


# Tüberküloz Hastalarının Yeni Nesil Dizileme ile Genetik İncelemesi

## Genetic Investigation of Patients with Tuberculosis by Next Generation Sequencing

 Serkan BELKAYA

İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi  
Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve  
Genetik Bölümü, Ankara, Türkiye  
Department of Molecular Biology and  
Genetics, İhsan Doğramacı Bilkent  
University Faculty of Science, Ankara,  
Türkiye

ORCID ID

SB : 0000-0003-4214-382X



### ÖZ

**Amaç:** Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu hayatı tehdit eden bulaşıcı bir hastalıktır. Enfekte bireylerin sadece küçük bir kısmı aktif TB geliştirir ve hastalığın farklı tutulumları olabilir. Ancak TB'ye yatkınlığın altında yatan insan genetik faktörleri büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada aksi halde sağlıklı bireylerde TB'nin insan genetik temelini incelemesi amaçlandı.

**Gereç ve Yöntemler:** Aktif TB tanısı konulan toplam 10 hasta incelendi. Hastaların periferik kanından izole edilen genomik DNA kullanılarak tüm ekzom dizilemesi yapıldı. Derinlemesine varyant filtreleme adımlarını takiben mutasyona uğramış genler üzerinde aşırı temsil ve gen ontolojisi analizleri yapıldı.

**Bulgular:** Medyan yaşı 12,5 yıl, altısı kadın, dördü erkek olan hastaların altısı milliyer, ikisi akciğer ve ikisi yumuşak doku TB hastası idi. Hastaların hiçbirinde, interlökin (IL)-12/interferon (IFN)- $\gamma$  ekseninde yer alan genlerde veya immünitinin doğuştan gelen bozuklukları ile ilişkili genlerde alel frekansı  $<1\%$  olan potansiyel fonksiyon kaybı veya yanlış anlamlı mutasyonlar tespit edilmedi. On hastada toplam 36 gende 36 farklı nadir görülen homozigot veya hemizigot potansiyel fonksiyon kaybı veya bilgisayar ortamında hasar verici olduğu tahmin edilen yanlış anlamlı varyasyonlar belirlendi. Bu mutasyona uğramış genlerin arasında iyon nakli, Wnt sinyalinin düzenlenmesi, cGMP/PKG sinyalizasyonu, G alfa (12/13) sinyalizasyonu, DNA replikasyon ve transkripsiyonu, golgiye ulaşım, hücre morfolojisi ve hareketi, sert dokuların gelişimi ve dolaşım sistemindeki vasküler süreçler gibi çeşitli biyolojik süreçlerde ve yollarda yer alan genlerin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ( $p<0,05$ ) aşırı temsil edildiği bulundu.

**Sonuç:** IL-12/IFN- $\gamma$  eksenini dışındaki biyolojik yollarda bulunan genetik kusurlar, en azından bazı olgularda, TB'ye duyarlılıkta ve hastalığın şiddetinde bireyler arası farklılığı açıklayabilir.

**Anahtar kelimeler:** İnsan genetiđi, tüberküloz, tüm ekzom dizileme, yolak analizi.

Cite this article as: Belkaya S. Genetic Investigation of Patients with Tuberculosis by Next Generation Sequencing. Journal of Izmir Chest Hospital 2022;36(3):121–127.

Geliş (Received): Temmuz 26, 2022 Kabul (Accepted): Eylül 07, 2022 Çevrimiçi (Online): Aralık 19, 2022

Sorumlu yazar (Correspondence author): Serkan BELKAYA, MD. İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara, Türkiye.

Tel: +90 312 290 24 19 e-mail: sbelkaya@bilkent.edu.tr

© Copyright 2022 by Journal of Izmir Chest Hospital - Available online at www.ighdergisi.org

**ABSTRACT**

**Objective:** Tuberculosis (TB) is a life-threatening infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Only a small proportion of infected individuals develops active disease with a variety of clinical manifestations. However, human genetic factors underlying susceptibility to TB are largely unknown. This study therefore aimed to dissect the human genetic basis of TB in otherwise healthy individuals.

**Material and Methods:** Total of 10 patients diagnosed with active TB were studied. Whole exome sequencing was done using genomic DNA isolated from peripheral blood of patients. Over-representation and gene ontology analyses were performed on mutated genes following in-depth variant filtering steps.

**Results:** There were six miliary, two pulmonary, and two soft-tissue TB patients, with a median age of 12.5 and female to male ratio of 6/4. None of the patients carried potential loss of function or missense mutations with allele frequency (AF) <1% in genes involved in the IL-12/IFN- $\gamma$  signaling axis or genes associated with inborn error of immunity. We identified total 36 rare homozygous or hemizygous potential loss of function or in silico predicted to be damaging missense variations in 36 genes in 10 patients. We found statistically significant ( $p < 0.05$ ) enrichment of mutated genes involved in various biological processes and pathways, such as ion transport, regulation of Wnt signaling, cGMP/PKG signaling, G alpha (12/13) signaling, DNA replication and transcription, transport to Golgi, cell morphology and movement, development of hard tissues, and vascular processes in circulatory system, in patients.

**Conclusion:** Genetic defects in biological pathways other than the IL-12//IFN- $\gamma$  axis may account for inter-individual variation in susceptibility to and severity of TB, at least in some cases.

**Keywords:** Human genetics, tuberculosis, whole exome sequencing, pathway analysis.

**GİRİŞ**

Mycobacteriaceae familyasının tek cinsi olan *Mycobacterium* cinsi 100'den fazla tür içerir ve bu türlerin birkaçı zorunlu parazitler, ancak çoğu çevresel saprofitlerdir.<sup>[1]</sup> *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* ve *Mycobacterium pinnipedii* tüberküloz (TB) hastalığına yol açan *M. tuberculosis* kompleks grubunu oluşturmaktadır.<sup>[2]</sup> *M. tuberculosis* kompleksinin herhangi bir üyesinin neden olabileceği önlenemez ve tedavi edilebilir bir hastalık olan TB, günümüzde her yaşta insan için önemli bir küresel sağlık sorunu olmaya devam etmektedir.<sup>[3]</sup> *M. tuberculosis*'e maruz kalma, (i) bakterilerin tamamen ortadan kaldırılması, (ii) TB enfeksiyonu (yalnızca test pozitifliği ile seyreden asemptomatik bir durum) veya (iii) klinik olarak TB hastalığı ile sonuçlanabilir.<sup>[2]</sup> TB basili ile enfekte olan bireylerin yaklaşık %5'inde bulaştan sonraki yaklaşık iki yıl içinde klinik TB gelişmektedir.<sup>[4]</sup> TB genellikle bir akciğer hastalığı olarak ortaya çıkmakla birlikte basiliin kan dolaşımı yolu ile yayılması sonucu ortaya çıkan miliyer ve/veya ekstrapulmoner tüberküloz (EPT) sıklığı ülkeden ülkeye değişmektedir.<sup>[3]</sup> Tüm yeni TB olgularının yaklaşık %20'sinde EPT akciğer tutulumu ile seyrederken, %6'sında akciğer tutulumu olmaksızın seyreden EPT tüm organları etkileyebilir.<sup>[3,5,6]</sup>

*M. tuberculosis*'e karşı immünolojik savunmaya öncelikle CD4+ T lenfositler ve makrofajlar aracılık eder.<sup>[2]</sup> Bu *M. tuberculosis* spesifik CD4+ T lenfositleri öncelikle interferon (IFN)- $\gamma$  ve tümör nekroz faktörü (TNF)- $\alpha$  içeren sitokinleri üretir.<sup>[2]</sup> TB hastalıkları, immünolojik yanıtın sürekliliğini yansıtmaktadır. Spektrumun bir ucunda, T lenfosit proliferasyonunun başarısızlığı sonucunda şiddetli dissemine bir hastalık görülürken, diğer ucunda ise etkili bir bağışıklık yanıtı sonucu *M. tuberculosis* enfeksiyonuna karşı doğal direnç olduğunu düşündüren, hiçbir zaman klinik hastalık gelişmeyen veya tedavi gerektirmeyen asemptomatik enfeksiyon durumu söz konusudur.<sup>[2]</sup> Bu duruma sebep olarak, konağın doğal (IFN- $\gamma$  yolağında kalıtsal kusur vb.) ve kazanılmış (anti-TNF monoklonal antikor tedavisi, insan immün yetmezlik virüsü [HIV]-1 enfeksiyonu vb.) bağışıklık sistemlerini

etkileyen genetik veya çevresel faktörlerin ve bakteriyel mekanizmaların TB'ye yakınlıkta rol oynadığı düşünülmektedir.<sup>[7-9]</sup> Son yıllarda, mikobakteriyel enfeksiyona yanıtın değişkenliğinde konak genetik faktörlerinin önemli bir rol oynadığını gösteren epidemiyolojik ve moleküler kanıtlar giderek artmaktadır.<sup>[10-19]</sup> Ancak TB hastalığının patogenezi hala büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu çalışmada, aksi halde sağlıklı olan bireylerde TB enfeksiyonuna yakınlığın genetik bir temeli olduğu hipotezi ile farklı TB fenotiplerine sahip hastalarda yeni nesil dizileme ile genetik inceleme yapmak amaçlandı.

**GEREÇ ve YÖNTEM****Hasta Popülasyonu**

Bu çalışma, İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi Etik Kurulu onayı (2021\_06\_23\_03) ile Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi kurallarına uygun şekilde ve yönlendiren hekimler tarafından tüm hastalar ve/veya yasal temsilcilerinden gönüllü bilgilendirilmiş onam formları alınarak yapıldı. Hasta alımı retrospektif olarak yapılmış olup, çalışmaya 0–25 yaş aralığında TB tanısı konulmuş, primer veya sekonder bir immün yetmezlik hastalığı olmayan, *M. tuberculosis* kompleks enfeksiyonu dışında eşlik eden herhangi bir patojen ile çoklu enfeksiyonu olmayan, immünsüpresif veya anti-TNF monoklonal antikor gibi ilaç kullanımı olmayan, aktif TB hastalığı olan bireyler ile temas öyküsü olmayan, kronik hastalık veya malignitesi olmayan ve TB tanısına kadar tamamen sağlıklı olan bireyler dahil edildi.

**Tüm Ekzom Dizileme**

NucleoSpin kan mini kiti (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak hastaların periferik kan örneklerinden genomik DNA (gDNA) izole edildi ve tüm ekzom dizileme için kullanıldı. Tüm ekzom dizileme Macrogen (Güney Kore) firmasından hizmet alımı olarak gerçekleştirildi. SureSelect insan tüm ekzom kiti (Agilent Technologies, A.B.D.) kullanılarak kütüphane hazırlama ve hedef zenginleştirilmesi yapıldı.

Tablo 1: Çalışmaya dahil edilen hastaların özellikleri

Hasta	Hastalık başlangıç yaşı	Cinsiyet	Akraba evliliği	BCG aşısı	TDT	Tanı
P1	17	K	Hayır	Hayır	Negatif	Miliyer TB
P2	18	E	Hayır	Evet	Yapılmadı	Miliyer TB
P3	10	K	Evet	Hayır	Pozitif	Miliyer TB
P4	5	K	Evet	Evet	Negatif	Yumuşak doku TB
P5	7	K	Hayır	Evet	Pozitif	Yumuşak doku TB
P6	17	K	Evet	Evet	Pozitif	Miliyer TB
P7	2	E	Evet	Evet	Pozitif	Pulmoner TB
P8	9	K	Evet	Evet	Negatif	Miliyer TB
P9	15	E	Evet	Evet	Pozitif	Pulmoner TB
P10	23	E	Hayır	Evet	Pozitif	Miliyer TB

BCG: Bacillus Calmette Guerin aşısı, TDT: Tüberkülin deri testi, K: Kadın, E: Erkek, TB: Tüberküloz.

NovaSeq 6000 dizileme sistemi (Illumina, A.B.D.) kullanılarak 150 bazlık küt uç dizileme gerçekleştirildi. FASTQ dosyaları oluşturulup, BWA-MEM yazılımı kullanılarak insan referans genomuna (GRCh37) hizalama yapıldıktan sonra, GATK ve SnpEFF yazılımları ile varyant anotasyonları yapıldı. Alel frekansları gnomAD ve 1000 Genomes veri tabanlarından elde edildi. Bilgisayar ortamında patojenisite tahminleri için “Combined Annotation-Dependent Depletion (CADD)” ve “Mutation Significance Cut-off (MSC)” algoritmaları kullanıldı.<sup>[20,21]</sup>

### Aşırı Temsil ve İstatistiksel Analizler

Aşırı temsil analizleri ConsensusPathDB veri tabanında bulunan önceden tanımlanmış gen kümelerinin yolağa dayalı ve gen ontolojisi-ne dayalı iki kategorisi kullanılarak yapıldı.<sup>[22]</sup> Önceden tanımlanmış kümelerin her biri için hem önceden tanımlanmış kümede hem de kullanıcı tarafından belirtilen gen listesinde bulunan genlerin sayısına dayalı olarak hipergeometrik test kullanılarak bir p değeri hesaplandı. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar GraphPad Prism (A.B.D.) yazılımı kullanılarak çizildi.

### BULGULAR

Çalışma kapsamında *M. tuberculosis* enfeksiyonu olan 10 hasta değerlendirildi. Hastaların medyan yaşı 12,5 (2–23) yıl iken, altısı kadın ve dördü erkekti. Dört hastanın anne ve babası arasında bildirilen bir akrabalık yok iken, iki hastanın anne ve babası birinci derece, dört hastanın anne ve babası ikinci derece akraba idi. Hiçbir hastanın ailesinde primer immün yetmezlik öyküsü yoktu. Yedi hasta Bacillus Calmette Guerin (BCG) aşısı ile aşılanmış, ancak üç hastada aşı-lama yapılmamıştı. Hastaların tüberkülin deri testi (TDT) sonuçları değerlendirildiğinde bir hastada testin yapılmadığı, yedi hastada testin pozitif ve iki hastada ise testin negatif olduğu tespit edildi. Tüm hastalarda TB tanısı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), kültür ve görüntüleme teknikleri ile doğrulanmış olup, iki hastaya pulmoner TB, iki hastaya yumuşak doku TB ve altı hastaya ise miliyer TB tanısı konulmuştu. Pulmoner TB tanısı alan iki hastanın birinde (P9) balgam aside dirençli basil (ARB) boyama ve balgam *M. tuberculosis* kültürü pozitif, diğer hastada (P7) ise gastrik aspirat sıvısında *M. tubercu-*

*losis* PCR pozitif saptandı ve her iki hastada da toraks bilgisayarlı tomografide (BT), TB ile uyumlu infiltrasyon alanları ve hiler lenfadenopatiler tespit edildi. Yumuşak doku TB olan iki hastada (P4, P5) yapılan yüzeysel doku ultrasonografide deri altı yağ ve kas düzlemleri arasında yer alan ekojenitesi artmış, yoğun içerikli ve kalın duvarlı kistik kitle lezyonu görülmüş, apse drenaj materyalinden yapılan kültürde *M. tuberculosis* üremesi, eksizyon materyalinin histopatolojik incelemesinde ise kazeöz nekroz saptandı. Miliyer TB tanısı alan altı hastanın üçünde (P1, P2, P8) santral sinir sistemi tutulumu gözlemlendi, beyin omurilik sıvılarında (BOS) *M. tuberculosis* kültür ve PCR pozitifliği ve kraniyal manyetik rezonans görüntüleme (MRG) çok sayıda tüberküloz tespit edildi. Bu üç hastada toraks BT'de TB ile uyumlu infiltrasyon alanlarına ek olarak paratrakeal, subkarinal ve hiler alanlarda çok sayıda lenfadenopati saptandı. Kalan üç hastada (P3, P6, P10) ise pulmoner tutulumu ek olarak abdominal TB tespit edildi. Hastaların abdomene yönelik görüntülemelerinde hepatosplenomegali ve dalakta multipl hipointens alanlar ve portal hilus, mezenterik ve paraaortik alanlarda konglomere lenfadenopatiler saptandı. Tüm hastalar immünolojik açıdan değerlendirildi. Buna göre; tüm hastaların HIV-1 test sonucu negatifti, serum immünglobulin (Ig) değerleri (IgG ve IgG alt grupları, IgA, IgM ve IgE), absolü lenfosit sayıları ve immün fenotiplerleri (B, T ve NK hücre sayıları, yüzdeleri ve CD4/CD8 oranı) ve NBT ve/veya DHR testleri normaldi. Hastalar 1'den 10'a kadar numaralandırıldı ve özellikleri Tablo 1'de gösterildi.

Hastaların periferik kan örneklerinden izole edilen gDNA kullanılarak tüm ekzom dizileme gerçekleştirildi. Aksi takdirde sağlıklı bireylerde şiddetli mikobakteriyel hastalıklara duyarlılığın nadir olduğu (<1/10.000) göz önüne alındığında, kamuya açık veri tabanlarında (gnomAD ve 1000 Genom) bildirilen %1'den fazla alel frekansına sahip polimorfik varyantlar analize dahil edilmedi. Yalnızca kapsama derinliği (DP) 10'dan yüksek, alel derinliği (AD)/DP oranı 0,25'ten yüksek ve haritalama kalitesi (MQ) 40'tan yüksek olan varyantlar korundu. Daha sonra, farklı kalıtım modelleri altında potansiyel işlev kaybı varyasyonları başlangıç kaybı (start-lost), dur kaybı (stop-lost), anlamsız (nonsense), ekleme (insertion), silme (deletion) ve esansiyel kırılma bölgesi (essential splicing) ve yanlış anlamlı (missense) varyasyonlar seçildi (Tablo 2). İlk olarak, önyargılı bir yaklaşım izlendi ve

**Tablo 2. Hastaların tüm ekzom dizileme analizi.**

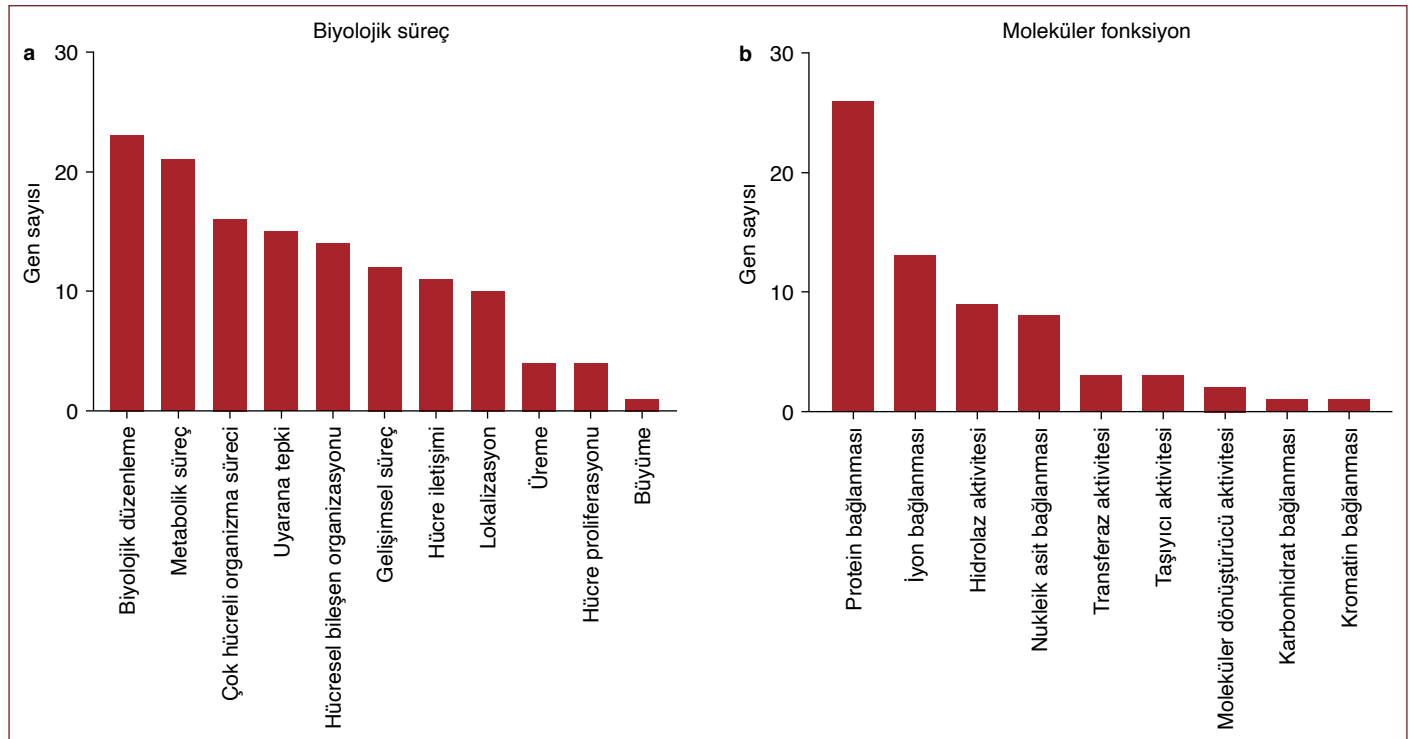
Analiz	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Toplam	144.362 (23.868)	111.521 (18.766)	148.437 (22.668)	112.445 (18.813)	113.751 (18.962)	110.211 (18.832)	109.881 (18.740)	113.484 (18.940)	155.544 (20.130)	110.525 (19.203)
AF < %1	3,148 (2,198)	2,669 (2,035)	3,432 (2,503)	2,813 (2,101)	2,721 (2,043)	2,493 (1,862)	2,552 (1,850)	2,597 (1,997)	4,729 (3,038)	2,719 (1,909)
Potansiyel işlev kaybı ve yanlış anlamalı	399 (374)	384 (360)	422 (405)	420 (395)	423 (404)	407 (386)	412 (377)	353 (340)	450 (437)	441 (415)
Homozigot ve hemizigot	9 (9)	13 (13)	17 (17)	5 (5)	5 (5)	10 (8)	7 (7)	11 (11)	30 (30)	12 (12)

Veriler varyasyonların sayısını göstermektedir. Mutasyona uğramış gen sayısı parantez içinde gösterilmiştir. AF: Alel frekansı.

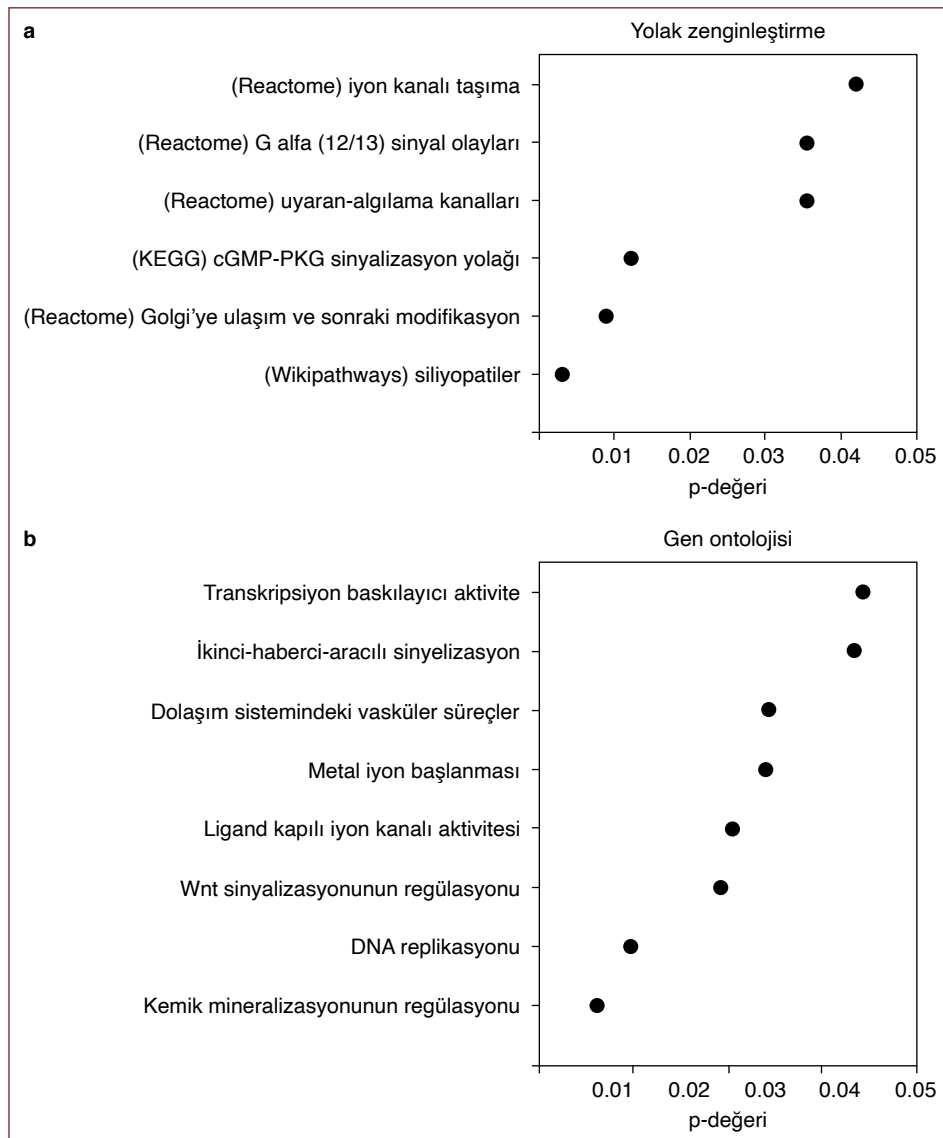
*CARMIL2, CYBB, GATA2, IFNG, IFNGR1, IFNGR2, IKBKG, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL23R, IRF8, ISG15, JAK1, NFKBIA, PDCD1, POLE2, REL, RORC, SPPL2A, STAT1, TBK21, TYK2 ve ZNFX1* gibi daha önce sağlıklı bireylerde ağır mikobakteriyel hastalıklara duyarlılıkla ilişkili olduğu gösterilen genlerdeki mutasyonlar ve enfeksiyonlara, otoinflamatuvar hastalıklara, alerji veya otoimmüniteye karşı artan duyarlılığa neden olduğu bilinen gen mutasyonları araştırıldı.<sup>[23]</sup> Ancak hastalarımızda bu tür genlerde nadir görülen herhangi bir potansiyel fonksiyon kaybı veya yanlış anlamalı mutasyon bulunamadı.

Daha sonra tarafsız bir yaklaşım izlendi ve alel frekansı %1'den küçük olan homozigot varyantlar ve alel frekansı %0,01'den küçük olan X kromozomunda hemizigot varyantlar tarandı (Tablo 2). Hastaların ebeveynlerinde tüm ekzom dizileme yapılmamış olduğu için hastalarda gerçek bileşik heterozigot (compound heterozygous) ve gerçek de novo mutasyonlar belirlenemedi. Bu yüzden bileşik heterozigot varyantlar ve de novo mutasyonlar analize dahil edilmedi. Hastalarda belirlenen

homozigot ve hemizigot varyantlar arasında gnomAD veri tabanında veya laboratuvarımızın 200'den fazla sağlıklı bireyin veya mikobakteriyel enfeksiyon dışında hastalıkları olan hastaların tüm ekzom dizileme verilerini içeren iç veri tabanında homozigot veya hemizigot taşıyıcıların bulunduğu varyantlar elendi. Bilgisayar ortamında (*in silico*) zararlı (patojenik) olduğu tahmin edilen, mutasyona uğramış ilgili genlerin MSC değerlerinden daha yüksek CADD skorlarına sahip varyantları seçildi. Sonuç olarak, hastalarda patojenik olduğu tahmin edilen, nadir görülen toplam 32 homozigot ve dört hemizigot varyantın bulunduğu 36 gen belirlendi. Daha sonra bu mutasyona uğramış 36 genin aşırı temsil (reprezentasyon) ve gen ontolojisi analizleri yapıldı. Bu genler çeşitli biyolojik süreçlerde ve moleküler işlevlerde yer almaktaydı (Şekil 1a, b). Yolak analizlerinde, mutasyona uğramış 36 gen içinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde iyon kanalı taşıma, G alfa (12/13) sinyal olayları, uyarıcı algılama kanalları, cGMP/PKG sinyalizasyon yolu, golgiye ulaşım ve sonraki modifikasyon yollarında ve siliyopatilerde



**Şekil 1:** Gen ontolojisi analizi. (a) Biyolojik süreçler (b) Moleküler fonksiyon.



**Şekil 2:** Aşırı temsil analizi. **(a)** Yolak zenginleştirme. Yolakların veri tabanı kaynakları parantez içinde belirtilmiştir. **(b)** Gen ontolojisi.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, cGMP: Cyclic guanosine monophosphate, PKG: Protein kinase G.

yer alan genlerin aşırı temsil edildiği bulundu (Şekil 2a). Ayrıca, gen ontolojisi analizlerinde mutasyona uğramış genlerin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde metal iyon bağlanması ve ligand kapılı iyon kanalı aktivitesini, Wnt sinyalizasyonunun düzenlenmesi, DNA replikasyonu ve transkripsiyon baskılayıcı aktivite, ikinci haberci aracılı sinyalizasyon ve kemik mineralizasyonunun regülasyonu gibi biyolojik süreçlerde ve dolaşım sistemindeki vasküler süreçlerde rol aldığı bulundu (Şekil 2b).

## TARTIŞMA

*M. tuberculosis*'e maruz kalan bireylerin sadece küçük bir kısmında klinik TB gelişmektedir. TB en sık akciğerleri etkilemektedir, ancak plevra, santral sinir sistemi, kas iskelet sistemi, lenf düğümleri, gastrointestinal sistem ve ürogenital sistem gibi ekstrapulmoner tutulumlar gösterebilmektedir. Neden sadece bazı insanlarda ağır TB geliştiği ve hastalar arasında farklı TB fenotipi görüldüğü tam olarak bilinmemek-

tedir. Son 20 yılda insan genetik faktörlerinin bu bireyler arası değişkenliğe önemli ölçüde katkıda bulunduğunu gösteren epidemiyolojik çalışmalar ve TB'ye yatkınlığın anlaşılmasına yönelik heyecan verici moleküler ilerlemeler yapılmıştır. Birkaç hastada IL-12/IFN- $\gamma$  ekseninde rol alan genlerde çok nadir görülen veya özel mono- veya bi-alelik mutasyonların TB'ye yatkınlığa yol açabildiği gösterilmiştir.<sup>[23,24]</sup> Ancak yine de TB patogeneğinde konak genetik faktörlerinin etkisi ve rolü tam olarak bilinmemektedir. TB'ye genetik yatkınlığı anlamak, hastalığın önlenmesi ve tedavisi için klinik öneme sahiptir. Ek olarak, yüksek TB riski taşıyan bireyleri belirlemede ve aday TB aşılarının veya ilaçlarının denemeleri için optimal kohortları tanımlamada yardımcı olacaktır. Ayrıca ailelerin genetik danışmanlığının da önünü açabilecektir. Bu çalışmada, 25 yaş öncesinde sporadik TB enfeksiyonu tanısı konulmuş, primer veya sekonder bir immün yetmezliği, başka bir enfeksiyonu veya kronik bir hastalığı olmayan, aksi halde sağlıklı olan 10 birey tüm ekzom dizileme ile genetik olarak değerlendirildi.

Hastaların genetik analizinde daha önce mikobakteriyel hastalıklara mendelyen duyarlılık ile ilişkilendirilmiş IL-12/IFN- $\gamma$  ekseninde rol alan genlerde aday bir mutasyon tespit edilmedi. Ancak sadece bu hastalarda patojenik olduğu bilgisayar ortamında tahmin edilen, homozigot veya hemizigot olup alel frekansı %1'den küçük, her biri farklı genlerde bulunan potansiyel işlev kaybı veya yanlış anlamalı toplam 36 varyasyon belirlendi. Yapılan aşırı temsil analizlerinde, mutasyona uğrayan genlerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre büyümesini, morfolojisini ve hareketini düzenleyen sinyal yollarında, küçük moleküllerin bağlanması, taşınması ve sinyalizasyonunda, DNA replikasyonu ve transkripsiyonun regülasyonunda, sert dokuların gelişimini ve vasküler sistemi düzenleyen biyolojik süreçlerde rol aldığı ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar tüberküloz hastalarında çeşitli biyolojik yolların ve moleküler fonksiyonların doğuştan gelen mutasyonlar nedeniyle farklı şekilde düzenlenebileceğini gösterebilir. Etkilenen yollar arasında, özellikle G alfa (12/13) sinyal olayları, cGMP/PKG sinyalizasyon yolağı, Wnt sinyalizasyon yolağı ve iyon ve diğer küçük moleküllerin taşınması ve sinyalizasyonunun immün hücrelerinin fonksiyonunda, enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde veya TB enfeksiyonunda rol aldığı literatürdeki birçok çalışmada gösterilmiştir.<sup>[25–33]</sup> Çalışmanın az sayıda hasta ile yapılmış olması kısıtlılık olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca çalışmada tespit edilen mutasyonların detaylı moleküler ve fonksiyonel çalışmalarla araştırılması TB'ye yatkınlık ile neden sonuç ilişkisi kurulmasını, hastalar arasında farklı organ tutulumlarının altta yatan mekanizmasının aydınlatılmasını ve mutasyon bulunan genlerin ve ilgili yolların TB patogenezindeki rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Son olarak, daha fazla hasta sayısı ile hastaların ebeveynlerinin de tüm ekzom dizilemesinin yapılacağı genetik araştırmalar homozigot ve hemizigot varyasyonlara ek olarak gerçek bileşik heterozigot ve de novo mutasyonların tespitini sağlayacak, daha güçlü istatistiksel analizlerle aşırı temsil edilen yolların ortaya çıkarılmasını ve hastalık yapıcı gen defektlerinin bulunmasını kolaylaştıracaktır.

## SONUÇ

IL-12/IFN- $\gamma$  eksenini dışındaki biyolojik yollarda yer alan genlerdeki nadir görülen zararlı mutasyonlar, en azından bazı bireylerde tüberküloz enfeksiyonlarına yatkınlığı açıklayabilir. Ayrıca, bazı olgularda oligogenik veya poligenik kalıtım ve değiştirici genler de düşünülebilir.

## Disclosures

**Ethics Committee Approval:** The study was approved by The İhsan Doğramacı Bilkent University Human Research Ethics Committee (date: 23.06.2021, number: 2021\_06\_23\_03).

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

**Etik Kurul Onayı:** Çalışma İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylandı (tarih: 23.06.2021, numara: 2021\_06\_23\_03).

**Hakem değerlendirmesi:** Dışarıdan hakemli.

**Çıkar Çatışması:** Çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışmanın herhangi bir finansal destek almadığını beyan etmişlerdir.

## KAYNAKLAR

- Gaby E, Pfyffer CBI. Mycobacteria. In: Cohen J, Opal SM. Powderly WG, editors. Infectious disease. 3<sup>rd</sup> ed. United States: Mosby; 2010. p.1777–800.
- Starke SSCaJR. Mycobacterium tuberculosis. In: Sarah S. Long CGP, Marc Fischer, editors. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 5<sup>th</sup> ed. Amsterdam: Elsevier; 2018. p.790–806.
- WHO. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>. Accessed Dec 5, 2022.
- Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: A problem with persistence. *Nat Rev Microbiol* 2003;1:97–105.
- Sandgren A, Hollo V, van der Werf MJ. Extrapulmonary tuberculosis in the European Union and European Economic Area, 2002 to 2011. *Euro Surveill* 2013;18:20431.
- Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993–2006. *Clin Infect Dis* 2009;49:1350–7.
- Zunt JR. Tuberculosis of the central nervous system. *Continuum (Minneapolis Minn)* 2018;24:1422–38.
- Orme IM, Robinson RT, Cooper AM. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nat Immunol* 2015;16:57–63.
- Chai Q, Zhang Y, Liu CH. Mycobacterium tuberculosis: An adaptable pathogen associated with multiple human diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:158.
- Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: The human model. *Annu Rev Immunol* 2002;20:581–620.
- Cherian A, Ajitha KC, Iype T, Divya KP. Neurotuberculosis: An update. *Acta Neurol Belg* 2021;121:11–21.
- Alcais A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL. Tuberculosis in children and adults: Two distinct genetic diseases. *J Exp Med* 2005;202:1617–21.
- Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Abel L, Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: Genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN- $\gamma$  immunity. *Semin Immunol* 2014;26:454–70.
- Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig S, Harris J, et al. Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* 2001;293:300–3.
- Filipe-Santos O, Bustamante J, Chappier A, Vogt G, de Beaucoudrey L, Feinberg J, et al. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: Molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol* 2006;18:347–61.
- Martínez-Barricarte R, Markle JG, Ma CS, Deenick EK, Ramírez-Alejo N, Mele F, et al. Human IFN- $\gamma$  immunity to mycobacteria is governed by both IL-12 and IL-23. *Sci Immunol* 2018;3:eaau6759.
- Picard C, Fieschi C, Altare F, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Feinberg J, et al. Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet* 2002;70:336–48.
- Remus N, Reichenbach J, Picard C, Rietschel C, Wood P, Lammas D, et al. Impaired interferon gamma-mediated immunity and susceptibility to mycobacterial infection in childhood. *Pediatr Res* 2001;50:8–13.
- Sveinbjornsson G, Gudbjartsson DF, Halldorsson BV, Kristinsson KG, Gottfredsson M, Barrett JC, et al. HLA class II sequence variants influence tuberculosis risk in populations of European ancestry. *Nat Genet* 2016;48:318–22.
- Itan Y, Shang L, Boisson B, Ciancanelli MJ, Markle JG, Martínez-Barricarte R, et al. The mutation significance cutoff: Gene-level thresholds for variant predictions. *Nat Methods*. 2016;13:109–10.

21. Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 2014;46:310–5.
22. Kamburov A, Herwig R. ConsensusPathDB 2022: Molecular interactions update as a resource for network biology. *Nucleic Acids Res* 2022;50:D587–95.
23. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol* 2022;42:1473–507.
24. Boisson-Dupuis S. The monogenic basis of human tuberculosis. *Hum Genet* 2020;139:1001–9.
25. Grimm M, Grimm M, Tischner D, Troidl K, Albarrán Juárez J, Sivaraj KK, et al. S1P2/G12/13 signaling negatively regulates macrophage activation and indirectly shapes the atheroprotective B1-Cell population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36:37–48.
26. Herroeder S, Reichardt P, Sassmann A, Zimmermann B, Jaeneke D, Hoekner J, et al. Guanine nucleotide-binding proteins of the G12 family shape immune functions by controlling CD4+ T cell adhesiveness and motility. *Immunity* 2009;30:708–20.
27. Rieken S, Sassmann A, Herroeder S, Wallenwein B, Moers A, Offermanns S, et al. G12/G13 family G proteins regulate marginal zone B cell maturation, migration, and polarization. *J Immunol* 2006;177:2985–93.
28. Partida-Sanchez S, Desai BN, Schwab A, Zierler S. Editorial: TRP channels in inflammation and immunity. *Front Immunol* 2021;12:684172.
29. Foster VS, Rash LD, King GF, Rank MM. Acid-Sensing Ion channels: Expression and function in resident and infiltrating immune cells in the central nervous system. *Front Cell Neurosci* 2021;15:738043.
30. Broderick KE, Zhang T, Rangaswami H, Zeng Y, Zhao X, Boss GR, et al. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP)/cGMP-dependent protein kinase induce interleukin-6 transcription in osteoblasts. *Mol Endocrinol* 2007;21:1148–62.
31. Brandenburg J, Brandenburg J, Reiling N. The wnt blows: On the functional role of WNT signaling in mycobacterium tuberculosis infection and beyond. *Front Immunol* 2016;7:635.
32. Mezzasoma L, Mezzasoma L, Talesa VN, Romani R, Bellezza I. ANP and BNP exert anti-inflammatory action via NPR-1/cGMP Axis by interfering with canonical, non-canonical, and alternative routes of inflammasome activation in human THP1 cells. *Int J Mol Sci* 2020;22:24.
33. Villaseñor T, Madrid-Paulino E, Maldonado-Bravo R, Urbán-Aragón A, Pérez-Martínez L, Pedraza-Alva G. Activation of the Wnt pathway by *Mycobacterium tuberculosis*: A Wnt-Wnt situation. *Front Immunol* 2017;8:50.