, beklenen biyolojik aralık içinde (%58–67) net kümelenmeler göstermektedir (Şekil 9). Ham verideki “0% veya 10% GC” gibi teknik uç değerler ortadan kalkmıştır. Dedup veriler, GC içeriği bakımından hem ortalama hem de dağılım açısından temiz bir veri sonucu göstermektedir. Bu da filtreleme sonrası elimizdeki dizilerin biyolojik olarak anlamlı, artefaktlardan arındırılmış olduğunu göstermektedir.

Çizelge 8: Çalışmada incelenen 8 gen grubunun sekans sonuçlarının ham veri ve dedup sonuçlarının kıyaslanması

Özellik	Ham Veriler	Dedup Veriler	Yorumu
Uzunluk (bp)	Beklenen band (700–880 bp) dışında çok kısa (0–200 bp) ve kırılmış (~500 bp) parçalar var.	Tüm gruplar ~630–870 bp aralığında; hatalı/kısa fragmanlar tamamen elendi.	Dedup sonrası teknik artefaktlar ayıklandı, biyolojik sinyal netleşti
GC içeriği	Beklenen %58–67 bandı dışında 0%–10% gibi anormal değerler gözlemlendi.	Tüm gruplar %58–67 aralığında; her grup için dar ve biyolojik olarak tutarlı dağılım.	Ham verideki GC outlier’lar teknik hatalardan kaynaklıydı; dedup sonrası temizlendi
Grup farkları	Grup içi varyasyon yüksekti, özellikle <i>mce1 A2</i> ve <i>yrbE1A</i> ’da bozulmalar vardı.	Grup içi varyasyon ciddi şekilde azaldı; her grup özgün bir uzunluk + GC profiline oturdu.	Filtreleme sonrası güvenilir grup kıyaslamaları yapılabilir hale geldi

Ham veriler incelendiğinde, bazı gen gruplarında beklenen ampikon boylarının (700–880 bp) dışında çok kısa (<200 bp) veya parçalanmış (~500 bp) diziler ile biyolojik olarak açıklanamayacak derecede düşük GC içerikleri (%0–10) gözlemlendi. Bu durum teknik sorunlara (düşük sinyal veya yanlış hizalamalar) işaret etmektedir. Dedup sonrası

elde edilen verilerde ise bu artefaktlar elimine edilmiştir. Tüm gruplar, hem uzunluk (630–870 bp) hem de GC içeriği (%58–67) bakımından beklenen biyolojik aralıkta kümelenmiş ve grup içi dağılımlar daralmıştır (Çizelge 8). Böylece her gen grubu, kendine özgü ancak biyolojik olarak tutarlı bir uzunluk ve GC profili sergilemiş, sonraki SNP ve direnç analizleri için güvenilir bir temel oluşturulmuştur.

Çizelge 9: H37Rv referansına göre gen gruplarının SNP, GC ve uzunluk özet istatistikleri

Gen Grubu	n	SNP/kb (Ort±SS)	SNP/kb (Medyan)	GC% (Ort±SS)	Uzunluk (Ort±SS, bp)
<i>mce1A1</i>	26	3.295 ± 2.496	3.123	58.47 ± 0.34	640.2 ± 6.3
<i>mce1A2</i>	9	0.609 ± 1.209	0.000	61.67 ± 0.62	730.4 ± 2.9
<i>mce1R</i>	27	3.851 ± 2.241	2.985	66.13 ± 0.33	673.8 ± 7.4
<i>phoP</i>	27	2.954 ± 4.149	1.355	61.07 ± 0.54	739.4 ± 6.9
<i>phoR1</i>	28	3.208 ± 1.311	3.658	65.24 ± 0.47	790.2 ± 11.7
<i>phoR2</i>	23	1.949 ± 2.231	1.403	66.14 ± 0.61	715.3 ± 4.5
<i>yrbE1A</i>	13	11.277 ± 12.997	5.057	62.46 ± 0.39	792.3 ± 2.1
<i>yrbE1A</i>	25	2.937 ± 5.406	1.143	62.84 ± 0.90	861.1 ± 33.8

Çizelge 10: H37Ra referansına göre gen gruplarının SNP, GC ve uzunluk özet istatistikleri

Gen Grubu	n	SNP/kb (Ort±SS)	SNP/kb (Medyan)	GC% (Ort±SS)	Uzunluk (Ort±SS, bp)
<i>mce1A1</i>	26	3.295 ± 2.496	3.123	58.47 ± 0.34	640.2 ± 6.3
<i>mce1A2</i>	9	0.609 ± 1.209	0.000	61.67 ± 0.62	730.4 ± 2.9
<i>mce1R</i>	27	3.851 ± 2.241	2.985	66.13 ± 0.33	673.8 ± 7.4
<i>phoP</i>	27	4.307 ± 4.149	2.710	61.07 ± 0.54	739.4 ± 6.9
<i>phoR1</i>	28	3.208 ± 1.311	3.658	65.24 ± 0.47	790.2 ± 11.7
<i>phoR2</i>	23	1.949 ± 2.231	1.403	66.14 ± 0.61	715.3 ± 4.5
<i>yrbE1A</i>	13	11.277 ± 12.997	5.057	62.46 ± 0.39	792.3 ± 2.1
<i>yrbE1A</i>	25	2.937 ± 5.406	1.143	62.84 ± 0.90	861.1 ± 33.8

Çalışmada elde edilen diziler H37Rv ve H37Ra referans suşlarına göre karşılaştırılarak SNP yoğunluğu, GC içeriği, amplicon uzunlukları ve ilaç direnç profilleri değerlendirilmiştir.

Sekans uzunluğu ve GC içerikleri incelendiğinde, tüm gen gruplarının beklenen amplicon boylarında (~630–880 bp) ve *M. tuberculosis*'in bilinen yüksek GC içeriği (%58–66) aralığında kümelenildiği görülmüştür. Bu durum, PCR ve sekanslama işlemlerinin genel olarak başarılı ve tutarlı olduğunu göstermektedir.

SNP yoğunluğu açısından gen grupları arasında farklılıklar saptanmıştır. *mce1A2* bölgesi en düşük varyasyonu göstermiş (ortalama 0.6 SNP/kb), buna karşılık *yrbE1A* bölgesi belirgin şekilde yüksek varyasyon (ortalama 11.3 SNP/kb) ile dikkat çekmiştir. *mce1R*, *phoP*, *phoR1* ve *phoR2* bölgeleri orta düzeyde varyasyon sergilemiştir.

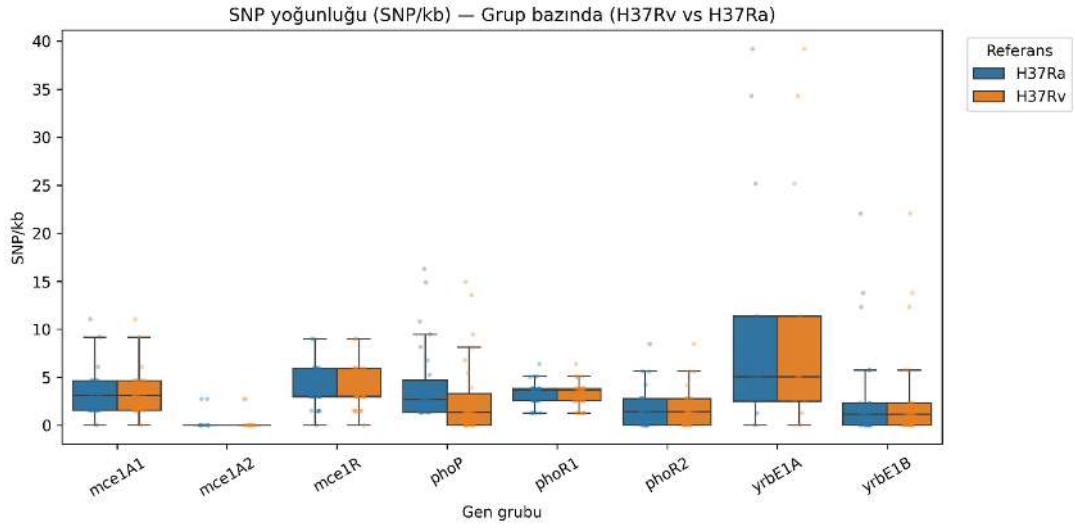
Çizelge 11: H37Rv referansına göre ilaç direnci dağılımı

Gen Grubu	n	INH-R n (%)	RIF-R n (%)	EMB-R n (%)	PZA-R n (%)	Herhangi direnç n (%)
<i>mce1A1</i>	26	20 (76.9%)	5 (19.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	21 (80.8%)
<i>mce1A2</i>	9	6 (66.7%)	2 (22.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	6 (66.7%)
<i>mce1R</i>	27	20 (74.1%)	6 (22.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	21 (77.8%)
<i>phoP</i>	27	20 (74.1%)	6 (22.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	21 (77.8%)
<i>phoR1</i>	28	21 (75.0%)	6 (21.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	22 (78.6%)
<i>phoR2</i>	23	17 (73.9%)	6 (26.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	18 (78.3%)
<i>yrbE1A</i>	13	10 (76.9%)	2 (15.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	10 (76.9%)
<i>yrbE1A</i>	25	19 (76.0%)	5 (20.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	20 (80.0%)

İlaç direnç profilleri incelendiğinde, klinik izolatların büyük çoğunluğunun izoniazid (INH) dirençli olduğu (%67–77), rifampisin (RIF) direncinin daha düşük oranda (%15–26) izlendiği, etambutol (EMB) ve pirazinamid (PZA) direncinin ise gözlenmediği saptanmıştır (Çizelge 11). Genel olarak izolatların yaklaşık üçte ikisinden fazlası (%67–81) en az bir antitüberküloz ilaca dirençli bulunmuştur. Gruplar arasında direnç dağılım oranlarının birbirine benzer olması, direnç fenotiplerinin gen bölgelerinden bağımsız olarak benzer seyir gösterdiğini düşündürmektedir.

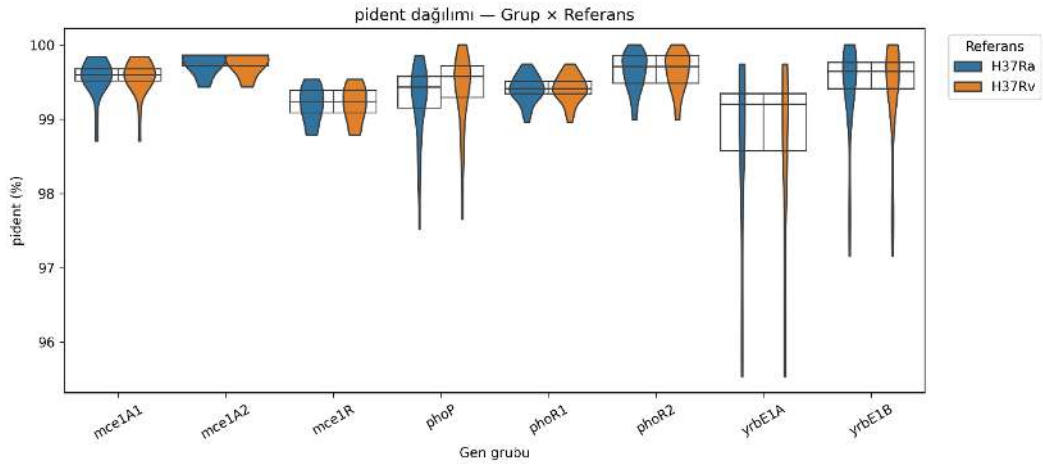
H37Ra referansına göre yapılan analizler, H37Rv ile elde edilen sonuçların genel eğilimini değiştirmemiş; SNP yoğunluğu, GC içeriği ve amplikon uzunluklarında küçük farklılıklar gözlenirse de aynı bölgelerin stabil ya da değişken yapıda olduğunu doğrulamıştır. Bununla birlikte, ilaç direnci değerlendirmelerinin yalnızca H37Rv referansına göre yapılmasının biyolojik açıdan uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

phoP gen grubu için SNP yoğunluğu, H37Rv referansına göre ortalama 2.95 ± 4.15 (medyan: 1.36) iken, H37Ra referansına göre ortalama 4.31 ± 4.15 (medyan: 2.71) olarak bulunmuştur. Virülan referans suş (H37Rv) ile karşılaştırıldığında SNP yoğunluğu daha düşük ve dağılım daha çarpık görünmektedir. Buna karşın avirülan H37Ra ile karşılaştırıldığında SNP yoğunluğu hem ortalama hem de medyan düzeyinde daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, klinik izolatların virülans özellikleri açısından H37Rv'ye daha yakın olduğunu ve H37Ra'nın genetik farklılıklarının olduğu göze çarpmaktadır.



Şekil 10: Sekiz gen grubuna ait SNP yoğunluklarının referans suşlarla karşılaştırmalı boxplot gösterimi

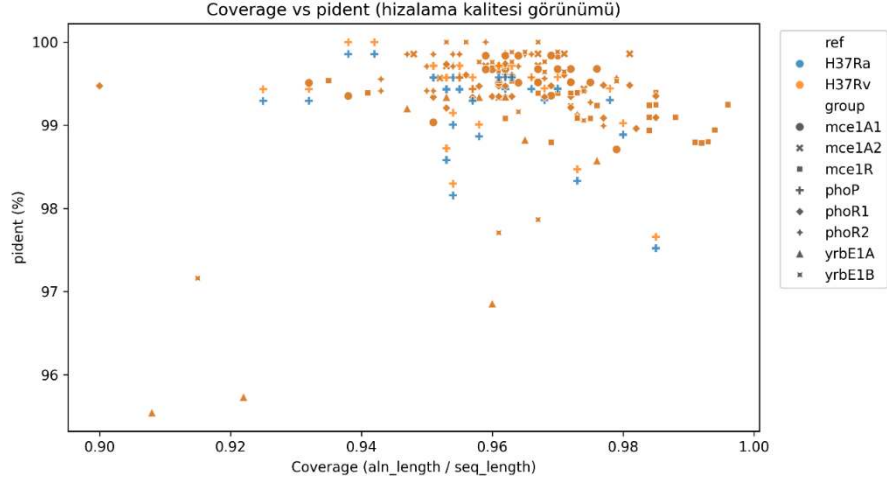
Gen gruplarının çoğunda H37Rv ve H37Ra referanslarıyla elde edilen SNP yoğunluğu benzer seyretmektedir. *yrbE1A* grubunda SNP/kb dağılımı oldukça geniş olup diğer gruplara kıyasla daha yüksek varyasyon göstermektedir. *mce1A2* grubu en düşük SNP yoğunluğuna sahiptir. Genel olarak H37Rv ve H37Ra referansları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir; gruplar arasındaki farklılık genin kendisinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 11: Sekiz gen grubuna ait pident dağılımlarının H37Rv ve H37Ra referans suşları ile karşılaştırmalı gösterimi

Tüm gen gruplarında pident değerleri yüksektir (%98'in üzerinde). H37Rv ve H37Ra referanslarına göre elde edilen pident dağılımları birbirine çok benzer olup, görsel

olarak büyük ölçüde örtüşmektedir. *yrbE1A* grubunda bazı örneklerde düşük pident değerleri dikkat çekmektedir, bu da bu grubun daha fazla varyasyona (mutasyona) uğramış olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 12: Sekiz gen grubunun hizalama kalitesi: coverage ve pident değerlerinin H37Rv ve H37Ra referanslarıyla karşılaştırılması

Çoğu örnekte coverage oranı 0.95–1.0 arasında yer almaktadır. pident değerleri de %98–100 arasında yoğunlaşmıştır, bu da genel olarak yüksek kaliteli hizalamalar elde edildiğini göstermektedir. Yalnızca birkaç örnekte coverage düşük veya pident görece daha düşük çıkmıştır; bunlar teknik sekanslama hatalarından veya zayıf kalite kontrolünden kaynaklanıyor olabilir.

Referans farkı (H37Rv vs H37Ra) sonuçlara anlamlı bir katkı yapmamaktadır. Hizalama kalitesi genel olarak yüksek, elde edilen SNP sonuçları güvenilirdir.

Çizelge 12: mce1R gen gölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar

Grup	Örnek	SNP				
		İnsersiyon	Delesyon	Transisyon	Transversiyon	Null
<i>mce1R/</i> (c194815-194144)*	1. Ör		C 194172 A 194183			
	2. Ör		C 194172 C 194173 A 194183			
	4. Ör		A 194183	G→C 194681		
	5. Ör	G 194169	C 194172 A 194183			
	6. Ör		A 194162 C 194164 C 194172 A 194183	G→C 194681	C→T 194359	
	7. Ör		A 194183	G→C 194681	C→T 194359	
	8. Ör		C 194172 A 194183		C→A 194173	
	10. Ör		C 194172 A 194183	G→C 194681	C→A 194173	
	11. Ör		C 194172 A 194183	G→C 194681	C→A 194173	
	12. Ör		C 194172 C 194173 A 194183	G→C 194681	C→A 194174	
	13. Ör		C 194172 A 194183		C→A 194173	
	14. Ör		C 194172 A 194183	G→C 194681		
	15. Ör		C 194172 A 194183	G→C 194681	C→A 194173	
	16. Ör		C 194172 C 194173 A 194183			
	17. Ör		C 194172 C 194173 A 194183	G→C 194681		
	18. Ör	G 194167 G 194304 G 194305	C 194172 A 194183	G→C 194681	G→A 194803	
	21. Ör		C 194172 A 194183	G→C 194681	C→A 194173	
	22. Ör		C 194172 C 194173 A 194183			
	23. Ör		C 194172 C 194173 A 194183			

	24. Ör		A 194183			
	25. Ör		C 194172 A 194183		C→A 194173	
	26. Ör		C 194172 C 194173 A 194183	G→C 194681	C→A 194174	
	27. Ör		C 194172 A 194183	G→C 194681	C→A 194173	
	28. Ör		C 194172 A 194183	G→C 194681	C→A 194173	
	29. Ör		C 194172 A 194183		C→A 194173	
	31. Ör		A 194183	G→C 194681		
	32. Ör		C 194172 A 194183	G→C 194681	C→A 194173	

Mycobacterium tuberculosis kompleks H37Rv (Erişim numarası: NC_000962.3, erişim tarihi: 09.09.2025) suşunun transkripsiyonal regülatör *mceIR* (Lokus etiketi: Rv0165c) geninin nükleotid pozisyonları *mceIR* gen bölgesine ait SNP dağılımları Çizelge 12’de sunulmuştur. Tablo incelendiğinde özellikle 194172 ve 194183 pozisyonlarının birçok örnekte tekrarlandığı görülmektedir. Ayrıca bazı örneklerde (örn. 6., 7. ve 18. örnekler) birden fazla mutasyon tipinin (insersiyon, delesyon, transisyon ve transversiyon) aynı anda gözlenmesi, bu bölgedeki genetik değişkenliği göstermektedir.

Çizelge 13’te, *mceIA* gen bölgesinde tespit edilen SNP dağılımları örnekler arasında belirgin bir heterojenlik göstermektedir. 199169, 199172–174 ve 199209 pozisyonlarında insersiyon ve delesyonların tekrarlandığı, bazı örneklerde ise transversiyonların öne çıktığı görülmektedir. 17. örnekte herhangi bir SNP saptanmamış, bu da varyasyon açısından diğer örneklerden farklı bir profil sunduğunu göstermektedir. Ayrıca 33. örnekte çoklu transversiyonların (G→C, T→C, C→T, A→C, T→G) bir arada bulunması, bu örnekteki çeşitliliği ortaya koymaktadır.

Çizelge 13: *mceA* gen bölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar

Grup	Örnek	SNP				
		İnsersiyon	Delesyon	Transisyon	Transversiyon	Null
<i>mceA</i> / (198534-199898)*	1. Ör					
	2. Ör		T 199240	T→A 199235		
	4. Ör	G 199173	C 199209		C→A 199169	G→N 199203 C→N 199207
	5. Ör	A 199169	C 199209			
	6. Ör					C→N 198562
	7. Ör	G 199173				
	8. Ör	A 199169				
	10. Ör	A 199169 C 199164				
	12. Ör	G 199173				
	13. Ör	G 199172 G 199176				
	14. Ör					
	15. Ör	G 199173				
	16. Ör	T 199174				A→N 199171
	17. Ör	-	-	-	-	-
	18. Ör			A→T 199171		
	21. Ör	T 199174				
	22. Ör					
	23. Ör	T 199174				
	25. Ör	T 199174			G→A 199168	
	26. Ör	T 199174				
	27. Ör	T 199174				
	28. Ör	A 199172 C 199164				
	29. Ör					
	31. Ör	A 199172				
	32. Ör			A→T 199164		
	33. Ör	T 199174		G→C 198735 G→C 198756	T→C 198697 C→T 198727 A→C 198733 T→G 198739	

* *Mycobacterium tuberculosis* kompleks H37Rv (Erişim numarası: NC_000962.3, erişim tarihi: 09.09.2025) suşunun transkripsiyonal regülatör *mceA* (Lokus etiketi: Rv0169) geninin nükleotid pozisyonları

**mceA* gen bölgesi, 2 parçaya ayrılarak çalışılmıştır, birinci parça 198534-199159 arasını kapsarken ikinci parça 199160-199898 arasını kapsamaktadır

Çizelge 14: *yrbE1A* gen gölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar

Grup	Örnek	SNP				
		İnsersiyon	Delesyon	Transisyon	Transversiyon	Null
<i>yrbE1A</i> (196861-197658)*	1. Ör	G 196916_196917	C 196899 A 196907 G 197566	A→T 196901		
	2. Ör		A 196907 G 197646	G→C 196917 G→C 197128	T→C 196956 C→A 197422	
	4. Ör		A 196907	G→C 196917	A→C 196898 C→A 196899 C→A 197422 C→A 197422	
	6. Ör		A 196907	G→C 197128	A→C 196898 C→A 196899 C→A 197422	
	7. Ör	C 197023_197024 C 197544_197545	A 196907 A 196918	C→G 196913 C→G 196921 G→C 196948 G→C 197024 G→C 197029 G→C 197055 G→C 197128 T→A 197324 T→A 197423	A→C 196898 C→A 196899 C→T 196915 T→C 196916 C→T 196951 T→C 196956 A→C 196960 G→A 196993 C→A 197028 C→A 197046 C→T 197145	
	8. Ör	C 196916_196917 A 196924_196925	A 196907		A→C 196898 C→A 196899	
	10. Ör		A 196907		A→C 196898 C→A 196899	
	12. Ör	G 196916_196917	A 196907	G→C 197128	A→C 196898 C→A 196899 C→A 197422	
	13. Ör		A 196907	G→C 196917 G→C 197128	A→C 196898 C→A 196899	
	14. Ör					
	15. Ör					
	16. Ör					
	17. Ör		C 196899 A 196907			
	23. Ör	A 197367_197368	A 196907 G 197566	G→C 196890 G→C 197128 T→A 197423	A→C 196898 C→A 196899 T→C 196956	
	32. Ör					

* *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kompleks H37Rv (Erişim numarası: NC_000962.3, erişim tarihi: 09.09.2025) suşunun transkripsiyonal regülatör *yrbE1A* (Lokus etiketi: Rv0167) geninin nükleotid pozisyonları

Çizelge 14'te *yrbE1A* gen bölgesinde SNP dağılımları gösterilmektedir. 196898 ve 196899 pozisyonlarında A→C ve C→A değişimlerinin birçok örnekte tekrarlandığı dikkat çekmektedir. 7. örnekte, çok sayıda transisyon ve transversiyonun aynı anda görülmektedir. 14., 15. ve 16. örneklerde herhangi bir SNP saptanmamış olması, varyasyonun tüm izolatlarda homojen olmadığını göstermektedir.

Çizelge 15: *yrbE1B* gen bölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar

Grup	Örnek	SNP				
		İnsersiyon	Delesyon	Transisyon	Transversiyon	Null
<i>yrbE1B</i> (197660-198529)*	1. Ör		C 197692 G 198395	G→C 198463		
	2. Ör		C 197692 C 197693 G 198463		G→T 197684 G→A 198395	
	4. Ör	-	-	-	-	
	5. Ör		G 198524 A 198528			
	6. Ör		G 198524			
	7. Ör		C 197692			
	8. Ör		C 197692 C 197693	G→C 197682	C→A 197687	
	10. Ör		G 198463	G→C 198395		
	11. Ör	C 198533_198534	T 197703	G→C 198532		
	12. Ör		G 198524			
	13. Ör		C 197692			
	14. Ör	C 198531_198532	T 197703			
	15. Ör	A 197866_197867 A 198399_198400 G 198427_198428 T 198518_198519		G→C 197865 G→C 197859	T→A 197860 G→T 197858 G→A 197853 C→T 198473	C→N 197700

		C 198531_198532 T 198535_198536		G→C 198457	G→A 198503 G→A 198508 C→T 198518 T→G 198525	
17. Ör	C 198531_198532 C 198533_198534	T 198525 C 197692	G→C 198529	C→A 197694		
18. Ör	CC 198531_198532			C→A 198136		
21. Ör	T 198511_198512 C 198533_198534	A 197718	G→C 197865 G→C 198532	G→A 197853 T→G 198525		
22. Ör	C 198531_198532	T 197703 T 198525		C→T 198518	G→N 198524	
23. Ör	C 198531_198532 C 198533_198534	C 197692				
25. Ör	C 198531_198532	G 198524				
26. Ör	G 198530_198531 C 198531_198532	C 197692				
27. Ör	C 198531_198532	T 197703	G→C 198529			
29. Ör	C 197789_197790 A 198268_198269 A 198283_198284 T 198292_198293 A 198312_198313 T 198323_198324 C 198328_198329 AG 198336_198337	T 198300	G→C 198311	T→C198126 T→C198183 C→A198222 G→T 198223 G→A 198283 T→C 198307 G→T 198334	T→N 198299	
31. Ör			G→C 198325 T→A 198326 T→A 198360	G→T 198365 G→A 198401 C→T 198406 G→T 198389	G→N 198395	
32. Ör	C 198531_198532					
33. Ör	C 198531_198532	A 197718	G→C 197865	G→A 197853 T→G 198524 A→C 198520 T→G 198499		

* *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi H37Rv (Erişim numarası: NC_000962.3, erişim tarihi: 09.09.2025) suşunun transkripsiyonal regülatör *yrbE1B* (Lokus etiketi: Rv0168) geninin nükleotid pozisyonları

yrbE1A gen bölgesinde SNP dağılımları oldukça heterojen bir yapı sergilemektedir. 197692–197693 ve 198531–198534 pozisyonlarında yinelenen insersiyon ve delesyonların çok sayıda örnekte tekrarlandığı görülmektedir. 15. ve 29. örneklerde çoklu transisyon ve transversiyonların bir arada bulunmaktadır. Bazı örneklerde (ör. 4. örnek) herhangi bir SNP saptanmamış olması, varyasyonun tüm izolatlarda eşit şekilde dağılmadığını ortaya koymaktadır (Çizelge 15).

phoP gen bölgesinde SNP dağılımı hem yoğunluk hem de çeşitlilik bakımından dikkat çekicidir (Çizelge 16). 851651–851652 pozisyonlarında insersiyonların neredeyse tüm örneklerde tekrarlandığı görülmektedir. Ayrıca 852073 (A→T), 852221 (A→C) ve 852085 (G→C) gibi belirli pozisyonlarda yinelenen mutasyonlar yer almaktadır. 28. ve 31. örneklerde hiç SNP saptanmamış olması, varyasyonun örnekler arasında homojen dağılmadığını ortaya koymaktadır. Genel olarak tablo, *phoP* bölgesinin belirli pozisyonlarda tekrarlayan mutasyonlara eğilimli olduğunu ve bazı örneklerin bu mutasyonların birikimiyle öne çıktığını göstermektedir.

Çizelge 16: *phoP* gen bölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar

Grup	Örnek	SNP				
		İnsersiyon	Delesyon	Transisyon	Transversiyon	Null
<i>phoP</i> (851608-852351)*	1. Ör		A 851651 A 851652	A→T 852073 G→C 852250	A→C 852221 A→G 852278	
	2. Ör		A 851651 A 851652	A→T 852073 G→C 852085	G→A 852223 A→C 852221 G→A 852250	A→N 851646 G→N 852229 G→N 852259 G→N 852270 A→N 852278
	4. Ör	A 852352				
	5. Ör		A 851651 A 851652			
	6. Ör		A 851651 A 851652			A→N 851646
	7. Ör	A 852352 A 852353	A 852348			C→N 851655
	8. Ör	A 852350 A 852353	G 852347			
	10. Ör		A 851651 A 851652			
	11. Ör		A 851651			A→N 851646
	12. Ör		A 851651 A 851652			A→N 851646

13. Ör		A 851640 C 851642 A 851651 A 851652	A→T 852073 G→C 852085 T→A 852267	G→A 852223 A→C 852221	G→N 852229 G→N 852247 G→N 852259 G→N 852270
14. Ör	A 852352	A 851651			
15. Ör		A 851651 A 851652			
16. Ör		A 851651 A 851652	G→C 852085	A→C 852221	G→N 852229 A→N 852278
17. Ör		A 851651 A 851652	A→T 852073 A→T 852221 T→A 852267	G→A 852085 G→A 852223 G→A 852250 G→T 852270	
18. Ör		A 851651 A 851652		A→C 852221 G→A 852250	G→N 852223 G→N 852259 G→N 852270
22. Ör	T 852348	A 851651	T→A 852350	G→A 852351	
23. Ör		A 851651 A 851652			
24. Ör	A 852352	A 851651 A 851652			
25. Ör		A 851651 A 851652		G→A 852223	
26. Ör	A 852353 N 852352				
27. Ör		A 851651 A 851652			A→N 851646
28. Ör	-	-	-	-	-
29. Ör	T 852250 A 852353 A 852354				
31. Ör	-	-	-	-	-
32. Ör		A 851651 A 851652			A→N 851646
33. Ör	N 852353	A 851651 A 851652			G→N 852352

* *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kompleks H37Rv (Erişim numarası: NC_000962.3, erişim tarihi: 09.09.2025) suşunun transkripsiyonal regülatör *phoP* (Lokus etiketi: Rv0757) geninin nükleotid pozisyonları

phoR gen bölgesinde SNP dağılımlarının oldukça yoğun ve tekrarlayan bir yapı gösterdiği görülmektedir. Özellikle 852910 pozisyonunda C→T değişiminin neredeyse tüm örneklerde tekrarlandığı dikkat çekmektedir; bu durum bu pozisyonun güçlü bir mutasyon olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca 853137 pozisyonundaki G→A

değişimi de birçok örnekte gözlenmiş ve varyasyonun sürekliliğini desteklemiştir. Bazı örnekler (örn. 11., 18. ve 33.) ise çok sayıda farklı transisyon ve transversiyonu aynı anda barındırmaktadır. Buna karşılık, 22., 23. ve 29. örnekler gibi yalnızca sınırlı sayıda değişim taşıyan örnekler de mevcuttur. Genel olarak tablo, *phoR* bölgesinde hem ortak ve tekrarlayan değişimlerin hem de örneklere özgü kompleks profillerinin bulunduğunu ortaya koymaktadır (Çizelge 17).

Çizelge 17: *phoR* gen bölgesinde görülen insersiyon, delesyon ve substitüsyonlar

Grup	Örnek	SNP				
		İnsersiyon	Delesyon	Transisyon	Transversiyon	Null
<i>phoR</i> (852396-853853)*	1. Ör		A 853171		C→T 852910 A→C 853581	
	2. Ör	C 853140_853141		T→A 853857	C→T 852910	
	4. Ör	C 853140_853141 C 853844_853845			C→T 852910	
	5. Ör		G 853134		C→T 852910 G→A 853137 A→G 853119 A→G 853403	
	6. Ör		A 853376 G 853137 C 853850		C→T 852910	
	7. Ör	G 852142_852143	C 853850		C→T 852910 G→A 853137 T→G 852144	A→N 853581
	8. Ör	G 852142_852143	A 853167 A 853174 C 853850		C→T 852910	C→N 853170
	10. Ör	C 853137_853138			C→T 852910 G→A 853137	
	11. Ör		C 853192	G→C 852748	C→T 852910 A→G 853119 G→A 853137 G→A 853812	A→N 853229
	12. Ör	A 853138_853134		G→C 852746 G→C 852749 A→T 853581 G→C 853578	C→T 852910	
	13. Ör	C 853140_853141	G 853134 A 853174	G→C 852749	C→T 852910 G→A 853137	C→N 853176
	14. Ör	C 853140_853141	A 853182 A 853194		C→T 852910	G→N 853228 A→N 853229
	15. Ör	C 853140_853141			C→T 852910 G→A 853137	
	16. Ör		G 853137		C→T 852910	

17. Ör				C→T 852910 A→G 853535	
18. Ör	C 853140_853141 A 853143_853144	C 853183 C 853192	G→C 853844	C→T 852910 G→A 852606 G→T 852607 G→A 853137 A→C 853138	A→N 853229
21. Ör	N 853140_853141			C→T 852910 G→A 853137	A→N 853138 C→N 853140
22. Ör				C→T 852910	
23. Ör				C→T 852910 A→G 853119	
24. Ör	G 853142_853143		A→T 853229 G→C 853641	C→T 852910 G→A 853473 G→T 853817	
25. Ör	C 853140_853141			C→T 852910	T→N 853177
26. Ör				C→T 852910	A→N 853174 T→N 853177
27. Ör	C 853140_853141			C→T 852910 C→T 853057	
28. Ör			A→T 853119	C→T 852910	
29. Ör				C→T 852910	
31. Ör	C 853140_853141 G 853142_853143			C→T 852910	
32. Ör	G 853139_853140			C→T 852910 G→A 853137	
33. Ör	G 853186_853187 T 853240_853241	C 853238	G→C 853246 T→A 853297	C→T 852910 C→A 853176 G→T 853237 G→T 853242 G→A 853331 C→A 853352	

* *Mycobacterium tuberculosis* kompleks H37Rv (Erişim numarası: NC_000962.3, erişim tarihi: 09.09.2025) suşunun transkripsiyonal regülatör *phoR* (Lokus etiketi: Rv0758) geninin nükleotid pozisyonları

* *phoR* gen bölgesi, 2 parçaya ayrılarak çalışılmıştır, birinci parça 852396-853147 arasını kapsarken ikinci parça 853147 -853853 arasını kapsamaktadır

Mycobacterium canettii CIPT 140070017 complete genome

Sequence ID: [FO203510.1](#) Length: 4524466 Number of Matches: 2

Range 1: 198271 to 199028 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1365 bits(739)	0.0	752/758(99%)	1/758(0%)	Plus/Plus	
Query	20	CGGCGACAACTGC-AACCCCGCTCACCTCGTCGGTGGATTCTTCGCATGTGTGTGCTG	78		
Sbjct	198271	...AC...A...G...	198330		
Query	79	ACTGGAAGGCGCTGTTTCGCTGCGCTTCCAGTGGCGCGAGTTCACTCTGCAGTGTG	138		
Sbjct	198331	...	198390		
Query	139	TTTCATCATGCGGGTCGGATTTTACCGACGATCATGGTCTCGATACGCTGACGGTGTG	198		
Sbjct	198391	...	198450		
Query	199	TTGATCTTCACGCTCAATATTCTGCTGGCCAGTTTCGGCGCGGACAGCATCTCCGGTCC	258		
Sbjct	198451	...	198510		
Query	259	GGCGCGGCGATCGGCGCGCTCACCCAGCTTGGCCGCTGACAAAGGTCGTGTGTGCTG	318		
Sbjct	198511	...	198570		
Query	319	GGCGCGGATCCACGGCATCTGCGCGACCTGGGTGCGCCGACCATCCGCGAGGAATC	378		
Sbjct	198571	...	198630		
Query	379	GACGCGATGAGGTCGTGGGATCGATCCATCACCGTCTGGTGGTGGCGGGTGTGCTC	438		
Sbjct	198631	...	198690		
Query	439	GCCTGATGCTGCTGCGCACGCTGCTCAACGGTCTGGTATCACCGTGGCTGTGCTGCT	498		
Sbjct	198691	...	198750		
Query	499	GGCTTCTCTTCGGTGTCTATCTCGAGAAGTTTCGGGCGGCGCTACATTGCGACGCTG	558		
Sbjct	198751	...	198810		
Query	559	ACCTTGATCACGGCTGCGCGAGGTGGTCATCGCAACATCAAGCGCAACGTTCCGGC	618		
Sbjct	198811	...	198870		
Query	619	CTGATCGCGGCTTGTGCGCTGCTATCGGGGCTGACCGTCCGTTGGCGGTTCCAAAGGT	678		
Sbjct	198871	...	198930		
Query	679	CTTGACCGCGCTCAACGAGACCGTGGTGTGTGATTGCCGTGCTGCTGCTCAAC	738		
Sbjct	198931	...	198990		
Query	739	GTGATCTTGACGACCATCGGTGTGCGATTTCGGGACGGG	776		
Sbjct	198991	...	199028		

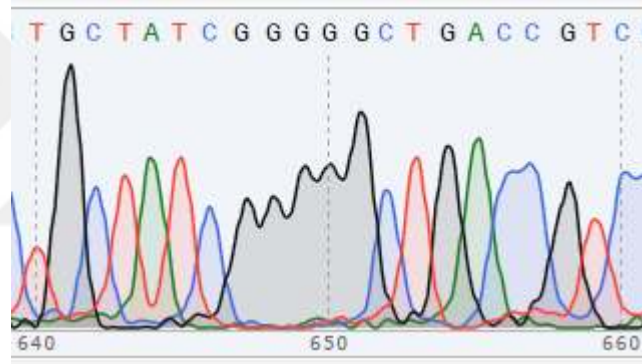
Mycobacterium tuberculosis H37Rv, complete genome

Sequence ID: [NC_000962.3](#) Length: 4411532 Number of Matches: 2

Range 1: 196894 to 197651 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1371 bits(742)	0.0	753/758(99%)	1/758(0%)	Plus/Plus	
Query	20	CGGCGACAACTGC-AACCCCGCTCACCTCGTCGGTGGATTCTTCGCATGTGTGTGCTG	78		
Sbjct	196894	...AC...A...G...	196953		
Query	79	ACTGGAAGGCGCTGTTTCGCTGCGCTTCCAGTGGCGCGAGTTCACTCTGCAGTGTG	138		
Sbjct	196954	...	197013		
Query	139	TTTCATCATGCGGGTCGGATTTTACCGACGATCATGGTCTCGATACCGCTGACGGTGTG	198		
Sbjct	197014	...	197073		
Query	199	TTGATCTTCACGCTCAATATTCTGCTGGCCAGTTTCGGCGCGGACAGCATCTCCGGTCC	258		
Sbjct	197074	...	197133		
Query	259	GGCGCGGCGATCGGCGCGCTCACCCAGCTTGGCCGCTGACAAAGGTCGTGTGTGCTG	318		
Sbjct	197134	...	197193		
Query	319	GGCGCGGATCCACGGCATCTGCGCGACCTGGGTGCGCCGACCATCCGCGAGGAATC	378		
Sbjct	197194	...	197253		
Query	379	GACGCGATGAGGTCGTGGGATCGATCCATCACCGTCTGGTGGTGGCGGGTGTGCTC	438		
Sbjct	197254	...	197313		
Query	439	GCCTGATGCTGCTGCGCACGCTGCTCAACGGTCTGGTATCACCGTGGCTGTGCTGCT	498		
Sbjct	197314	...	197373		
Query	499	GGCTTCTCTTCGGTGTCTATCTCGAGAAGTTTCGGGCGGCGCTACATTGCGACGCTG	558		
Sbjct	197374	...	197433		
Query	559	ACCTTGATCACGGCTGCGCGAGGTGGTCATCGCAACATCAAGCGCAACGTTCCGGC	618		
Sbjct	197434	...	197493		
Query	619	CTGATCGCGGCTTGTGCGCTGCTATCGGGGCTGACCGTCCGTTGGCGGTTCCAAAGGT	678		
Sbjct	197494	...	197553		
Query	679	CTTGACCGCGCTCAACGAGACCGTGGTGTGTGATTGCCGTGCTGCTGCTCAAC	738		
Sbjct	197554	...	197613		
Query	739	GTGATCTTGACGACCATCGGTGTGCGATTTCGGGACGGG	776		
Sbjct	197614	...	197651		

Şekil 13: 4 numaralı örneğe ait yrbE1A gen bölgesinin *Mycobacterium canetti* ve *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşları ile BLAST hizalaması



Şekil 14: 4 numaralı örneğe ait yrbE1A gen bölgesi kromatogram datasının 640-660 baz diziliminden bir kesit

yrbE1A gen bölgesine ait 4 numaralı klinik izolata ilişkin BLAST hizalama sonuçları, bu örneğin hem *Mycobacterium canettii* CIPT 140070017 hem de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv referans suşu ile yüksek oranda benzerlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. İncelenen varyasyonlar arasında, 652. pozisyonda yer alan nükleotid farklılığı dikkat çekicidir; söz konusu pozisyonda 4 numaralı izolatta ve H37Rv suşunda sitozin (C) bulunurken, *M. canettii* CIPT 140070017 suşunda timin (T) yer almaktadır. Bu durum, primerlerin H37Rv suşuna göre tasarlanmış olmasına rağmen, elde edilen klinik izolatların *Mycobacterium tuberculosis* kompleksindeki diğer suşlarla da önemli ölçüde benzerlik taşıdığını, yalnızca belirli noktalarda farklılıklar sergilediğini göstermektedir (Şekil 13, 14).

4.1. İstatistiksel Analiz:

SNP yoğunluklarının gen gruplarına göre farklılık gösterip göstermediği analiz edilmeden önce, verilerin dağılım özellikleri Shapiro–Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normallik varsayımını tam olarak karşılamadığı görüldüğünden, hem parametrik (ANOVA) hem de parametrik olmayan (Kruskal–Wallis) testlerle inceleme yapılmıştır. Her iki analiz de gruplar arasında anlamlı farklılık olduğunu ortaya koymuştur (ANOVA $F(7,348)=12.67$, $p<0.0001$; Kruskal-Wallis $H=81.94$, $p<0.0001$). Buna karşılık izoniyazid, rifampisin ve çoklu ilaç direncinin gruplar arasında dağılımı Ki-kare testiyle anlamlı bulunmadı (tüm $p>0.97$). Etambutol ve pirazinamid için direnç gözlenmediği için istatistiksel analiz yapılmadı.

Post-hoc analizlerde gruplar arasında SNP yoğunluğu açısından farklılıklar gözlenmiştir. Non-parametrik Dunn testi ayrıntılı farklılıklar ortaya koymuştur: *mce1A2*'nin *mce1A1*, *mce1R*, *phoR1* ve *yrbE1A* gruplarına göre anlamlı derecede daha düşük SNP yoğunluğuna sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca *yrbE1A*'nın *phoP*, *phoR2* ve *yrbE1A* gruplarına göre anlamlı derecede yüksek SNP yoğunluğu gösterdiği, *mce1R*'nin ise *phoR2* ve *yrbE1A*'ye göre daha yüksek SNP yoğunluğu sergilediği bulunmuştur.

4.1.1. Post-hoc Test Sonuçları (H37Rv)

Çizelge 18: Gruplara göre SNP yoğunluğu özet istatistikleri

Grup	Örnek sayısı	Ortalama	Medyan	Standart sapma (sd)
<i>mce1A1</i>	26	3.295461538461538	3.1225	2.496479685169005
<i>mce1A2</i>	9	0.6092222222222223	0.0	1.208888102532424
<i>mce1R</i>	27	3.850740740740741	2.985	2.240672934506551
<i>phoP</i>	27	2.953962962962963	1.355	4.149341537025265
<i>phoR1</i>	28	3.20825	3.6575	1.311292764016855
<i>phoR2</i>	23	1.948521739130435	1.403	2.230558427217991
<i>yrbE1A</i>	13	11.27738461538462	5.057	12.99718850071341
<i>yrbE1A</i>	25	2.9374	1.143	5.406285539382223

Çizelge 19: SNP yoğunluğu için Dunn testi (Bonferroni düzeltmeli) sonuçları

Grup 1	Grup 2	Bonferroni katsayısı	$p < 0.05$
<i>mce1A1</i>	<i>mce1A2</i>	0.01490159922974162	Evet
<i>mce1A1</i>	<i>mce1R</i>	1.0	Hayır
<i>mce1A1</i>	<i>phoP</i>	0.5930430218082385	Hayır
<i>mce1A1</i>	<i>phoR1</i>	1.0	Hayır
<i>mce1A1</i>	<i>phoR2</i>	0.3708729061476241	Hayır
<i>mce1A1</i>	<i>yrbE1A</i>	1.0	Hayır
<i>mce1A1</i>	<i>yrbE1A</i>	0.05672705577614313	Hayır
<i>mce1A2</i>	<i>mce1R</i>	0.002118525444862152	Evet

<i>mce1A2</i>	<i>phoP</i>	1.0	Hayır
<i>mce1A2</i>	<i>phoR1</i>	0.01549158916402385	Evet
<i>mce1A2</i>	<i>phoR2</i>	1.0	Hayır
<i>mce1A2</i>	<i>yrbE1A</i>	0.0008035051246450765	Evet
<i>mce1A2</i>	<i>yrbE1A</i>	1.0	Hayır
<i>mce1R</i>	<i>phoP</i>	0.075205516153865	Hayır
<i>mce1R</i>	<i>phoR1</i>	1.0	Hayır
<i>mce1R</i>	<i>phoR2</i>	0.04632649756384949	Evet
<i>mce1R</i>	<i>yrbE1A</i>	1.0	Hayır
<i>mce1R</i>	<i>yrbE1A</i>	0.004454103167866819	Evet
<i>phoP</i>	<i>phoR1</i>	0.6211760800259272	Hayır
<i>phoP</i>	<i>phoR2</i>	1.0	Hayır
<i>phoP</i>	<i>yrbE1A</i>	0.02893063207362829	Evet
<i>phoP</i>	<i>yrbE1A</i>	1.0	Hayır
<i>phoR1</i>	<i>phoR2</i>	0.3873607844439557	Hayır
<i>phoR1</i>	<i>yrbE1A</i>	1.0	Hayır
<i>phoR1</i>	<i>yrbE1A</i>	0.0574929119789169	Hayır
<i>phoR2</i>	<i>yrbE1A</i>	0.01813807399266194	Evet
<i>phoR2</i>	<i>yrbE1A</i>	1.0	Hayır
<i>yrbE1A</i>	<i>yrbE1A</i>	0.00252326866202903	Evet

5 TARTIŞMA

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinde yer alan patojen türlerin neden olduğu, küresel ölçekte ciddi morbidite ve mortaliteye yol açan önemli bir halk sağlığı sorunudur (World Health Organization [WHO], 2024). Hastalığın sürekliliği ve yayılımında, patojenin genetik yapısındaki değişkenlik belirleyici bir rol oynamaktadır. *M. tuberculosis* kompleks genomunda meydana gelen tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), bakteriyel popülasyonlar arasındaki farklılıkların anlaşılmasında kritik belirteçlerdir (57). Virülansla ilişkili gen bölgelerinde ortaya çıkan SNP'ler, bakterinin konağa adaptasyonu, bağışıklık sisteminden kaçışı ve hastalık şiddetini doğrudan etkileyebilmektedir (58). Bu nedenle SNP'lerin tüberküloz patogenezi ve evrimsel süreçteki rolü, hastalığın biyolojisinin anlaşılmasında temel bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

Virülansın düzenlenmesinde öne çıkan genler arasında *mceI* operonuna ait *mceIR* ve *mceIA* genleri, taşıyıcı proteinleri kodlayan *yrbEIA* ve *yrbEIA* genleri ile iki bileşenli düzenleyici bir sistem olan *phoP/phoR* gen çifti yer almaktadır. *mceIA* ve *mceIR* genlerinin bakterinin hücre içine girişinde ve konak dokularına adaptasyonda önemli roller üstlendiği gösterilmiştir (59, 60). *yrbEIA* ve *yrbEIA* ise membran bütünlüğü ve lipid taşınımı ile ilişkili olup, virülansla bağlantılı taşıyıcı proteinlerin bir parçası olarak değerlendirilmektedir (61). *phoP/phoR* iki bileşenli sistemi ise lipid metabolizması, hücre duvarı yapısı ve bağışıklık yanıtını etkileyen genlerin düzenlenmesi yoluyla virülansı şekillendirmektedir (62, 63). Bu bağlamda, *mceIA* ile *phoPR* genlerinin birlikte incelenmesi, bakterinin giriş ve çoğalma mekanizmalarının yanı sıra bağışıklık sisteminden kaçış stratejilerinin eş zamanlı değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Böyle bir yaklaşım, virülans faktörleri arasındaki işlevsel etkileşimlerin daha bütüncül biçimde anlaşılmasını mümkün kılmakta ve tüberküloz patogenezi üzerine geliştirilecek yeni tanı ve tedavi stratejilerine ışık tutmaktadır.

Bu çalışmada en az bir antitüberküloz ilaca dirençli 28 klinik izolat, *mceIR*, *mceIA*, *yrbEIA*, *yrbEIA*, *phoP* ve *phoR* gen bölgeleri özelinde H37Ra ve H37Rv referans suşları ile karşılaştırılmıştır. Yapılan analizlerde, söz konusu gen bölgelerinin baz dizilimlerinin her iki referans suşta da tamamen aynı olduğu saptanmıştır. Ancak ikisi arasında *phoP* geninin 852263. pozisyonunda tek bir nükleotid farklılığı gözlenmiştir. Bu

noktada H37Rv suşunda C (sitozin) bulunurken, H37Ra suşunda bunun yerine T (timin) bulunduğu NCBI veritabanında gerçekleştirilen BLAST analizleri sonucunda belirlenmiştir. Çalışmamızda incelenen izolatların tamamında 852263. pozisyonda H37Rv suşu ile aynı şekilde C (sitozin) tespit edilmiştir. Klinik izolatların virülan suş ile aynı baz dizilimine sahip olması, elde edilen bulgular arasında dikkat çekici ve çalışmanın özgün değerini artıran bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

H37Rv ve H37Ra suşları arasında *phoP* genindeki tek SNP dışında araştırdığımız gen bölgelerinde baz dizilimi açısından hiçbir farklılık görülmemesine rağmen, çalışmamızda analiz edilen klinik örneklerde bazı nükleotid farklılıkları tespit edilmiştir. Bu farklılıkların çoğunlukla amplikonların başlangıç ve bitiş kısımlarında yoğunlaşması, gözlenen değişimlerin okuma hatalarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Nitekim amplikonların kirli olması da yanlış baz çağrılarına yol açabilmektedir. Öte yandan, primer bağlanma bölgeleri dışındaki, temiz okuma sağlanan orta bölgelerde de az da olsa baz farklılıklarının bulunması dikkat çekicidir. Bu lokasyonlarda NCBI veritabanındaki izolatlarda herhangi bir farklılık görülmemekle birlikte, çalışmamızda elde edilen bu sonuçların literatür ile paylaşılmasının önemli olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, gözlenen değişimlerin yalnızca teknik sınırlılıklardan değil, popülasyon içi varyasyonlardan da kaynaklanabileceği ihtimali göz önünde bulundurulmuştur. Tek koloni üzerinden çalışmış olsak da, *M. tuberculosis kompleks*'in farklı popülasyon gruplarının analize dâhil olmuş olabileceği ihtimali de göz ardı edilmemelidir. Çalışmada kullanılan klinik izolatlarda SNP'lerin belirlendiği pozisyonlarda, kromatogram verilerinde referans suş olan H37Rv ile uyumlu bazlar görülmekle birlikte farklı nükleotidler de saptanmıştır. Bu durum, incelenen örneklerde tek tip bir popülasyondan ziyade farklı alt popülasyonların varlığına işaret edebilecek bulgular sunmaktadır.

Çalışmada incelenen tüm klinik örneklerde *phoR* gen bölgesinin 852910. pozisyonunda C → T nükleotid değişimi gözlenmiştir. Bu değişim, hem H37Rv hem de H37Ra referans suşlarında bulunmamakta, dolayısıyla klinik izolatlara özgü bir varyasyon olarak dikkat çekmektedir. Bu bulgu, çalışmada kullanılan örneklerin referans suşlardan farklılaşan potansiyel bir genetik özellik taşıdığını göstermesi açısından önemlidir.

Analiz edilen klinik örneklerde *mceLR* gen bölgesinde farklı tiplerde SNP'ler gözlenmiştir. Bunlar arasında özellikle C194172 ve A194183 pozisyonlarındaki

değişimlerin neredeyse tüm örneklerde tekrarlandığı dikkat çekmektedir. Ayrıca C→A 194173 ve G→C 194681 gibi belirli değişimlerin de birçok izolat arasında ortak olarak bulunması, bu mutasyonların popülasyon-içi varyasyonlar veya stabil polimorfizmler olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık, amplikonun başlangıç ve son kısımlarında ortaya çıkan bazı değişimler (örneğin 194814–194824 aralığı), okuma hatalarına da bağlı olabilir. Genel olarak bakıldığında, *mce1R* genindeki SNP örüntüsü, genin farklı klinik suşlarda değişkenliğe açık olduğunu göstermektedir. Ancak bu değişikliklerin biyolojik etkisinin netleştirilebilmesi için fonksiyonel analizlerle desteklenmesi gerekmektedir.

Klinik örneklerde *mce1A* gen bölgesinde hem transisyon hem de transversiyon türünde çok sayıda SNP gözlenmiştir. Çeşitli örneklerde insersiyonların (örn. 199169, 199173, 199174) ve delesyonların görülmesi, bu bölgede dizilim bütünlüğünün zaman zaman bozulduğunu ve okuma sırasında hatalı baz çağrılarının yol açabilecek bölgeler bulunduğunu ortaya koymaktadır. Ancak, bu değişimlerin farklı örneklerde tutarlı biçimde tekrar etmesi, gözlenen varyasyonların yalnızca teknik artefaktlardan ibaret olmadığını ve biyolojik anlam taşıyabileceğini düşündürmektedir.

Genin ikinci parçasında (199160–199898) de farklılıkların gözlemlendiği dikkati çekmektedir. Ayrıca 198697–198756 aralığında görülen çoklu transversiyonlar (örn. G→C 198735, T→C 198697, C→T 198727) bu bölgenin yüksek polimorfizm taşıdığını göstermektedir. Bu bulgular, *mce1A* gen bölgesinin hem baş hem de son kısımlarında değişimlerin yoğunlaştığını, ancak orta bölgelerde de kararlı biçimde tekrar eden SNP'lerin bulunduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla *mce1A*'da gözlenen varyasyonların bir kısmı okuma hatalarından kaynaklansa da, büyük bölümünün popülasyon-içi genetik farklılıklar veya klinik izolatlar arasında özgü doğal varyasyonlar olabileceği değerlendirilmektedir. Bu sonuçlar, *mce1A*'nın *M. tuberculosis* virülansında kritik rol üstlenen yapısal veya fonksiyonel motiflerinin evrimsel süreçte çeşitliliğe açık olduğunu düşündürmektedir.

yrbE1A gen bölgesinde oldukça yoğun bir SNP dağılımı gözlenmektedir. Klinik örneklerde *yrbE1A* gen bölgesinde hem insersiyon/delesyonlar hem de çok sayıda nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Özellikle 196907. pozisyonundaki insersiyonlar hemen tüm örneklerde tekrar etmiş, bu bölgenin varyasyona eğilimli bir lokus olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, 196898 (A→C) ve 196899 (C→A) değişimlerinin neredeyse tüm

izolatlarda gözlenmektedir. Ayrıca 196917 ve 197128 pozisyonlarında görülen G→C transversiyonlarının birçok örnekte yinelenmesi, bu bölgelerde varyasyonun sabitlenmiş olabileceğine işaret etmektedir. Bazı örneklerde (özellikle 7. örnek) çok sayıda ardışık transisyon ve transversiyonun birlikte görülmesi (196913–197145 aralığı) bu gen bölgesinin oldukça polimorfik olduğunu göstermektedir. Ayrıca 197422–197423 bölgesinde farklı örneklerde tekrarlayan değişimler de dikkat çekmektedir.

İncelenen klinik örneklerde *yrbEIA* gen bölgesinde oldukça zengin bir SNP profili saptanmıştır. Özellikle 197692–197694 aralığındaki insersiyon ve transversiyonların birden fazla örnekte tekrar etmesi, bu lokasyonların varyasyon açısından duyarlı bölgeler olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, 198531–198534 aralığında görülen çoklu insersiyonların farklı örneklerde yinelenmesi, bu pozisyonun gen diziliminde önemli bir değişkenlik alanı olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca 198463 ve 198529–198532 pozisyonlarındaki G→C değişimlerinin birçok izolatta görülmesi, bu varyasyonların rastlantısal hatadan öte anlamlı polimorfizmler olabileceğini düşündürmektedir.

Örneklerin bir kısmında ise çoklu transisyon ve transversiyonların aynı anda ortaya çıkması dikkat çekicidir. Özellikle 197853–197866 aralığında ve 198457–198525 bölgesinde saptanan farklı yönlerdeki baz değişimleri, genin belirli segmentlerinde yoğun bir polimorfizm yükü olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, bazı örneklerde insersiyon ve delesyonların eşlik etmesi (örn. 197787–197788, 198268–198337 aralıkları), bu gen bölgesinde yapısal varyasyonların da mevcut olabileceğine işaret etmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde, *yrbEIA* gen bölgesinde gözlenen varyasyonların büyük bir kısmının birden fazla izolatta ortaklaşa bulunması, klinik izolatlara özgü doğal varyasyonlar olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, *yrbEIA*'nin konakla etkileşim veya membran taşıma fonksiyonlarında evrimsel esneklik gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Klinik örneklerde *phoP* gen bölgesinde çok sayıda tekrar eden varyasyon gözlenmiştir. Özellikle 851651–851652 pozisyonlarında görülen insersiyonların neredeyse tüm örneklerde bulunması dikkat çekicidir ve bu bölgenin sekanslama sırasında hassas ya da varyasyona açık olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, 852073 (A→T) ve 852221 (A→C/T) pozisyonlarındaki değişimler birden fazla izolatta yinelenmiştir. Ayrıca 852085'teki G→C/A değişimleri ile 852223 ve 852250

pozisyonlarındaki G→A transisyonlarının birden çok örnekte bulunması, bu bölgelerde gerçek biyolojik varyasyon ihtimalini güçlendirmektedir.

Bazı örneklerde gözlenen çoklu G→N ve A→N değişimleri (ör. 851646, 852229, 852259, 852270) özellikle okuma kalitesinin düşük olduğu bölgelerde yoğunlaşmıştır. Bu durum teknik hatalardan kaynaklanabilmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde, klinik örneklerdeki bu varyasyon profili, *M. tuberculosis kompleks* suşlarının *phoP* üzerinden farklılaşabileceğini ve bunun da virülans mekanizmalarına katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

phoR gen bölgesinde yapılan SNP analizlerinde farklı örneklerde çok sayıda insersiyon, delesyon, transisyon ve transversiyon tipi varyasyon tespit edilmiştir. Bu değişiklikler genellikle 852396–853853 aralığında, hem genin ilk bölümünde (852396–853147) hem de ikinci bölümünde (853147–853853) yoğunlaşmaktadır. Çeşitli noktalarda gözlenen insersiyonlar (ör. 853140_853141), delesyonlar ve belirsiz baz atamaları (A→N, C→N vb.) sekanslama kalitesi ve varyasyon yoğunluğu açısından dikkate değerdir. Ayrıca G→A, A→G, A→C gibi farklı tipteki baz değişimlerinin genin fonksiyonel bölgelerine dağılmış olması, *phoR*'nin yüksek polimorfizm sergileyen bir gen olduğunu göstermektedir.

Özellikle C→T 852910 değişimi neredeyse tüm örneklerde tekrarlayan bir mutasyon olarak ortaya çıkmıştır. Bu varyasyonun bu denli tutarlı şekilde gözlenmesi, teknik bir hatadan ziyade biyolojik olarak korunmuş ve karakteristik bir değişim olabileceğini düşündürmektedir. *phoR*, iki komponentli *phoPR* düzenleyici sistemin sensör kinaz alt birimini kodladığından, 852910 konumundaki C→T mutasyonu genin fonksiyonel aktivitesi açısından kritik bir role sahip olabilir. Bu nedenle söz konusu değişimin düzenleyici mekanizmalara, sinyal algılama süreçlerine veya fosforilasyon kapasitesine etkisinin ileri analizlerle değerlendirilmesi gerekmektedir.

Her ne kadar istatistiksel analizlerde *mceLA2* grubu diğer genlere kıyasla anlamlı derecede daha düşük SNP yoğunluğu sergilese de, bu sonucun tamamen biyolojik stabiliteyi yansıtmadığı göz önünde bulundurulmalıdır. *mceLA2* bölgesine ait dizileme verilerinde okuma kalitesinin görece düşük olması ve bu nedenle değerlendirilen örnek sayısının azalması, grubun yapay olarak “en stabil” görünebilmesine yol açmış olabilir. Dolayısıyla bu bulgu, biyolojik gerçekliğin yanı sıra teknik sınırlılıkların da etkisini taşıyor olabilir.

Bu çalışmada *mceI* operonu ve *phoP* geninde gözlenen SNP'lerin birlikte incelenmesi, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks virölansının farklı düzeylerdeki düzenlenişini anlamak açısından önemli katkılar sunmuştur. *mceI* operonundaki değişiklikler, bakterinin konak hücre ile etkileşimi ve makrofaj içi persistansı gibi daha lokalize patojenite mekanizmalarını etkilerken; *phoP* genindeki SNP'ler, lipid biyosentezi ve antijen sekresyonu gibi çok sayıda virölans yolunu kontrol eden genel regülasyon mekanizmalarını değiştirmektedir. Bu iki bölgenin birlikte ele alınması, SNP'lerin bazen hipervirölans bazen de attenüasyon ile sonuçlanabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, tek nükleotid polimorfizmlerinin *M. tuberculosis kompleks*'in patojenitesinde çift yönlü etkiler yaratabileceği, bakterinin evrimsel adaptasyonunda ise bir denge mekanizması rolü üstlendiği ortaya konmuştur. Böylece, bu tezde hem spesifik fonksiyonel genlerdeki (*mceI*) hem de genel düzenleyici genlerdeki (*phoP*) değişimlerin birlikte incelenmesi, *M. tuberculosis kompleks*'in virölans stratejilerini daha bütüncül bir bakış açısıyla değerlendirme imkânı sağlamaktadır.

6 SONUÇ ve ÖNERİLER

Çukurova Bölgesi'nde izole edilen, en az bir antitüberküloz ilaca dirençli *M. tuberculosis* kompleks suşlarının virülansla ilişkili olduğu öngörülen *mceI* gen kümesine ait *mceI R*, *mceI A*, *yrbE1A* ve *yrbE1A* gen bölgeleri ile iki bileşenli *phoPR* düzenleyici sistemindeki *phoP* ve *phoR* gen bölgelerinde SNP varlığının araştırılması, varsa suşlar arasındaki filogenetik ilişkinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda;

1. NCBI veritabanına dayanılarak, H37Rv ve H37Ra referans suşlarındaki bu gen dizilimlerinin karşılaştırılması sonucunda yalnızca *phoP* geninde tek bir noktada transversiyon (C→T) olduğu belirlenmiş, bütün klinik izolatlarımızın bu pozisyonda virulan H37Rv suşu ile aynı dizilimi gösterdiği,
2. *phoR* geninde, H37Rv referans suşunun 852910. pozisyonundaki C nükleotidinin bütün klinik örneklerimizde T ile yer değiştirdiği,
3. Farklı klinik örneklerimizde, *yrbE1A* geni başta olmak üzere bazı gen bölgelerinin iç kısımlarında çeşitli SNP'ler tespit edildiği, ancak bunların kromatogramı manuel olarak incelendiğinde aynı noktalarda referans H37RV suşundaki nükleotidlerin de bulunduğu gözlemlendi.

Araştırdığımız bütün genlerin başlangıç ve bitiş bölgelerinde de çeşitli SNP'lerin bulunmasının okuma hatası sebebiyle olabileceği gözönünde bulundurulsa da, iç kısımlardaki SNP'lerle birlikte değerlendirildiğinde; bu durumun MTBK içi genetik çeşitlilikten de kaynaklanmış olabileceği düşünüldü. Elde edilen bulgular, *mceI* operon bölgesinde yer alan genlerindeki değişimlerin, bakterinin hücre içine giriş ve persistans gibi lokalize patojenite süreçlerini etkileyebileceğini, *phoP* ve *phoR* genlerindeki SNP'lerin ise lipid biyosentezi ve antijen sekresyonu gibi çok yönlü düzenleyici mekanizmaları değiştirebileceğine dair ön veriler ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında belirlenen varyasyonlar, ileride yapılacak fonksiyonel analizlerle desteklendiğinde, yeni tanı ve tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayabilecek potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilebilir ve ayrıca klinik izolatların *mceI* ve *phoPR* gen bölgelerindeki SNP'ler aracılığıyla filogenetik ayırımıa ışık tutabilir.

KAYNAKLAR

1. **Dong Y, Ou X, Zhao B, Wang Y, Liu Y, Liu Z, vd.** Phylogenetically informative mutations in drug resistance genes of human-infecting mycobacterium bovis. *Transbound Emerg Dis.* **2024**;2024(1).
2. **Jabbar A, Phelan J, Sessions P, Khan T, Rahman H, Khan S, vd.** Whole genome sequencing of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* kompleks isolates from a high burden tuberculosis region of north west pakistan. *Sci Rep.* **2019**;9(1).
3. **Ley S, Vos M, Rie A, Warren R.** Deciphering within-host microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* kompleks through whole-genome sequencing: the phenotypic impact and way forward. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2019**;83(2).
4. **Zewdie O, Mihret A, Abebe T, Kebede A, Desta K, Worku A, vd.** Genotyping and molecular detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* kompleks among tuberculosis lymphadenitis cases in addis ababa, ethiopia. *New Microbes New Infect.* **2018**;21:36-41.
5. **Tilahun M, Shimelis E, Wogayehu T, Assefa G, Wondimagegn G, Mekonnen A, vd.** Molecular detection of multidrug resistance pattern and associated gene mutations in *M. tuberculosis* kompleks isolates from newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients in addis ababa, ethiopia. *Plos One.* **2020**;15(8):0236054.
6. **Oliveira L, Muniz-Sobrinho J, Magno L, Melo S, Macho A, Rios-Santos F.** Detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* kompleks strains isolated in brazil using a multimarker genetic assay for katg and rpoB genes. *Braz J Infect Dis.* **2016**;20(2):166-72.
7. **Ssengooba W, Jong B, Joloba M, Cobelens F, Meehan C.** Whole genome sequencing reveals mycobacterial microevolution among concurrent isolates from sputum and blood in hiv infected tb patients. *BMC Infect Dis.* **2016**;16(1).
8. **Rajwani R, Galata C, Lee A, So P, Leung K, Tam K, vd.** A multi-omics investigation into the mechanisms of hyper-virulence in *Mycobacterium tuberculosis* kompleks. *Virulence.* **2022**;13(1):1088-100.
9. **Rajwani R, Yam W, Zhang Y, Kang Y, Wong B, Leung K, vd.** Comparative whole-genomic analysis of an ancient l2 lineage *Mycobacterium tuberculosis* kompleks reveals a novel phylogenetic clade and common genetic determinants of hypervirulent strains. **2018**.
10. **Øyås O, Borrell S, Trauner A, Zimmermann M, Feldmann J, Liphardt T, vd.** Model-based integration of genomics and metabolomics reveals SNP functionality in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2020**;117(15):8494-502.
11. **Copin R, Wang X, Louie E, Escuyer V, Coscollà M, Gagneux S, vd.** Within host evolution selects for a dominant genotype of *Mycobacterium tuberculosis* kompleks while t cells increase pathogen genetic diversity. *Plos Pathog.* **2016**;12(12):1006111.
12. **Rao M, Wollenberg K, Harris M, Kulavalli S, Thomas L, Chawla K, vd.** Lineage classification and antitubercular drug resistance surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* kompleks by whole-genome sequencing in southern india. *Microbiol Spectr.* **2023**;11(5).
13. **Nguyen Q, Contamin L, Nguyen T, Bañuls A.** Insights into the processes that drive the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* kompleks. *Evol Appl.* **2018**;11(9):1498-511.

14. **Munir A, Kumar N, Ramalingam S, Tamilzhalagan S, Shanmugam S, Palaniappan A, vd.** Identification and characterization of genetic determinants of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*kompleks in southern india. *Sci Rep.* **2019**;9(1).
15. **Rose G, Cortes T, Comas I, Coscollá M, Gagneux S, Young D.** Mapping of genotype–phenotype diversity among clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*kompleks by sequence-based transcriptional profiling. *Genome Biol Evol.* **2013**;5(10):1849-62.
16. **Wang M, Zhang Y, Huang C, Li J, Shen X, Zhao G, vd.** A whole-genome sequencing-based study to delineate the risk and characteristics of tuberculosis transmission in an insular population over 10 years in shanghai. *Front Microbiol.* **2022**;12.
17. **Motsinger-Reif A, Antas P, Oki N, Levy S, Holland S, Sterling T.** Polymorphisms in il-1 β , vitamin d receptor fok1, and toll-like receptor 2 are associated with extrapulmonary tuberculosis. *BMC Med Genet.* **2010**;11(1).
18. **Zhang G, Zhou B, Wang W, Zhang M, Zhao Y, Wang Z, vd.** A functional single-nucleotide polymorphism in the promoter of the gene encoding interleukin 6 is associated with susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis.* **2012**;205(11):1697-704.
19. **Bhattacharyya K, Nemaysh V, Joon M, Pratap R, Varma-Basil M, Bose M, vd.** Correlation of drug resistance with single nucleotide variations through genome analysis and experimental validation in a multi-drug resistant clinical isolate of *M. tuberculosis* kompleks. *BMC Microbiol.* **2020**;20(1).
20. **Pietrantonio T, Correa J, Orlova M, Behr M, Schurr E.** Joint effects of host genetic background and mycobacterial pathogen on susceptibility to infection. *Infect Immun.* **2011**;79(6):2372-8.
21. **Ohol Y, Goetz D, Chan K, Shiloh M, Craik C, Cox J.** *Mycobacterium tuberculosis*kompleks kompleks mycp1 protease plays a dual role in regulation of esx-1 secretion and virulence. *Cell Host Microbe.* **2010**;7(3):210-20.
22. **Welin A, Winberg M, Abdalla H, Särndahl E, Rasmusson B, Stendahl O, vd.** Incorporation of *Mycobacterium tuberculosis*komplekslipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. *Infect Immun.* **2008**;76(7):2882-7.
23. **Patin E, Geffken A, Willcocks S, Leszczczyk C, Haas A, Nimmerjahn F, vd.** Trehalose dimycolate interferes with fcyr-mediated phagosome maturation through mincle, shp-1 and fcyr1b signalling. *Plos One.* **2017**;12(4):0174973.
24. **Pym A, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole S.** Loss of rd1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines mycobacterium bovis bcg and mycobacterium microti. *Mol Microbiol.* **2002**;46(3):709-17.
25. **Kong Y, Cave M, Yang D, Zhang L, Marrs C, Foxman B, vd.** Distribution of insertion- and deletion-associated genetic polymorphisms among four *Mycobacterium tuberculosis*kompleks phospholipase c genes and associations with extrathoracic tuberculosis: a population-based study. *J Clin Microbiol.* **2005**;43(12):6048-53.
26. **Brennan M, Delogu G, Chen Y, Bardarov S, Kriakov J, Alavi M, vd.** Evidence that mycobacterial pe_pgrs proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun.* **2001**;69(12):7326-33.
27. **Santangelo M, Blanco F, Bianco M, Klepp L, Zabal O, Cataldi A, vd.** Study of the role of mce3r on the transcription of mce genes of *Mycobacterium tuberculosis*kompleks. *BMC Microbiol.* **2008**;8(1).

28. Sachdeva P, Misra R, Tyagi A, Singh Y. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis* komplek: regulation of the regulators. *Febs J*. **2010**;277(3):605-26.
29. Triccas J, Gicquel B. Life on the inside: probing *Mycobacterium tuberculosis* komplek gene expression during infection. *Immunol Cell Biol*. **2000**;78(4):311-7.
30. Stavrum R, Stavrum A, Valvatne H, Riley L, Ulvestad E, Jonassen I, vd. Correction: modulation of transcriptional and inflammatory responses in murine macrophages by the *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry (mce) 1 complex. *Plos One*. **2011**;6(11).
31. Chitale S, Ehrt S, Kawamura I, Fujimura T, Shimono N, Anand N, vd. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cell Microbiol*. **2001**;3(4):247-54.
32. Cheigh C, Senaratne R, Uchida Y, Casali N, Kendall L, Riley L. Posttreatment reactivation of tuberculosis in mice caused by *mycobacterium tuberculosis* disrupted in *mce1* R. *J Infect Dis*. **2010**;202(5):752-9.
33. Queiroz A, Medina-Cleghorn D, Marjanovic O, Nomura DK, Riley LW. Comparative metabolic profiling of *mce1* operon mutant vs wild-type *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Pathog Dis*. **2015**;73(8):ftv066.
34. Stavrum R, Valvatne H, Stavrum A, Riley L, Ulvestad E, Jonassen I, vd. *Mycobacterium tuberculosis* *mce1* protein complex initiates rapid induction of transcription of genes involved in substrate trafficking. *Genes Immun*. **2012**;13(6):496-502.
35. Lima P, Sidders B, Morici L, Reader J, Senaratne R, Casali N, vd. Enhanced mortality despite control of lung infection in mice aerogenically infected with a *Mycobacterium tuberculosis* *mce1* operon mutant. *Microbes Infect*. **2007**;9(11):1285-90.
36. Haile Y. *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry operon (mce) homologs in mycobacterium other than tuberculosis (mott. *Fems Immunol Med Microbiol*. **2002**;33(2):125-32.
37. Casali N, White A, Riley L. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* *mce1* operon. *J Bacteriol*. **2006**;188(2):441-9.
38. Uchida Y, Casali N, White A, Morici L, Kendall L, Riley L. Accelerated immunopathological response of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* disrupted in the *mce1* operon negative transcriptional regulator. *Cell Microbiol*. **2007**;9(5):1275-83.
39. Cantrell S. Regulated alteration of mycolic acid structure in the cell wall of mycobacterium tuberculosis. *Mycobact Dis*. **2013**;02(03).
40. Petrilli J, Müller I, Araújo L, Cardoso T, Carvalho L, Barros B, vd. Differential host pro-inflammatory response to mycobacterial cell wall lipids regulated by the *mce1* operon. *Front Immunol*. **2020**;11.
41. Pasricha R, Chandolia A, Ponnan P, Saini NK, Sharma S, Chopra M, vd. Single nucleotide polymorphism in the genes of *mce1* and *mce4* operons of *Mycobacterium tuberculosis*: analysis of clinical isolates and standard reference strains. *BMC Microbiol*. **2011**;11:41.
42. Casali N, Riley LW. A phylogenomic analysis of the Actinomycetales mce operons. *BMC Genomics*. **2007**;8(1):60.
43. Walters SB, Dubnau E, Kolesnikova I, Laval F, Daffe M, Smith I. The *Mycobacterium tuberculosis* *PhoPR* two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis. *Mol Microbiol*. **2006**;60(2):312-30.

44. **Belardinelli J, Arora D, Avanzi C, Wheat W, Bryant J, Spencer J, vd.** Clinically relevant mutations in the *phoR* sensor kinase of host-adapted mycobacterium abscessus isolates impact response to acidic pH and virulence. *Microbiol Spectr.* **2023**;11(6).
45. **Waturuocha U, Krishna M, Malhotra V, Dixit N, Saini D.** A low-prevalence single-nucleotide polymorphism in the sensor kinase *phoR* in *Mycobacterium tuberculosis* suppresses its autophosphatase activity and reduces pathogenic fitness: implications in evolutionary selection. *Front Microbiol.* **2021**;12.
46. **Gonzalo-Asensio J, Malaga W, Pawlik A, Astarie-Dequeker C, Passemar C, Moreau F, vd.** Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the *phoPR* virulence regulator. *Proc Natl Acad Sci.* **2014**;111(31):11491-6.
47. **Tan S, Sukumar N, Abramovitch R, Parish T, Russell D.** *Mycobacterium tuberculosis* responds to chloride and pH as synergistic cues to the immune status of its host cell. *Plos Pathog.* **2013**;9(4):1003282.
48. **Feng L, Chen S, Hu Y.** *PhoPR* positively regulates *whiB3* expression in response to low pH in pathogenic mycobacteria. *J Bacteriol.* **2018**;200(8).
49. **Puri-Taneja A, Paul S, Chen Y, Hulett F.** CcpA causes repression of the *phoPR* promoter through a novel transcription start site, p_{a6}. *J Bacteriol.* **2006**;188(4):1266-78.
50. **García E, Blanco F, Bigi M, Vázquez C, Forrellad M, Rocha R, vd.** Characterization of the two component regulatory system *phoPR* in mycobacterium bovis. *Vet Microbiol.* **2018**;222:30-8.
51. **Soler-Camargo N, Silva-Pereira T, Zimpel C, Camacho M, Zelanis A, Aono A, vd.** The rate and role of pseudogenes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microb Genomics.* **2022**;8(10).
52. **Pérez I, Campos-Pardos E, Díaz C, Uranga S, Sayes F, Vicente F, vd.** The *Mycobacterium tuberculosis phoPR* virulence system regulates expression of the universal second messenger c-di-AMP and impacts vaccine safety and efficacy. *Mol Ther Nucleic Acids.* **2022**;27:1235-48.
53. **Botella E, Hübner S, Hokamp K, Hansen A, Bisicchia P, Noone D, vd.** Cell envelope gene expression in phosphate-limited bacillus subtilis cells. *Microbiology.* **2011**;157(9):2470-84.
54. **Dechow S, Goyal R, Johnson B, Abramovitch R.** Carbon dioxide regulates *Mycobacterium tuberculosis phoPR* signaling and virulence. *Infect Immun.* **2022**;
55. **Abramovitch R, Rohde K, Hsu F, Russell D.** *aprabC*: a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome. *Mol Microbiol.* **2011**;80(3):678-94.
56. **Singh P, Goar H, Paul P, Mehta K, Bamniya B, Vijjamarri A, vd.** Dual functioning by the *phoR* sensor is a key determinant to *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Plos Genet.* **2023**;19(12):1011070.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Kararı

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Tarih
113	9 Temmuz 2021

KARAR NO 42- Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda, Prof. Dr. Fatih Kılıksal yönetiminde, Nimet Büşra Karamaz tarafından yürütülmesi öngörülen, "Mycobacterium Tuberculosis Suşlarının Filogenetik İlişkisinin SNP ile İncelenmesi" başlıklı doktora tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

ÖZGEÇMİŞ

Nimet Büşra KARARMAZ, 2014 yılında İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun oldu. 2014–2018 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı'nda “İmmünmodülatör Etkisi Olan İnterlökin-10 Sitokin Geninin Klonlanması” isimli tez çalışması ile yüksek lisansını tamamladı. 2019 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. Doktora eğitimini “Çukurova Bölgesi'ndeki *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Filogenetik İlişkisinin SNP İle İncelenmesi” başlıklı tez çalışması ile 2025 yılında tamamladı. 2022 yılından itibaren Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.