

BÖLÜM 7

BİRİNCİ SEÇENEK ANTI-TÜBERKÜLOZ İLAÇLARA KARŞI MOLEKÜLER DİRENÇ MEKANİZMALARI

Didem ÖZGÜR¹

GİRİŞ

Tüberküloz (TB), *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)'in neden olduğu en önemli enfeksiyöz hastalıklardan biridir. Koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) pandemisine kadar TB, tek bir enfeksiyöz ajandan kaynaklanan başlıca ölüm nedeni arasında yer almaktaydı. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2022 raporuna göre, 2021 yılında dünya çapında tahmini 10.6 milyon insanın TB basili ile enfekte olduğu ve 1.6 milyon insanın TB nedeniyle öldüğü bildirilmektedir (1).

TB tedavisinde kullanılan izoniazid (INH), rifampisin (RIF), etambutol (EMB) ve pirazinamid (PZA) birinci seçenek ilaçlardır. TB'nin yaklaşık altı aylık standart tedavi rejiminde ilk dört ay INH/RIF/EMB/PZA ve son iki ay INH/RIF birlikte uygulanmaktadır(2). Birinci basamak ilaçlara ek olarak, etionamid, enjekte edilebilir aminoglikozitler, florokinolonlar, diarilkinolinler ve nitroimidazoller dahil olmak üzere diğer antimikrobiyaller ikinci basamak ilaçlar olarak adlandırılmaktadır. İkinci basamak ilaçların, birinci basamak ilaçlara kıyasla daha düşük etkinliğe ve daha yüksek toksisiteye sahip olduğu ve bir yıldan fazla sürebilen daha uzun bir tedavi rejimi gerektirdiği kanıtlanmıştır (1-3,4). Tüm dünyada birinci seçenek anti-TB ilaçlardan olan INH ve RIF'e karşı aynı anda direncin görüldüğü Çok İlaç Dirençli (ÇİD)-TB'nin veya INH ve RIF direncine ek olarak levofloksasin veya moksifloksasin gibi florokinolona ve aynı zamanda enjekte edilebilir ikinci basamak ilaçlardan (amikasin, kapreomisin veya kanamisin) en az birine direncin görüldüğü Yaygın İlaç Dirençli (YİD)-TB'nin ortaya çıkışı TB kontrolünü büyük ölçüde tehdit etmektedir (5). Günümüzde, ÇİD-TB ve YİD-TB'nin mevcut kemoterapisinin azaltılması ve basitleştirilmesi amacıyla bedaquilin, delamanid, pretomanid, *linezolid*, klofazimin ve moksifloksasin gibi anti-TB aktiviteye sahip yeni veya yeniden tasarlanmış ilaçlara dayalı yeni rejimler faz III klinik deneme aşamasında bulunmaktadır (6).

¹ Dr. Öğ. Üyesi, Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, dido-ozgur@hotmail.com

Mikobakterilerin direnç mekanizması tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen olası mekanizmalar; ilaç direnci ile ilişkili spesifik enzimleri ve transkripsiyon faktörleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, hücre duvarı geçirgenliğindeki değişiklikler, intraselüler ve ekstraselüler ortama adaptasyonu düzenleyen iki-komponentli sistemin ve efluks pompalarının aşırı ekspresyonudur (7).

Bu bölümde, INH, PZA, RIF ve EMB dahil olmak üzere birinci seçenek ilaçlar için Mtb'de tespit edilen mutasyonlar ve polimorfizmler gibi genetik direnç mekanizmalarının açıklanması amaçlanmıştır.

İZONIAZİD (INH) DIRENCİ

INH veya izonikotinik asit hidrazid en etkili anti-TB ilaçlardan biridir ve 1952'den beri anti-TB ajan olarak kullanılmaktadır (8). INH, bir piridin halkasına bağlı bir hidrazin grubundan oluşmaktadır. INH bakterisidal ve bakteriyostatik aktiviteye sahip, standart TB rejimi tedavisinde kullanılan dar spektrumlu bir antimikrobiyal olarak kabul edilmektedir (9). İlk olarak 1951'de çığır açan bir anti-TB ajan olarak tanımlanmış ve o zamandan beri TB'ye karşı yaygın olarak kullanılmaktadır (10). Bu nedenle, tüm TB vakalarının %11'inden fazlasında INH direncinin saptanması şaşırtıcı bir durum değildir (11).

INH bir ön ilaçtır ve etkinlik gösterebilmesi için katalaz peroksidazın özellikle KatG enzimi tarafından aktive edilmesi gerekmektedir (12). KatG, INH'yi iki aşamada okside etmektedir. Birinci aşamada izonikotinil radikalinin oluşumu meydana gelmekte ve ikinci aşamada bu radikal, INH'nin aktif formu olan izonikotinamid'i oluşturmak için amonyakla reaksiyona girmektedir (13-15). INH'nin aktif formuna ek olarak, bu dönüşüm sırasında birkaç reaktif oksijen ürünleri de üretilmektedir (16). INH aktive olduğu zaman, bu koenzimin nikotinamid grubu ile kovalent bir bağ oluşturarak NADH, INH-NAD ile bir eklenti oluşturmaktadır. INH-NAD, 2-trans enoil-açıl taşıyıcı protein redüktaz (InhA)'a bağlanarak Mtb'deki mikolik asitlerin biyosentezini inhibe etmekten sorumlu olan moleküldür. Bu enzim, NADH'ye bağlı kısa dehidrogenaz/redüktaz ailesine aittir ve trans-2-enoil-ACP yağ asitlerinin indirgenmesini katalize etmektedir (17). Yağ asidi sistemi II (FAS-II)'de bir enzim olarak InhA, mikolik asitlerin öncüleri olan uzun C56 yağ asidi zincirlerinin üretimine yol açan C15-C18'in özellikle elangasyonu aşamasında yer almaktadır (17-22). InhA aktif bölgesinde INH-NAD, aktivitesini inhibe eden NADH ile rekabete girmekte ve sonuç olarak C₂₆ yağ asitlerinin birikmesine neden olmaktadır. Böylece mikobakteriyel hücre duvarının temel bileşenleri olan mikolik asitlerin üretimini durdurarak bakteri lizisine katkıda bulunmaktadır (17,19).

INH direncine neden olan mutasyonlar temel olarak katG ve InhA genlerinde tanımlanmıştır. (23). InhA ve KatG genlerinde meydana gelen mutasyonlar, delesyondan ziyade genellikle missense mutasyon şeklinde gerçekleşmektedir (24).

KatG, her monomerin 2 alana sahip olduğu homodimerik bir enzimdir. Bu alanlar, ağırlıklı olarak α -helisler tarafından oluşturulan peroksidaz ailesinden diğer proteinlere benzer bir katlanmaya sahiptir (25). Hem C-terminal hem de N-terminal alanları benzer olmasına rağmen N-terminal alanı, KatG aktif bölgesinin bir parçası olan bir heme porfirini bağlamaktadır. INH aktivasyonunda, INH'nin heme bağlama bölgesine daha yakın bağlanmasının anahtar bir rol oynadığı gösterilmiştir (26). INH direnci bakımından KatG'deki en yaygın süstitüsyonlar aktif bölgede, özellikle R104, H108 ve S315 yan zincirleri içeren INH bağlanma bölgesinde meydana gelmektedir. Ek olarak, H270 ve T275 gibi heme bağlama bölgesinde bulunan yan zincirlerde de çeşitli süstitüsyonlar tespit edilmiştir (24). Bu yan zincirlerdeki mutasyonlar, substrat afinitesini değiştirmekte veya daha düşük katalaz peroksidaz aktivitesine yol açmaktadır. Böylece, INH aktivasyonunda azalma meydana gelmektedir (25,27).

INH direncinde en yaygın mekanizmalardan biri, temel olarak promotör bölgedeki mutasyonların neden olduğu InhA geninin aşırı ekspresyonunu içermektedir (28). Alternatif olarak, InhA'nın kodlama bölgesinde missense mutasyonlara yol açan süstitüsyonlara sahip birkaç mutant da tanımlanmıştır. Şimdiye kadar biyokimyasal veya biyofiziksel olarak karakterize edilen mutant enzimlerin çoğu, NADH'nin InhA'ya ve böylece INH-NAD'ye bağlanma afinitesinde bir azalmaya neden olmakta ve enzimatik katalizi destekleyen protein aktif bölgesinde koenzim ve adüktün dönüşümünü arttırmaktadır (24).

INH dirençli Mtb suşlarında KatG'deki S315T mutasyonu, en baskın olanlardan biridir. Bu süstitüsyon, heme grubuna erişim yolunun 6Å'dan 4.7Å'ye daralmasına yol açarak INH için bağlanma afinitesini, INH aktivasyonunu ve NAD-INH adüktün oluşumunu azaltmaktadır. Ayrıca, bu süstitüsyon kısmen KatG katalaz-peroksidaz fonksiyonunu devam ettirmektedir (26, 29,30).

Diğer yandan, His108'in INH bağlanmasında yer alan bir yan zincir olduğu da bildirilmiştir. H108E ve H108Q'yu içeren iki süstitüsyon tanımlanmıştır. Bu iki mutasyon, muhtemelen INH aktivasyonunu bozarak KatG'nin INH'ye afinitesini de azaltmaktadır (25, 31). A110V mutantının INH'ye karşı dirence neden olduğu da bildirilmiştir. Valinin daha büyük yan zinciri H108 konformasyonunu değiştirerek, INH'nin bağlanmasında azalmaya neden olmaktadır (32). T275P süstitüsyonu gibi diğer mutasyonlar, hem INH'yi aktive edemeyen hemde

reaksiyonunu katalize edemeyen katlanmamış bir protein üretimi şeklinde protein kararsızlığına yol açmaktadır (24).

Son zamanlarda, INH direnci ile ilişkili KatG geninde yeni tek nükleotid polimorfizm (SNP)'leri tespit edilmiştir. Thwe ve ark.'nın yaptığı çalışmada, ilaca dirençli 65 adet Mtb izolatın ikisinde INH direncine neden olan katG geninde yeni bir SNP tespit edilmiştir. Bu mutasyon, 365 pozisyonunda (P365R) prolinin argininin yerine geçmesine neden olmaktadır (33). P365'in, KatG aktif bölgesinden 16Å'dan daha fazla uzakta olmasına rağmen, INH direncine neden olduğu varsayılmaktadır. Arginin yerine prolinin süstitüsüyonu, muhtemelen INH için daha düşük bir bağlanma afinitesine yol açan konformasyonel değişikliklere neden olmaktadır. Kandler ve ark.'nın yaptığı çalışmada, 52 INH dirençli Mtb suşunda tüm genom sekanslama (WGS) yöntemi kullanılarak KatG geninde W121Q, W161R, E402stop, A480del, L415P olmak üzere 5 yeni mutasyon saptanmıştır (34). Islam ve ark.'nın yaptığı çalışmada, KatG geninde INH direnci ile ilişkili C20R, G33V, W91stop, W91R, P92S, G111S, G125S, Q127P, D142G, L147P, S211G, G279V, A312P, H417Q, V431A, L436P, Q461P, G466R, G490S, V581G, N508D, E607A ve N660D olmak üzere yeni mutasyonlar tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde, G111S (7,9 Å), Q127P (12,5 Å), D142G (10,7 Å), G279V (10,3 Å) ve A312P (8,0 Å) mutasyonları heme grubu bağlama bölgesine yakın olduğundan dolayı, INH aktivasyonunda bir etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir. Genetik ve fonksiyonel deneylerle doğrulanmamış olmasına rağmen bu mutasyonların, INH direnç markerları olma konusunda umut vadettiği düşünülmüştür (35). WGS yöntemiyle Şangay'dan 137 ve Rusya'dan 78 ilaca dirençli Mtb izolatında INH direnci ile ilişkili KatG geninde S17G şeklinde yeni bir mutasyon tanımlanmıştır (36). KatG'nin N-terminal bölgesi, dimerizasyon için önemli olan alanlar arası etkileşimlerde yer almaktadır (25). S17G, C20R ve G33V mutasyonları, protein dimerizasyonunun kararsızlığına neden olabilir. Mtb'de dirence neden olan mutasyonların saptanmasında WGS yöntemi başarılı olmasına rağmen, bu yeni mutasyonların direnç mekanizmalarının belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (34).

KatG mutasyonlarının yanı sıra, sıklıkla INH direnci ile ilişkilendirilen diğer mutasyonlar T(-8)G/A, C(-15)T ve A(-16)G gibi InhA promotör bölgesindeki mutasyonlardır. Bu mutasyonlar, yapısal protein modifikasyonlarından ziyade InhA'nın aşırı ekspresyonuna neden olmaktadır (28,37,38). InhA mutasyonlarının araştırıldığı ve 11.000'den fazla izolatın dahil edildiği bir metaanaliz çalışmasına göre; 6.192 fenotipik dirençli izolatın yaklaşık %20,5'inde InhA promotör bölgesinde, özellikle - 15 ve - 8 mutasyonları gözlenirken, analiz edilen suşların sadece yaklaşık %1'inde inhA kodlama bölgesinde amino asit süstitüsüyonları

bulunduğu saptanmıştır (39). Kodlama bölgesinde bulunan ve klinik olarak ilgili olan bu mutasyonlar arasında K8N, I16T, I21T, I25T, I47T, A78V, S94A, S94R, I95P, L168W, A190S, I194T, R202G, E217D, T241M, D256N, I258T, I258V ve Y259H yer almaktadır (28, 39,40). InhA'yı etkileyen missense mutasyonlar, genellikle INH-NAD bağlanma bölgesine su moleküllerinin akışına neden olarak NAD-INH adüktünün ve NADH bağlanma afinitesinin azalmasına yol açmaktadır. Düşük bağlanma afinitesi nedeniyle, enzim devir hızı ve InhA aktif bölgesinde koenzim ve adüktün bağlanma süresi değişmektedir. Bu etki, bağlı olmayan InhA ve bağlı InhA arasındaki oranı artırmaktadır. INH-NAD ve NADH yenileme oranı, vahşi tip InhA'ya kıyasla mutantlarda daha yüksek olmaktadır (28,41,42). I21T, I47T, S94A ve I95P dahil olmak üzere çeşitli mutasyonlar biyokimyasal veya biyofiziksel olarak karakterize edilmiştir. Bu mutant proteinlerin çoğunda NADH için ayrışma sabiti'nin, vahşi tip enzimden çok daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. İlginç bir şekilde, in vitro koşullarda mutant I95P'nin herhangi bir aktivite göstermemiştir. Bu durum, residüel aktivitesi için FAS-II sisteminden enzimlerin, protein-protein kompleksi oluşumunun önemli olabileceğini göstermektedir (43). S94A süstitüsyonu, yapısal ve işlevsel olarak en karakterize edilen mutasyondur. Ser94 hidroksil yan zinciri, bir su molekülü aracılığıyla NADH ile dolaylı bir hidrojen bağı oluşturmaktadır. Mutasyona uğramış proteinde, alaninin apolar yan zinciri nedeniyle bu su molekülü eksiktir. Sonuç olarak, koenzimin InhA'ya afinitesi üzerinde doğrudan bir etkisi bulunmaktadır (28, 41,42). I21V ve I47T mutasyonlarını biyokimyasal veya yapısal olarak daha ayrıntılı olarak araştırıldığı çalışmalarda, vahşi tip enzime kıyasla mutant enzimlerin aktif bölgesindeki su moleküllerinde bir bozulma ve değiştirilmiş bir NADH ayrışma sabiti gözlemlenmiştir (41,42). Birkaç InhA mutantında gerçekleştirilen biyofiziksel çalışmalar benzer moleküler direnç mekanizmaları göstermiş olsa da, InhA birincil yapısının tüm uzantısını kapsayan mutasyonlar olduğu için diğerleri de mevcut olmalıdır (28, 39, 40). Ek olarak, örneğin KatG mutasyonu D142G ve EthA S266R'yi barındıran dirençli bir Mtb izolatında tanımlanan G141E süstitüsyonunun yakın zamanda tanımlanması gibi InhA geninde sürekli olarak yeni mutasyonlar ortaya çıkmıştır. Fakat henüz genetik ve fonksiyonel analizler yoluyla dirence neden olduğu kanıtlanmamıştır (35).

RİFAMPİSİN (RIF) DİRENCİ

Rifampin olarak da bilinen RIF, ansamisin antibiyotik ailesinin üyeleri olan rifamisinlerden kimyasal olarak türetilen bir antimikrobiyaldir. Rifamisin bileşikleri, RIF'in Rifamisin SV'nin bir türevidir olduğu 7 farklı molekülden oluşmaktadır. Rifamisin SV'nin kimyasal yapısı, bir 3-(4-metil-1-piperazinil)

iminometil grubunun sentetik olarak eklenmesiyle değiştirilerek, yüksek antibakteriyel aktivitesi korunurken kimyasal stabilite ve oral uygulama iyileştirilmiştir (10,44, 45).

RIF ilk olarak 1965'te sentezlenmiş ve 1970'den beri TB tedavisinde, özellikle INH ile kombine tedavide kullanılmaktadır (46). RIF'in yüksek sterilizan etkinliği sayesinde tedavi rejimine INH ve EMB ile birlikte RIF'in eklenmesi, tedavi süresinin 12 aydan 9 aya düşmesini sağlamıştır. Bu nedenle, şu anda RIF, TB'ye karşı birinci seçenek ilaç ve TB tedavisi için kullanılan standart ilaç kombinasyonunun bir parçası olarak kabul edilmektedir (10,11, 46).

RIF, DNA bağımlı – RNA polimerazına (RNAP) bağlanarak RNA sentezini inhibe etmektedir. RIF, rpoB geni tarafından kodlanan RNAP'nin β -alt birimine bağlanmakta ve RNA yapısında yer alan 5' fosfat grupları arasında sterik bir çarpışmaya neden olmaktadır. Böylece RIF, RNAP'in translokasyonu sırasında 2 veya 3 nükleotid uzunluğundaki RNA transkriptleri için RNA elangasyon yolunu inhibe etmektedir. Bu blokaj, bakteriyel transkripsiyon mekanizmasını ciddi şekilde bozmakta ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açmaktadır (45,47).

RIF direnci temel olarak RNAP'nin β alt birimini kodlayan rpoB genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. RNAP temel bir proteindir ve dizisi tüm bakterilerde son derece korunmuştur (47-49). rpoB geninin Mtb'deki 426 ile 452 ve E.coli'deki 507 ile 533 kodonları arasında kalan bölgenin mutasyonlardan daha yaygın olarak etkilendiği ve bunların sıklıkla RIF direnci ile ilişkilendirildiği kapsamlı bir şekilde bildirilmiştir. Bu bölge 81 baz çiftini içermekte ve genellikle R-direnci belirleme bölgesi (RRDR) olarak bilinmektedir. RRDR tarafından kodlanan amino asit zincirinin, RIF bağlanması için önemli olduğu ve bu bölgedeki mutasyonların RIF'in RNAP'a afinitesini etkilediği ortaya konmuştur (47,49,50). Bu nedenle, RIF dirençli suşların yaklaşık %95'inin bu bölgede, özellikle de 516, 526 ve 531 kodonlarında (Mtb'de 435, 445 ve 450) mutasyon görülmektedir (47,49,51).

Bu direnç mekanizması, en yaygın süstitüsyon olan S531L süstitüsyonları veya H526D ile örneklendirilebilir. Bu mutasyonların her ikisi de molekül içi hidrojen bağlarına müdahale etmektedir. Mutant L531'in yan zinciri, RIF bağlanma pozisyonundaki yapısal bir bozukluk nedeniyle RIF bağlanmasını bozmaktadır. D526 ise, RIF bağlanma afinitesini azaltan bir itme gücüne neden olmaktadır. RIF direncine de dahil olan, ancak daha düşük bir direnç seviyesi gösterenler dahil olmak üzere genellikle daha yüksek bir fenotipik varyasyona sahip olan diğer süstitüsyonlar H526L, H526G, H526R ve L533P'dir (50,52,53). 2020 yılında Hirani ve ark.'ının yaptığı çalışmada, bir ÇİD-TB izolatında arginin eklenmesini kodlayan 512-Arg-514 rpoB mutasyonu tanımlanmıştır

(54). İlginç bir şekilde, RRDR bölgesindeki diğer insersiyonlar da yaygın olarak rapor edilmekte ve özellikle 514-L-516, 511-P-513, 511-E-513 RIF direnciyle ilişkilendirilmektedir (55). Takawira ve ark'ının yaptıkları çalışmada, R529Q gibi RRDR içindeki süstitüsyon mutasyonları ve I572P gibi RRDR dışında henüz direnç ile ilişkili mutasyonlar olarak doğrulanmamış olmasına rağmen, dirençli suşlarda tanımlanmış olan süstitüsyon mutasyonları şeklinde 13 yeni mutasyon tespit edilmiştir (56). Güney Afrika'da 240 izolat ile yapılan bir çalışmada RRDR dışında 5 mutasyon tespit edilmiştir. Bunlardan T480A ve Q253R RIF direnci ile ilişkili bulunmuştur (57). Yakın zamanda WGS yöntemiyle yapılan bir çalışmada, rpoB'yi Q172R süstitüsyonu ile kodlayan yeni bir rpoB mutasyonu tanımlamıştır (36). Ayrıca, RIF dirençli suşların yaklaşık %5'inde rpoB geninde mutasyon görülmemektedir. Çeşitli çalışmalarda RIF direncine, mmr, mmpL7, Rv1258c, p55 ve efpA gibi bakteriyel efluks pompa sisteminde yer alan genlerin aşırı ekspresyonunun neden olabileceği öne sürülmüştür (34,58).

Fenotipik ilaç duyarlılık test (İDT)'leri RIF direncine neden olan mutasyonların saptanmasında "altın standart" yöntem olmasına rağmen, bu yöntemle tespit edilemeyen düşük seviyeli RIF direncine neden olan bazı mutasyonlar bulunmaktadır. L511P ve D516Y'yi içeren bu mutasyonlar, kötü klinik sonuçlarla ilişkili olmakla birlikte fenotipik İDT ile saptanmasını engellemektedir. Böyle durumlarda, WGS gibi genotipik İDT, bu mutasyonların tespiti için umut verici olmaktadır. Genotipik İDT, kompensatuvar mutasyonlar hakkında da önemli bilgiler sağlayabilmektedir. Bu kompensatuvar mutasyonlar, rpoB'de RRDR'nin dışında ve hatta rpoA/C gibi diğer genlerde tespit edilmiştir (59-64).

PİRAZİNAMİD (PZA) DİRENCİ

PZA, pirazin yerine piridin grubunun ikame edildiği bir nikotinamid analogudur. Bu ilaç ilk olarak 1936'da sentezlenmiş ve 1952'de TB tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir ilaç olduğu kabul edilmiştir. PZA, 1980'den itibaren TB tedavi rejiminde birinci basamak ilaç olarak kullanılmaktadır. TB tedavi rejimine PZA'nın eklenmesi ile tedavi süresi 9 aydan 6 aya düşürülmüştür (65-67).

INH'ye benzer şekilde PZA da bir ön ilaçtır ve anti-TB aktivitesini gösterebilmesi için pncA geni tarafından kodlanan nikotinamidaz veya pirazinamidaz (PZAse) tarafından pirazinoik aside (POA) dönüştürülmesi gerekmektedir (67-68). PZA/POA, büyüme durumundaki basillerden ziyade latent ve persistan durumdaki basillere daha etkilidir ve sterilizan bir özelliği bulunmaktadır (69). PZA'nın primer etki mekanizması, Mtb aktivitesinin bir sonucu olarak asidik ortamlarda bakteri hücrelerine POA akışının kolaylaştırılması, basil içinde POA birikmesine ve nihai olarak sitoplazma asidifikasyonuna yol açmasıdır (70). POA ayrıca zar

potansiyelini bozabilmekte ve zarın enerjisini kesebilmektedir (67). Ayrıca POA, ribozomal protein S1 (rpsA)'e bağlanarak trans-translasyon inhibisyonuna neden olabilmektedir (71).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, panD enziminin PZA/POA için ana hedeflerden biri olduğunu gösterilmiştir (72). PanD, doğrudan β -alanin üretimine dahil olan CoA ve pantotenat biyosentezinde yer alan bir enzimdir (67,70). POA, panD aktif bölgesine bağlanmakta ve substratı D-aspartat ile rekabet etmektedir. Mtb panD kristal yapısı, bu ligand ve proteinin etkileşimlerini ortaya çıkaran POA ile kompleks halinde çözülmüştür. Özellikle, POA'nın panD aktif bölgesinden A74, A75, R54 ile önemli hidrojen etkileşimleri gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (72).

Mtb'de PZA'ya karşı dirence neden olan mutasyonlar, ağırlıklı olarak PZase aktivitesini etkileyen pncA geninde gözlenirken, panD ve rpsA genlerinde de direnç ile ilişkili mutasyonlar tespit edilmiştir (71-74). PanD'de mutasyon olması durumunda PZA direnci, daha düşük bir POA afinitesinden ve panD aktif bölgesinde kalma süresinin azalmasından kaynaklanmalıdır. Özellikle aktif bölgeyi kaplayan iki halkanın panD kalıntılarında mutasyonlar bildirilmiştir. Bu panD halkaları, substratı solventten izole edilmiş halde tutmak için protein aktif bölgesi üzerinde bir bariyer oluşumunda yer alan 20-24 ve 119-126 kalıntıları tarafından oluşturulmaktadır. Sun ve ark. yaptığı çalışmada, H21R ve M117I'nin panD mutasyonları olarak PZA direnci ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, izotermal titrasyon kalorimetrisi ve enzimatik testler kullanılarak iki mutantın afinitesi ve aktivitesi gözlemlenmiştir. Mutantların aksine vahşi tipte, daha güçlü inhibisyon ve POA'nın daha yüksek afinitesi saptanmıştır. Ayrıca kristalografi kullanılarak, H21R ve M117I mutasyonlarının α ve β zincirlerinin C-terminal halkalarına yakın bölgeleri etkilediği de belirlenmiştir (72). Yakın zamanda Güney Çin'de yapılan bir çalışmada, klinik izolatlardan izole edilen yeni bir panD mutasyonu olan L132P'nin tanımlandığı bildirilmiştir. L132P mutasyonu, panD C-terminal halkasına yakınlığı nedeniyle önemlidir. Fakat, şu anda bu mutasyon için herhangi bir biyokimyasal veya biyofiziksel karakterizasyon çalışması bulunmamaktadır (75). PanD için klinik olarak önemli diğer mutasyonlar H21R, I49V, E130G, P134S ve V138A'dır. H21R, I49V, E130G, P134S ve V138A olmasına rağmen, bu süstitüsyonların enzim ve ligand afiniteleri üzerindeki etkisi hakkında fonksiyonel çalışmalar da bulunmamaktadır (76).

PncA geninde mutasyonlar ve polimorfizmler çok çeşitli bölgelerde görülmesine rağmen 3-17, 61-85, 132-142 arasındaki kodonlar arasında kalan üç bölgede kümelenmiştir (66, 70). Bu bölgelerde, PZase enziminin katalitik bölgeleri (Asp8, Lys96 ve Cys138) ve metal bağlama yerleri (Asp49, His51 ve His71) bulunmaktadır

(67,70). Daum ve ark.'nın 91 Mtb klinik izolatu ile yaptıkları çalışmada pncA geninde Q10H, V93M, G132R, A146P, T177P şeklinde süstitüsyon mutasyonları; promotör $\Delta(-5)$, $\Delta IV(6,7)$ (sırasıyla altı ve yedinci konumlarda izolösin ve valinin silinmesi) şeklinde delesyon mutasyonları; 4 çerçeve kayması (cgTTG), 16 çerçeve kayması (GGgT), 132 çerçeve kayması (cGGT) şeklinde çerçeve kayması insersiyonları; 122 çerçeve kayması (cggCAA) şeklinde insersiyonlar olmak üzere toplam 11 yeni mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlardan $\Delta IV(6,7)$, Q10H ve V93M'nin PZA'ya karşı dirence neden olduğu doğrulanmıştır (77). Khan ve ark.'nın moleküler dinamik simülasyonlarını kullanarak pncA geninde L19K, R140H ve E144K dahil olmak üzere üç mutasyonunu biyofiziksel olarak karakterize ettikleri çalışmada, mutant protein modelleri için süperpozisyon yoluyla elde edilen RMSD'nin vahşi tip pozisyonuna kıyasla 2Å'dan daha yüksek görüldüğünü tespit edilmiştir. Bu durum, mutasyonların protein stabilitesini bozduğunu, PZA'ya karşı aktivitesini azalttığını ve güçlü bir şekilde dirence katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (78). Li ve ark.'nın 424'ü ilaca dirençli olmak üzere toplam 465 klinik izolatu dahil ettikleri çalışmada, PZA direnciyle ilgili 30 yeni mutasyon tanımlanmıştır. Mutasyonların 24'ünün PZase aktivitesinin yer aldığı pncA gen bölgesinde, geri kalan mutasyonların diğer bölgelerdeki amino asit süstitüsyonlarında görüldüğü tespit edilmiştir (79).

ETAMBUTOL (EMB) DİRENCİ

EMB, 1960 yılında potansiyel anti-TB aktivitesi olan bir ilaç olarak tanımlanmıştır. Karbon zincirinin her bir tarafının sonuna bütanol parçalarının eklenmesiyle, merkezde bir etilendiamin molekülünden oluşan nispeten basit bir kimyasal yapıya sahiptir (10).

EMB, mikobakteriyel hücre duvarında bulunan arabinogalaktana arabinozun bağlanmasını inhibe etmekte ve bakteri hücresinin ölümüyle sonuçlanan dekaprenil-fosfat-arabinozun hücre birikimine yol açmaktadır Operon embCAB, hücre duvarı arabinan biyosentezinde yer alan arabinosiltransferazlar olan embA, embB ve embC proteinlerini kodlamaktadır (24). embA ve embB, bir heterodimerik kompleks iken, embC homodimerik bir enzimdir (80-82). EmbB, EMB direncinde rol oynayan en önemli mutasyonlara sahiptir. Glikozil donör substratı dekaprenil-fosfatarabinoz, alıcı substrat diarabinoz ve bilinen inhibitör EMB ile kompleks halindeki bu üç proteinin kriyo-EM üç boyutlu yapıları belirlenmiş ve EMB'nin embB ve embC'nin aktif bölgelerine rekabetçi bir şekilde bağlandığı doğrulanmıştır (80,83). Emb proteinlerine bir açıl taşıyıcı protein olan AcpM de eklenmiştir. EmbA-EmbB-AcpM kompleksi bir arabinoz molekülünün alıcıdan vericiye transferini katalize ederek arabinoz kalıntısı ile arabinan reseptörü

arasında 1-3 bağlantısı oluştururken, EmbC-AcpM kompleksi 1-5 bağlantısını takiben arabınan zincirinin uzatılmasında rol oynamaktadır (81,82). EMB'nin disakkarit ürün bağlanma bölgesini bloke ederek, bu reaksiyonları inhibe ettiği gösterilmiştir (84).

Ayrıca EMB, INH ile sinerjik aktiviteye sahiptir. Rv0273c geni tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörü olan EtbR'nin, InhA ekspresyonu için bir represör görevi görerek InhA ekspresyonunu negatif olarak düzenlemekten sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. EMB'nin, EtbR ile etkileşime girerek etkisini artırabildiği öne sürülmüştür. Bu da sonuçta, EMB ile birlikte uygulandığında daha da az InhA ifadesine ve dolayısıyla daha yüksek INH duyarlılığına yol açacaktır(85).

EMB direnci çoğunlukla EMB'nin hedef proteinlerini kodlayan embCAB operonundaki mutasyonları içermektedir Buna rağmen, EMB'ye dirençli suşların %30'unda embB geninde mutasyon rapor edilmemiştir (86). EmbC ve embC-embA intergenik alanındaki mutasyonların da EMB direncine neden olduğu bildirilmiştir (87). EmbC genindeki mutasyonlar, EMB'ye protein bağlanma bölgesinin yakınındaki süstitüsyonlar nedeniyle daha düşük EMB bağlanma afinitesine sahip mutant proteinlerin üretilmesine yol açabilirken, embC-embA intergenik alanındaki mutasyonlar embA ve embB genlerinin mRNA ifadesi üzerinde güçlü bir etkiye sahip olabilmektedir (81,87).

EMB dirençli izolatlarının %68'inden fazlasında embB'deki M306 kalıntısında mutasyonlar tespit edilmiştir (86,88). Ayrıca direnç noktaları olarak rapor edilen G406 ve Q497 bölgelerinde mutasyonlar, EMB dirençli suşlarda sıklıkla izole edilmektedir (89,90). EmbB'nin yapısına dayanarak, M306 doğrudan EMB bağlanmasında rol oynamaktadır ve bu kalıntıyı veya Y302 ve E327 dahil olmak üzere onunla etkileşime giren kalıntıları etkileyen mutasyonlar, protein aktif bölgesi ile EMB arasındaki etkileşimdeki farklılıklar nedeniyle EMB bağlanma afinitesini bozmaktadır. Öte yandan Q497'yi etkileyen mutasyonlar E327 ve EMB'nin etkileşimine müdahale ederek bu ilacın bağlanma afinitesini azaltabilmektedir. G406'yı etkileyen mutasyonlarda yer alan direnç mekanizmalarının sterik bir engele yol açtığı ve sonuç olarak EMB bağlanma bölgesinde konformasyonel değişikliklere neden olarak ligand afinitesini azalttığı öne sürülmektedir (81,89,91).

Son zamanda yapılan çalışmalarda embCAB operonu tarafından kodlanan proteinlerde bir dizi mutasyon bildirilmiştir. Li ve ark'nın yaptığı çalışmada, embB'de D78G süstitüsyonunu kodlayan yeni bir mutasyon tespit edilmiştir (92). Park ve arkadaşları'nın yaptığı iki farklı çalışmada S317P, Q445R ve Y319D/

H1002R süstitüsyonlarını kodlayan yeni embB mutasyonları bildirilmiştir (93,94). Sun ve ark. embA geninde, biri intergenik bölgede bulunan embA G(-5)A ve diğeri ise V18F süstitüsyonunu kodlayan iki yeni mutasyon tanımlamışlardır. embA G(-5)A ve V18F mutasyonları, EMB direncinde rol oynadığı iyi bilinen diğerk embB mutasyonlarına da sahip izolatlarda tespit edilmiştir. Ayrıca, embC geninde de D329E süstitüsyonunu kodlayan yeni bir mutasyon tespit edilmiştir (95). embA-embC'nin intergenik bölgesindeki mutasyonların embCAB operonu tarafından kodlanan proteinlerin ekspresyonunu upregüle ettiği bilinmesine rağmen, bu mutasyonların yalnızca EMB direncinde rol oynayıp oynamadığına dair bir kesin bir kanıt bulunmamaktadır (87,95).

SONUÇ

TB halen tüm dünya sağlığını tehdit eden en önemli enfeksiyöz hastalıklardan biridir. Özellikle ÇİD ve YİD-TB 'nin ortaya çıkışı, TB kontrol faaliyetlerini ciddi ölçüde engellemektedir. Günümüzde yapılan çalışmalarda, TB tedavi rejiminde kullanılan birinci seçenek ilaçların (INH, PZA, RIF ve EMB) etkinliğini azaltan yeni mutasyonlar belirlenmiştir. Dirençli suşların neden olduğu TB'nin yönetimi ve tedavisinde yaşanan zorluklar nedeniyle, Mtb'nin bu antimikrobiyallere karşı direnç mekanizmalarının belirlenmesi, raporlanması ve anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Yeni genom dizileme yöntemleri sayesinde direnç mekanizmasının tanımlanması ve anlaşılması, mutasyonel etkinin öngörülmesine olanak sağlamaktadır. Bu alanda kaydedilen tüm ilerlemelerin; anti-TB ilaçların daha kişiselleştirilmiş kullanımına, dirençli suşların yayılmasının önlenmesine, TB tedavisinde kullanılan antimikrobiyallerin daha iyi yönetilmesine ve yeni ilaçların keşfedilmesine önemli ölçüde katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

1. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report, 2022. (01/02/2023 tarihinde <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022> adresinden ulaşılmıştır).
2. Grace, AG, Mittal A, Jain S, et al. (2019). Shortened treatment regimens versus the standard regimen for drug-sensitive pulmonary tuberculosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019;12: 1-79. doi.org/10.1002/14651858.CD012918.pub2.
3. Gopal P, Dick T. Reactive dirty fragments: implications for tuberculosis drug discovery. *Curr Opin Microbiol*. 2014;21: 7-12. doi: 10.1016/j.mib.2014.06.015.
4. Wolff KA, Nguyen L. Strategies for potentiation of ethionamide and folate antagonists against Mycobacterium tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(9): 971-81. doi: 10.1586/eri.12.87.
5. Khatun UF, Amin R, Islam, M, et al. Socio-demographic profile and drug sensitivity pattern of suspected drug resistant tuberculosis among patients in Regional Tuberculosis Reference Laboratory (RTRL) of a Tertiary Hospital. *J Med*. 2017;18(2): 62-7. doi: <https://doi.org/10.3329/jom.v18i2.33680>.

6. Perrin C, Athersuch K, Elder G, et al. Recently developed drugs for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a research and development case study. *BMJ Glob Health*. 2022;7(4): e007490. doi: 10.1136/bmjgh-2021-007490.
7. Song L, Wu X. Development of efflux pump inhibitors in antituberculosis therapy. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;47(6): 421-9. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.04.007.
8. Subhash N, Sundaramurthy V. Advances in host-based screening for compounds with intracellular anti-mycobacterial activity. *Cell Microbiol*. 2021;23(7): e13337. doi: 10.1111/cmi.13337.
9. Fernandes GFDS, Salgado HRN, Santos JLD. Isoniazid: A Review of Characteristics, Properties and Analytical Methods. *Crit Rev Anal Chem*. 2017;47(4): 298-308. doi: 10.1080/10408347.2017.1281098.
10. Murray JF, Schraufnagel DE, Hopewell PC. Treatment of Tuberculosis. A Historical Perspective. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(12): 1749-59. doi: 10.1513/AnnalsATS.201509-632PS.
11. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report, 2021. (03/02/2023 tarihinde https://reliefweb.int/report/world/global-tuberculosis-report-2021?gclid=EALaIQobChMI-guSbyoi4_QIVhdXRCh2isgMCEAAAYASAAEgLI8vD_BwE adresinden ulaşılmıştır).
12. Barozi V, Musyoka TM, Sheik Amamuddy O, et al. Deciphering Isoniazid Drug Resistance Mechanisms on Dimeric *Mycobacterium tuberculosis* KatG via Post-molecular Dynamics Analyses Including Combined Dynamic Residue Network Metrics. *ACS Omega*. 2022;7(15): 13313-32. doi: 10.1021/acsomega.2c01036.
13. Bodiguel J, Nagy JM, Brown KA, et al. Oxidation of isoniazid by manganese and Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase yields a new mechanism of activation. *J Am Chem Soc*. 2001;123(16): 3832-3. doi: 10.1021/ja002674f.
14. Pierattelli R, Banci L, Eady NA, et al. Enzyme-catalyzed mechanism of isoniazid activation in class I and class III peroxidases. *J Biol Chem*. 2004;279(37): 39000-9. doi: 10.1074/jbc.M402384200.
15. Timmins GS, Master S, Rusnak F, et al. Nitric oxide generated from isoniazid activation by KatG: source of nitric oxide and activity against Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(8): 3006-9. doi: 10.1128/AAC.48.8.3006-3009.2004.
16. Peiró Cadahía J, Previtali V, Troelsen NS, et al. Prodrug strategies for targeted therapy triggered by reactive oxygen species. *Medchemcomm*. 2019;10(9): 1531-49. doi: 10.1039/c9md00169g.
17. Yan W, Zheng Y, Dou C, et al. The pathogenic mechanism of Mycobacterium tuberculosis: implication for new drug development. *Mol Biomed*. 2022;3(1): 48. doi: 10.1186/s43556-022-00106-y.
18. Marrakchi H, Lanéelle G, Quémard AK. InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology (Reading)*. 2000;146 (Pt 2): 289-96. doi: 10.1099/00221287-146-2-289.
19. Rawat R, Whitty A, Tonge PJ. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(24): 13881-6. doi: 10.1073/pnas.2235848100.
20. Massengo-Tiassé RP, Cronan JE. Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(9): 1507-17. doi: 10.1007/s00018-009-8704-7.
21. Zhu L, Bi H, Ma J, et al. The two functional enoyl-acyl carrier protein reductases of *Enterococcus faecalis* do not mediate triclosan resistance. *mBio*. 2013;4(5): e00613-13. doi: 10.1128/mBio.00613-13.
22. Vögeli B, Rosenthal RG, Stoffel GMM, et al. InhA, the enoyl-thioester reductase from *Mycobacterium tuberculosis* forms a covalent adduct during catalysis. *J Biol Chem*. 2018;293(44):17200-07. doi: 10.1074/jbc.RA118.005405.
23. Narmandakh E, Tumenbayar O, Borolzoi T, et al. Genetic Mutations Associated with Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis in Mongolia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(7): e00537-20. doi: 10.1128/AAC.00537-20.
24. Rossini NO, Dias MVB. Mutations and insights into the molecular mechanisms of resistance of Mycobacterium tuberculosis to first-line. *Genet Mol Biol*. 2023;46(1 Suppl 2): e20220261. doi:

- 10.1590/1678-4685-GMB-2022-0261.
25. Bertrand T, Eady NA, Jones JN, Jesmin, et al. Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase. *J Biol Chem.* 2004;279(37): 38991-9. doi: 10.1074/jbc.M402382200.
 26. Zhao X, Yu H, Yu S, et al. Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant. *Biochemistry.* 2006;45(13): 4131-40. doi: 10.1021/bi051967o.
 27. Carpena X, Loprasert S, Mongkolsuk S, et al. Catalase-peroxidase KatG of Burkholderia pseudomallei at 1.7Å resolution. *J Mol Biol.* 2003;327(2): 475-89. doi: 10.1016/s0022-2836(03)00122-0.
 28. Vilchèze C, Wang F, Arai M, et al. Transfer of a point mutation in Mycobacterium tuberculosis inhA resolves the target of isoniazid. *Nat Med.* 2006;12(9): 1027-9. doi: 10.1038/nm1466.
 29. Yu S, Giroto S, Lee C, et al. Reduced affinity for Isoniazid in the S315T mutant of Mycobacterium tuberculosis KatG is a key factor in antibiotic resistance. *J Biol Chem.* 2003;278(17): 14769-75. doi: 10.1074/jbc.M300326200.
 30. Ghiladi RA, Cabelli DE, Ortiz de Montellano PR. Superoxide reactivity of KatG: insights into isoniazid resistance pathways in TB. *J Am Chem Soc.* 2004;126(15): 4772-3. doi: 10.1021/ja031728t.
 31. Musser JM, Kapur V, Williams DL, et al. Characterization of the catalase-peroxidase gene (katG) and inhA locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of Mycobacterium tuberculosis by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis.* 1996;173(1):196-202. doi: 10.1093/infdis/173.1.196.
 32. Wei CJ, Lei B, Musser JM, et al. Isoniazid activation defects in recombinant Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (KatG) mutants evident in InhA inhibitor production. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(2): 670-5. doi: 10.1128/AAC.47.2.670-675.2003.
 33. Thwe EP, Namwat W, Pinlaor P, et al. Novel mutations detected from drug resistant Mycobacterium tuberculosis isolated from North East of Thailand. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021;37(11): 194. doi: 10.1007/s11274-021-03163-7.
 34. Kandler JL, Mercante AD, Dalton TL, et al. Validation of Novel Mycobacterium tuberculosis Isoniazid Resistance Mutations Not Detectable by Common Molecular Tests. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10): e00974-18. doi: 10.1128/AAC.00974-18.
 35. Islam MM, Tan Y, Hameed HMA, et al. Detection of novel mutations associated with independent resistance and cross-resistance to isoniazid and prothionamide in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(8):1041.e1-1041.e7. doi: 10.1016/j.cmi.2018.12.008.
 36. Wang L, Yang J, Chen L, et al. Whole-genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis for prediction of drug resistance. *Epidemiol Infect.* 2022;150:e22. doi: 10.1017/S095026882100279X.
 37. Musser JM, Kapur V, Williams DL, et al. Characterization of the catalase-peroxidase gene (katG) and inhA locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of Mycobacterium tuberculosis by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis.* 1996;173(1): 196-202. doi: 10.1093/infdis/173.1.196.
 38. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 1998;79(1): 3-29. doi: 10.1054/tuld.1998.0002.
 39. Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, et al. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. *PLoS One.* 2015;10(3): e0119628. doi: 10.1371/journal.pone.0119628.
 40. Vilchèze C, Jacobs WR Jr. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in Mycobacterium tuberculosis: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr.* 2014;2(4): MGM2-0014-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0014-2013.
 41. Oliveira JS, Pereira JH, Canduri F, et al. Crystallographic and pre-steady-state kinetics studies on binding of NADH to wild-type and isoniazid-resistant enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes from Mycobacterium tuberculosis. *J Mol Biol.* 2006;359(3): 646-66. doi: 10.1016/j.

jmb.2006.03.055.

42. Dias MV, Vasconcelos IB, Prado AM, et al. Crystallographic studies on the binding of isonicotinyl-NAD adduct to wild-type and isoniazid resistant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Struct Biol*. 2007;159(3):369-80. doi: 10.1016/j.jsb.2007.04.009.
43. Basso LA, Zheng R, Musser JM, et al. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. *J Infect Dis*. 1998;178(3): 769-75. doi: 10.1086/515362.
44. Brucoli F, D McHugh T. Rifamycins: do not throw the baby out with the bathwater. Is rifampicin still an effective anti-tuberculosis drug? *Future Med Chem*. 2021;13(24): 2129-31. doi: 10.4155/fmc-2021-0249.
45. Zloh M, Gupta M, Parish T, et al. Novel C-3-(N-alkyl-aryl)-aminomethyl rifamycin SV derivatives exhibit activity against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* RpoB_{SS22L} strain and display a different binding mode at the RNAP β -subunit site compared to rifampicin. *Eur J Med Chem*. 2021;225: 113734. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.
46. Grobbelaar M, Louw GE, Sampson SL, et al. Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis. *Infect Genet Evol*. 2019;74:103937. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103937.
47. Campbell EA, Korzhova N, Mustaev A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell*. 2001;104(6): 901-12. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00286-0.
48. Betts JC, Lukey PT, Robb LC, et al. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol*. 2002 Feb;43(3):717-31. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02779.x.
49. Goldstein BP. Resistance to rifampicin: a review. *J Antibiot (Tokyo)*. 2014;67(9): 625-30. doi: 10.1038/ja.2014.107.
50. Pang Y, Lu J, Wang Y, et al. Study of the rifampin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(2): 893-900. doi: 10.1128/AAC.01024-12.
51. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*. 2001;2(3):164-8. doi: 10.1186/rr54.
52. McNerney R, Kiepiela P, Bishop KS, et al. Rapid screening of *Mycobacterium tuberculosis* for susceptibility to rifampicin and streptomycin. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000 Jan;4(1): 69-75.
53. Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, et al. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7): 2531-40. doi: 10.1128/JCM.39.7.2531-2540.2001.
54. Hirani N, Joshi A, Anand S, et al. Detection of a novel mutation in the rpoB gene in a multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolate using whole genome next generation sequencing. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Sep;22:270-274. doi: 10.1016/j.jgar.2020.03.004.
55. Sinha P, Srivastava GN, Tripathi R, et al. Detection of mutations in the rpoB gene of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains inhibiting wild type probe hybridization in the MTBDR plus assay by DNA sequencing directly from clinical specimens. *BMC Microbiol*. 2020;20(1): 284. doi: 10.1186/s12866-020-01967-5.
56. Takawira FT, Mandishora RSD, Dhlamini Z, et al. Mutations in rpoB and katG genes of multidrug resistant mycobacterium tuberculosis undetectable using genotyping diagnostic methods. *Pan Afr Med J*. 2017;27:145. doi: 10.11604/pamj.2017.27.145.10883.
57. Maningi NE, Daum LT, Rodriguez JD, et al. Multi – and Extensively Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Africa: a Molecular Analysis of Historical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56(5): e01214-17. doi: 10.1128/JCM.01214-17.
58. Machado D, Coelho TS, Perdigão J, et al. Interplay between Mutations and Efflux in Drug Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol*. 2017;8: 711. doi: 10.3389/fmicb.2017.00711.
59. Ahmad S, Mokaddas E. Current status and future trends in the diagnosis and treatment of

- drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Public Health*. 2014;7(2):75-91. doi: 10.1016/j.jiph.2013.09.001.
60. Miotto P, Cabibbe AM, Borroni E, et al. Role of Disputed Mutations in the *rpoB* Gene in Interpretation of Automated Liquid MGIT Culture Results for Rifampin Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2018;56(5): e01599-17. doi: 10.1128/JCM.01599-17.
 61. Al-Mutairi NM, Ahmad S, Mokaddas E, et al. Occurrence of disputed *rpoB* mutations among *Mycobacterium tuberculosis* isolates phenotypically susceptible to rifampicin in a country with a low incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1): 3. doi: 10.1186/s12879-018-3638-z.
 62. Al-Mutairi NM, Ahmad S, Mokaddas EM. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) isolates identifies local transmission of infection in Kuwait, a country with a low incidence of TB and MDR-TB. *Eur J Med Res*. 2019;24(1): 38. doi: 10.1186/s40001-019-0397-2.
 63. Shea J, Halse TA, Kohlerschmidt D, et al. Low-Level Rifampin Resistance and *rpoB* Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*: an Analysis of Whole-Genome Sequencing and Drug Susceptibility Test Data in New York. *J Clin Microbiol*. 2021;59(4): e01885-20. doi: 10.1128/JCM.01885-20.
 64. Ma P, Luo T, Ge L, et al. Compensatory effects of *M. tuberculosis rpoB* mutations outside the rifampicin resistance-determining region. *Emerg Microbes Infect*. 2021;10(1): 743-52. doi: 10.1080/22221751.2021.1908096.
 65. Nusrath Unissa A, Hanna LE, Swaminathan S. A Note on Derivatives of Isoniazid, Rifampicin, and Pyrazinamide Showing Activity Against Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol Drug Des*. 2016;87(4): 537-50. doi: 10.1111/cbdd.12684.
 66. Nusrath Unissa A, Hanna LE. Molecular mechanisms of action, resistance, detection to the first-line anti tuberculosis drugs: Rifampicin and pyrazinamide in the post whole genome sequencing era. *Tuberculosis (Edinb)*. 2017;105: 96-107. doi: 10.1016/j.tube.2017.04.008.
 67. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003;7(1): 6-21.
 68. Njire M, Tan Y, Mugweru J, et al. Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Review and update. *Adv Med Sci*. 2016;61(1): 63-71. doi: 10.1016/j.advms.2015.09.007.
 69. Hu Y, Coates AR, Mitchison DA. Sterilising action of pyrazinamide in models of dormant and rifampicin-tolerant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10(3): 317-22.
 70. Zhang Y, Shi W, Zhang W, et al. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr*. 2014;2(4): MGM2-0023-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.
 71. Shi W, Zhang X, Jiang X, et al. Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2011;333(6049): 1630-2. doi: 10.1126/science.1208813.
 72. Sun Q, Li X, Perez LM, et al. The molecular basis of pyrazinamide activity on *Mycobacterium tuberculosis* PanD. *Nat Commun*. 2020;11(1): 339. doi: 10.1038/s41467-019-14238-3.
 73. Feuerriegel S, Köser CU, Richter E, et al. *Mycobacterium canettii* is intrinsically resistant to both pyrazinamide and pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(6):1439-40. doi: 10.1093/jac/dkt042.
 74. Özgür D, Tezcan Ülger S, Kayar MB, et al. Investigation of *pncA*, *rpsA* and *panD* gene mutations associated with resistance in pyrazinamide-resistant *mycobacterium tuberculosis* isolates and spoligotyping. *Mikrobiyol Bul*. 2022 ;56(2): 191-205. doi: 10.5578/mb.20229801.
 75. Hameed HA, Tan Y, Islam MM, et al. Detection of Novel Gene Mutations Associated with Pyrazinamide Resistance in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Southern China. *Infect Drug Resist*. 2020;13:217-227. doi: 10.2147/IDR.S230774.
 76. Zhang S, Chen J, Shi W, et al. Mutations in *panD* encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect*. 2013;2(6): e34. doi: 10.1038/emi.2013.38.
 77. Daum LT, Konstantynovska OS, Solodiankin OS, et al. Characterization of novel *Mycobacterium tuberculosis pncA* gene mutations in clinical isolates from the Ukraine. *Diagn Microbiol*

- Infect Dis.* 2019;93(4): 334-38. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.018.
78. Khan MT, Junaid M, Mao X, et al. Pyrazinamide resistance and mutations L19R, R140H, and E144K in Pyrazinamidase of Mycobacterium tuberculosis. *J Cell Biochem.* 2019;120(5): 7154-66. doi: 10.1002/jcb.27989.
 79. Li K, Yang Z, Gu J, et al. Characterization of *pncA* Mutations and Prediction of PZA Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates From Chongqing, China. *Front Microbiol.* 2021;11: 594171. doi: 10.3389/fmicb.2020.594171.
 80. Tan YZ, Rodrigues J, Keener JE, et al. Cryo-EM structure of arabinosyltransferase EmbB from *Mycobacterium smegmatis*. *Nat Commun.* 2020;11(1): 3396. doi: 10.1038/s41467-020-17202-8.
 81. Zhang L, Zhao Y, Gao Y, et al. Structures of cell wall arabinosyltransferases with the anti-tuberculosis drug ethambutol. *Science.* 2020;368(6496): 1211-19. doi: 10.1126/science.aba9102.
 82. Bendre AD, Peters PJ, Kumar J. Recent Insights into the Structure and Function of Mycobacterial Membrane Proteins Facilitated by Cryo-EM. *J Membr Biol.* 2021;254(3): 321-41. doi: 10.1007/s00232-021-00179-w.
 83. Goude R, Amin AG, Chatterjee D, et al. The arabinosyltransferase EmbC is inhibited by ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(10): 4138-46. doi: 10.1128/AAC.00162-09.
 84. Wolucka BA, McNeil MR, de Hoffmann E, et al. Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. *J Biol Chem.* 1994;269(37): 23328-35.
 85. Zhu C, Liu Y, Hu L, et al. Molecular mechanism of the synergistic activity of ethambutol and isoniazid against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 2018;293(43): 16741-50. doi: 10.1074/jbc.RA118.002693.
 86. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015;19(11): 1276-89. doi: 10.5588/ijtld.15.0389.
 87. Cui Z, Li Y, Cheng S, et al. Mutations in the embC-embA intergenic region contribute to *Mycobacterium tuberculosis* resistance to ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(11): 6837-43. doi: 10.1128/AAC.03285-14.
 88. Safi H, Sayers B, Hazbón MH, et al. Transfer of embB codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(6): 2027-34. doi: 10.1128/AAC.01486-07.
 89. Plinke C, Cox HS, Zarkua N, et al. embCAB sequence variation among ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates without embB306 mutation. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(7): 1359-67. doi: 10.1093/jac/dkq120.
 90. Dai E, Zhang H, Zhou X, et al. MycoResistance: a curated resource of drug resistance molecules in *Mycobacteria*. *Database (Oxford).* 2019;2019: baz074. doi: 10.1093/database/baz074.
 91. Plinke C, Cox HS, Kalon S, et al. Tuberculosis ethambutol resistance: concordance between phenotypic and genotypic test results. *Tuberculosis (Edinb).* 2009;89(6): 448-52. doi: 10.1016/j.tube.2009.09.001.
 92. Li D, Song Y, Zhang CL, et al. Screening mutations in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Yunnan, China. *J Infect Public Health.* 2017;10(5): 630-36. doi: 10.1016/j.jiph.2017.04.008.
 93. Park J, Jang W, Kim M, et al. Molecular drug resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens using ion semiconductor sequencing. *J Microbiol Methods.* 2018;145: 1-6. doi: 10.1016/j.mimet.2017.12.003.
 94. Park J, Shin SY, Kim K, et al. Determining Genotypic Drug Resistance by Ion Semiconductor Sequencing With the Ion AmpliSeq™ TB Panel in Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Ann Lab Med.* 2018;38(4): 316-23. doi: 10.3343/alm.2018.38.4.316.
 95. Sun Q, Xiao TY, Liu HC, et al. Mutations within *embCAB* Are Associated with Variable Level of Ethambutol Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;62(1): e01279-17. doi: 10.1128/AAC.01279-17.