

# **AUTOREFERAT**

**Anna Żaczek**

Wydział Medyczny, Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów 2019

**1. IMIĘ I NAZWISKO:**

**Anna Żaczek**

**2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE** – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**Doktor nauk biologicznych, dyscyplina mikrobiologia, specjalność genetyka bakterii**

Stopień nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w 2009 r.

Tytuł rozprawy doktorskiej:

„Molekularna charakterystyka szczepów *Mycobacterium tuberculosis* opornych na podstawowe tuberkulostatyki”.

Promotorem przewodu doktorskiego był prof. dr hab. Jarosław Dziadek z Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi, recenzentami byli: prof. dr hab. Adam Jaworski oraz prof. dr hab. Józef Kur.

**Magister biologii, specjalność biologia molekularna**

Tytuł uzyskany na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w 1997 r.

Tytuł pracy magisterskiej:

„Badanie wpływu bezpośredniego oddziaływania komórka-komórka na aktywność ruchową komórek melanoma B16”.

Praca powstała pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Madeji, recenzentami byli: prof. dr hab. Władysław Korohoda oraz prof. dr hab. Andrzej Klein.

**Inżynier rolnictwa**

Tytuł uzyskany na Wydziale Rolniczym Akademii Rolniczej (obecnie Uniwersytet Rolniczy) w Krakowie w 1996 r.

- Podyplomowe studia dla pracowników jednostek naukowych „Public Relation w badaniach naukowych”, Wyższa Szkoła Ekonomii i Innowacji w Lublinie, 2010 r.
- Studium Pedagogiczne ukończone uzyskaniem kwalifikacji pedagogicznych do pracy nauczyciela, Uniwersytet Jagielloński, Kraków 1997 r.

### **3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

**2019 – obecnie** Adiunkt w Pracowni Mikrobiologii, Instytut Pielęgniarstwa i Nauk o Zdrowiu, Wydział Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego.

**2012 – 2018** Adiunkt w Katedrze Biochemii i Biologii Komórki na Wydziale Biologiczno-Rolniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego.

**2009 – 2012** Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii i Genetyki Drobnoustrojów na Zamiejscowym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego.

**2005 – 2009** Asystent w Katedrze Genetyki na Zamiejscowym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Rzeszowskiego.

**2001 – 2005** Asystent w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego.

**1998 – 2001** Asystent w Katedrze Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Rzeszowie.

**4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA\*** wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

#### **4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO**

**Zastosowanie metod molekularnych w typowaniu bakteryjnych patogenów ludzi, zwierząt oraz roślin.**

#### **4.2. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO**

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl ośmiu oryginalnych publikacji naukowych, których sumaryczny IF (wg roku opublikowania) jest równy 13,796, natomiast liczba punktów MNiSW wynosi 190. Oświadczenia współautorów o udziale własnym w przygotowaniu wymienionych prac stanowiących osiągnięcie naukowe zostały przedstawione w Załączniku nr 4.

1. **Żaczek A**, Brzostek A, Wojtasik A, Dziadek J, Sajduda A. 2013 Genotyping of clinical Mycobacterium tuberculosis isolates based on IS6110 and MIRU-VNTR polymorphisms. *Biomed Res Int.* 2013;2013:865197. doi: 10.1155/2013/865197. Epub 2013 Dec 17.

IF<sub>2013</sub> – brak                      5-letni IF<sub>2013</sub> – brak                      MNiSW<sub>2013</sub> – brak

Czasopismo *Biomed Res Int.* jest wydawane od 2013 r. Do 2013 r. było wydawane jako *Journal of Biomedicine and Biotechnology (J BiomedBiotechnol)*. Ze względu na zmianę tytułu czasopismo *Biomed Res Int* w 2013 r. nie posiada IF i punktacji MNiSW. Punktacja dla *J Biomed Biotechnol* w 2013 r. przedstawia się następująco:  
IF<sub>2013</sub> – 2,706                      5-letni IF<sub>2013</sub> – 2,750                      MNiSW<sub>2013</sub> – 30

*Indywidualny wkład – 75%: udział w wypracowaniu koncepcji badań, wykonanie większości eksperymentalnej części pracy, przygotowanie tabeli, analiza wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu.*

2. **Żaczek A**, Ziółkiewicz M, Wojtasik A, Dziadek J, Sajduda A. 2013 IS6110-based differentiation of Mycobacterium tuberculosis strains. *Pol J Microbiol.* 2013;62(2):201-4.

IF<sub>2013</sub> – 0,871                      5-letni IF<sub>2013</sub> – 1,059                      MNiSW<sub>2013</sub> – 15

*Indywidualny wkład – 75%: wypracowanie koncepcji badań, wykonanie większości eksperymentalnej części pracy dotyczącej genotypowania szczepów, skonstruowanie wektora zawierającego sklonowane fragmenty wzoru FLAP do sekwencjonowania, analiza wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu.*

3. **Żaczek A**, Brzostek A, Górna A, Sajduda A, Wojtasik A, Dziadek J. 2013 Application of FLiP method for differentiation of Mycobacterium tuberculosis strains in

comparison to commonly used methods, spoligotyping and MIRU-VNTR typing. *Pol J Microbiol.* 2013;62(1):73-6.

IF<sub>2013</sub> – 0,871                      5-letni IF<sub>2013</sub> – 1,059                      MNiSW<sub>2013</sub> – 15

**Indywidualny wkład – 75%:** wypracowanie koncepcji badań, wykonanie większości eksperymentalnej części pracy, opracowanie ryciny, udział w analizie wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu.

4. **Żaczek A**, Brzostek A, Kuroń A, Wojtasik A, Sajduda A, Dziadek J. 2014 Development of a new ligation-mediated PCR method for the differentiation of Mycobacterium tuberculosis strains. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014 Mar;18(3):302-9. doi:10.5588/ijtld.13.0538.

IF<sub>2014</sub> – 2,315                      5-letni IF<sub>2014</sub> – 2,245                      MNiSW<sub>2014</sub> – 25

**Indywidualny wkład – 70%:** udział w wypracowaniu koncepcji badań, opracowanie i optymalizacja warunków metody FLAP, wykonanie większości eksperymentalnej części pracy, przygotowanie tabeli i rycin 1 i 4, analiza wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu.

5. **Żaczek A**, Brzostek A, Wojtasik A, Sajduda A, Dziadek J. 2014 Comparison of ligation-mediated PCR methods in differentiation of Mycobacterium tuberculosis strains. *Biomed Res Int.* 2014;2014:782071. doi: 10.1155/2014/782071. Epub 2014 Feb16.

IF<sub>2014</sub> – 1,579                      5-letni IF<sub>2014</sub> – 1,593                      MNiSW<sub>2014</sub> – brak

Czasopismo *Biomed Res Int.* jest wydawane od 2013 r. Do 2013 r. było wydawane jako *Journal of Biomedicine and Biotechnology (J BiomedBiotechnol)*. Ze względu na zmianę tytułu czasopismo *Biomed Res Int* w 2014 r. po roku istnienia, posiada IF, natomiast nie ma punktacji MNiSW. Punktacja dla *J Biomed Biotechnol* w 2014 r. przedstawia się następująco:

IF<sub>2014</sub> – 3,169                      5-letni IF<sub>2014</sub> – 3,132                      MNiSW<sub>2014</sub> – 30

**Indywidualny wkład – 75%:** udział w wypracowaniu koncepcji badań, wykonanie wszystkich eksperymentów dotyczących zastosowania metody FLiP i FLAP dla badanej kolekcji, opracowanie tabeli, analiza wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu.

6. **Żaczek A**, Szwaja I, Skiba M, Brzostek A, Puchalski C, Lewandowska K, Dziadek J. 2015 Epidemiological Analysis of Mycobacterium tuberculosis Strains Isolated from Patients of Small Communities Living in the South-East of Poland. *Pol J Microbiol.* 2015;64(3):289-93.

IF<sub>2015</sub> – 0,750                      5-letni IF<sub>2015</sub> – 0,993                      MNiSW<sub>2015</sub> – 15

**Indywidualny wkład – 70%:** udział w wypracowaniu koncepcji badań, wykonanie eksperymentalnej części pracy dotyczącej zastosowania metody FLiP i FLAP dla badanych szczepów, analiza wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu.

7. **Żaczek A**, Wojtasik A, Izdebski R, Gorecka E, Wojcik EA, Nowak T, Kwiecinski P, Dziadek J. 2015 PCR melting profile as a tool for outbreak studies of Salmonella enterica in chickens. *BMC Vet Res*. 2015 Jun 23;11:137. doi: 10.1186/s12917-015-0451-4.

IF<sub>2015</sub> – 1,6435-letni IF<sub>2015</sub> – 1,975MNiSW<sub>2015</sub> – 35

*Indywidualny wkład – 60%: udział w wypracowaniu koncepcji badań, optymalizacja warunków metod stosowanych w pracy (MP-PCR i PFGE), wykonanie całości części eksperymentalnej pracy dotyczącej zastosowania obu metod dla badanej kolekcji, udział w analizie wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu.*

8. **Żaczek A**, Struś K, Sokołowska A, Parniewski P, Wojtasik A, Dziadek J. 2019 Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using PCR melting profile and variable number of tandem repeat methods. *Lett Appl Microbiol*. 2019, Jan 68(1):24-30, doi: 10.1111/lam.13081. Epub 2018 Nov 13.

IF<sub>2017</sub> – 1,4715-letni IF<sub>2017</sub> – 1,848MNiSW<sub>2017</sub> – 25

*Indywidualny wkład – 75%: udział w wypracowaniu koncepcji badań, opracowanie i optymalizacja warunków metod stosowanych w pracy (PCR, MP-PCR i VNTR), wykonanie większości eksperymentalnej części pracy, przygotowanie wszystkich tabel, analiza wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu.*

### 4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

#### Wprowadzenie.

Badania epidemiologiczne na poziomie molekularnym pozwalają na zdefiniowanie źródła zakażenia oraz monitorowanie rozprzestrzeniania się patogennych szczepów w środowisku. Z tego względu poszukiwane są metody umożliwiające identyfikację czynnika zakaźnego na poziomie gatunku, a także szczepu.

Metody molekularne, oparte o analizę materiału genetycznego, który dla każdego organizmu jest charakterystyczny i względnie stały, pozwalają na wykrywanie wewnątrzgatunkowego polimorfizmu organizacji i struktury genomowego DNA, którego źródłem są rekombinacje genetyczne i spontaniczne mutacje. Typowanie genetyczne pozwala na ustalenie indywidualnych wzorów molekularnych dla poszczególnych szczepów, co umożliwia określanie pokrewieństwa między nimi. Potencjał różnicujący poszczególnych metod zależy od rodzaju polimorfizmu, który wykrywają.

W przypadku mykobakterii, przez szereg lat z powodu braku odpowiednich technik badawczych, wiedza o epidemiologii gruźlicy była ograniczona, a śledzenie dróg transmisji w środowisku człowieka prawie niemożliwe. Różnicowanie mykobakterii oparte o właściwości fenotypowe, takie jak wrażliwość na leki i wrażliwość na mykobakteriofagi, miało sporo ograniczeń ze względu na wysoką zmienność fenotypową prątków (Jagielski 2016). Stosowanie rutynowych testów mikrobiologicznych i metod serologicznych także jest ograniczone ze względu na biochemiczną homogenność prątków wchodzących w skład kompleksu *M. tuberculosis*. Co więcej, nawet molekularne metody, wprowadzone do epidemiologii gruźlicy w latach 80-tych XX wieku, okazały się mocno ograniczone ze względu na niski poziom zmienności genetycznej prątków (Frothingham 1994), wynikający z ich specyfiki wzrostu (powolny wzrost, izolowana nisza życiowa, zdolność do przechodzenia w stan latencji (Mathema 2006). Także, oparte o analizę sekwencji operonu rRNA, rybotypowanie, choć powszechnie stosowane u wielu bakterii, u mykobakterii nie znalazło zastosowania ze względu na pojedynczą kopię tego operonu u prątków gruźlicy (van Embden 2000). Dopiero zidentyfikowanie w genomie prątków sekwencji powtarzających przyczyniło się do rozwoju metod różnicowania prątków w obrębie gatunku (Cowan 2005) i prawdziwego postępu w epidemiologii choroby przez nie

wywoływanej. Sekwencje te to powtórzenia tandemowe - TR (Tandem Repeats) oraz powtórzenia rozproszone – IR (Interspersed Repeats), w tym sekwencje insercyjne - IS (Insertion Sequence), które zdolne są do przemieszczania się w obrębie genomu.

Elementy powtórzone różnią się pod względem złożoności struktury, wielkości i lokalizacji w genomie. Mechanizm warunkujący zróżnicowanie filogenetyczne genomów mykobakterii związany jest przede wszystkim z rearanżacjami w obrębie chromosomu zachodzącymi na drodze rekombinacji, w której biorą udział sekwencje powtórzone w genomie prątków. Sekwencje te stanowią więc istotne źródło zmienności genetycznej tych bakterii. Stopień wykrytej zmienności powinien być na tyle wysoki aby wzory szczepów nie powiązanych epidemiologicznie były unikalne, a jednocześnie na tyle stabilny, aby szczepy izolowane od osób z jednego źródła były jednakowe.

Najlepiej poznaną sekwencją insercyjną występującą w obrębie kompleksu *M. tuberculosis* jest sekwencja insercyjna IS6110. Opisana została w dwóch niezależnych ośrodkach, w Stanach Zjednoczonych i Francji w 1990 i zaproponowana jako specyficzny marker molekularny w epidemiologii gruźlicy (Thierry 1990). Sekwencja IS6110 występuje w genomie wszystkich gatunków wchodzących w skład kompleksu *M. tuberculosis* w różnej liczbie kopii (0-25, u większości szczepów izolowanych w Europie w liczbie kilkunastu) i zlokalizowana jest w różnych miejscach genomu. IS6110 ma wielkość 1355 pz, na obu jej końcach znajdują się krótkie liczące 28 pz terminalne odwrócone powtórzenia. Region leżący między nimi zawiera nakładające się ramki odczytu kodujące enzym transpozazę, odpowiedzialny za transpozycję sekwencji insercyjnej. Sekwencja IS6110 należy zatem do ruchomych elementów genetycznych z rodziny IS3. Transpozycji IS6110 zwykle towarzyszy duplikacja 3-4 nukleotydowej sekwencji docelowej. Różnice pomiędzy elementami insercyjnymi różnych szczepów ograniczają się jedynie do kilku nukleotydów przy jednoczesnej zmiennej liczbie powtórzeń w zależności od gatunku i / lub szczepu prątków gruźlicy. Analiza liczby kopii tej sekwencji oraz ich lokalizacji w genomach badanych szczepów *M. tuberculosis* jest bardzo użyteczna w badaniach epidemiologicznych gruźlicy.

Zasada typowania genetycznego szczepów *M. tuberculosis* z wykorzystaniem sekwencji IS6110 jako specyficznego markera molekularnego polega na użyciu tej sekwencji jako sondy w analizie RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism). Metoda IS6110-RFLP, oparta na analizie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych chromosomalnego DNA, zawierających sekwencję insercyjną IS6110,



polega na trawieniu restrykcyjnym chromosomalnego DNA i rozdzieleniu powstałych fragmentów w żelu agarozowym, a następnie przeniesieniu ich na membranę nylonową i poddaniu hybrydyzacji z użyciem znakowanej sondy będącej wewnętrznym fragmentem sekwencji IS6110. Uzyskane wzory hybrydyzacyjne są szczepowo-specyficzne pod warunkiem obecności w genomie prątków 5 lub większej liczby kopii IS6110. Zastosowanie enzymu restrykcyjnego PvuII, który jednokrotnie przecina sekwencję IS6110, a także przecina DNA otaczającą IS6110 w różnej odległości od niej, generuje dostateczną liczbę fragmentów DNA dających charakterystyczny wzór prążkowy. Metoda ta została uznana za międzynarodowy standard, a ujednoliconą w 1993 roku procedurą wykonania analizy ułatwia porównywanie profili pomiędzy różnymi laboratoriami (van Embden 1993).

W genomie prątków zidentyfikowano także krótkie sekwencje repetytywne – DR (Direct Repeats), które są wykorzystywane do badania polimorfizmu prątków z małą liczbą kopii sekwencji IS6110. Jedną z najbardziej popularnych metod genotypowania prątków opierającą się o DR, jest technika „spoligotyping” (spacer oligonucleotide typing). Metoda ta opiera się na amplifikacji chromosomalnego DNA prątków zawierających zmienną liczbę prostych DR o długości 36 pz każda, między którymi występują krótkie unikalne sekwencje rozdzielające o długości 35-41 pz (spacer). Na skutek homologicznej rekombinacji pomiędzy sąsiadującymi lub oddalonymi sekwencjami DR oraz transpozycji IS6110, która jest obecna w tym regionie u prawie wszystkich szczepów *M. tuberculosis*, niektóre sekwencje rozdzielające mogą ulec delecji. Kryterium różnicowania prątków w tej metodzie jest obecność albo brak w regionie DR sekwencji rozdzielającej. W metodzie „spoligotyping” powielaniu ulega cały region DR, przy użyciu starterów komplementarnych do krótkich sekwencji DR. Uzyskane i wyznakowane produkty amplifikacji hybrydują się do membrany, na której znajdują się związane kowalencyjnie 43 syntetyczne oligonukleotydy rozdzielające. Sygnały wykrywa się na drodze chemiluminescencji. Wyniki przedstawia się w formacie binarnym (obecność lub brak sekwencji rozdzielającej), co ułatwia katalogowanie i porównywanie wyników (baza SpolDB4) (Demay 2012).

Coraz częściej w dochodzeniach epidemiologicznych prątków stosuje się metodę polegającą na analizie zmiennej liczby powtórzeń tandemowych mykobakteryjnych rozproszonych sekwencji powtarzających się - MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats). Metodę opracowano dzięki

poznaniu sekwencji genomów kilku gatunków bakterii z kompleksu *M. tuberculosis*. Sekwencje mają długość 40-100 pz i zlokalizowane są w różnych regionach genomu, a w pojedynczym *locus* powtórzone są 2 do kilkunastu razy. Spośród 41 zidentyfikowanych *loci* zawierających powtórzenia MIRU w typowaniu genetycznym stosuje się obecnie 24 najbardziej polimorficzne (hypervariable). Metoda MIRU-VNTR polega na amplifikacji specyficznego *locus* z odpowiednimi starterami komplementarnymi do sekwencji flankujących dany region MIRU, a następnie na rozdziale produktów amplifikacji w żelu i analizie ich wielkości. Wielkość produktu zależy od liczby powtórzeń motywu podstawowego. Liczba powtórzeń sekwencji MIRU w każdym *locus* daje ostateczny kod numeryczny (Supply 2006).

Powyższe metody, choć powszechnie stosowane w dochodzeniach epidemiologicznych gruźlicy, mają swoje ograniczenia wynikające z pracochłonności, kosztów, koniecznej wstępnej hodowli prątków lub niewystarczającej siły różnicującej. Dlatego też, koniecznym jest poszukiwanie metod alternatywnych, które pozwoliłyby na szybkie, tanie, i głębokie różnicowanie prątków.

**Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

*Głównym celem naukowym przedłożonych do oceny prac była weryfikacja użyteczności, charakterystyka i ocena zastosowania metod molekularnych w badaniach epidemiologicznych bakterii.*

W przedłożonej jako osiągnięcie pracy (**publikacja nr 1**) wykorzystano metodę opartą o amplifikację kwasów nukleinowych *in vitro* - FLiP (Fast Ligation mediated PCR) dla zbadania dużej kolekcji 155 szczepów *M. tuberculosis* pozyskanych od pacjentów ze zdiagnozowaną gruźlicą w Centrum Leczenia Chorób Płuc i Rehabilitacji w Łodzi w latach 2005 – 2008. Metoda ta, zaproponowana przez Reisig i wsp., należy do metod LM-PCR (Ligated-Mediated PCR) opartych o ligację adaptorów oligonukleotydowych i wykorzystuje występowanie w genomie prątków kompleksu *M. tuberculosis* sekwencji IS6110 (Reisig, 2005).

W metodach LM-PCR, zaproponowanych po raz pierwszy przez Masny i Płucienniczak (Masny, Płucienniczak, 2003), do fragmentów DNA uzyskiwanych poprzez trawienie genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi, ligowane są odpowiednie adaptory, składające się z oligonukleotydów pomocniczego i ligowanego. Dzięki temu, że ich sekwencja jest znana i są dopasowane do powstałych po trawieniu restrykcyjnym końców DNA, nie potrzebna jest znajomość sekwencji genomowego DNA badanego mikroorganizmu. Oligonukleotyd pomocniczy umożliwia ligację adaptorów do fragmentów restrykcyjnych, ligacji właściwej ulega tylko oligonukleotyd ligowany, który później jest częścią matrycy w reakcji PCR. Pierwszym etapem PCR jest oddysocjowanie adaptorów pomocniczych, a następnie wypełnienie wolnych końców 3' przy udziale polimerazy DNA. W wyniku reakcji amplifikacji *in vitro* otrzymywane są fragmenty DNA o różnej długości, które po elektroforezie tworzą wzór prążków, co pozwala zróżnicować genetycznie mikroorganizmy (Krawczyk, 2006).

Metoda FLiP oparta jest na trawieniu restrykcyjnym genomowego DNA restryktazą HhaI, a następnie na ligacji otrzymanych fragmentów z adaptorem składającym się z dwóch oligonukleotydów, z których jeden jest komplementarny do końca pozostawionego przez enzym restrykcyjny, a drugi zawiera nukleotyd uracylowy zamiast tyminowego. Specyfikę kolejnego etapu, amplifikację DNA *in vitro*, zapewnia selektywne usunięcie oligonukleotydu zawierającego uracyl przez glikozylazę uracylu – UDG. W reakcji amplifikacji używana jest para starterów, z której jeden jest specyficzny dla sekwencji IS6110, a drugi jest komplementarny do oligonukleotydu zligowanego z fragmentami restrykcyjnymi genomowego DNA. Amplifikacji ulegają tylko regiony chromosomalnego DNA zawierające koniec 3' sekwencji insercyjnej. Produkty PCR analizowane są elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym, a otrzymane wzory prążkowe są charakterystyczne dla danego szczepu.

Metoda FLiP, pomimo wykazanego potencjału różnicującego (Kremer 2005), w przedłożonej do oceny pracy była wykorzystana w badaniach epidemiologicznych gruźlicy po raz pierwszy. Użyteczność i możliwość wykorzystania tej metody do analiz epidemiologicznych postanowiono sprawdzić w odniesieniu do powszechnie stosowanych metod - metody MIRU-VNTR opartej o 15 loci oraz metody referencyjnej – IS6110-RFLP. Otrzymano wysoce zróżnicowane wzory prążkowe, o średniej liczbie 6 prążków dla większości szczepów (130, 84%) i wielkości od 100 do 1000 pz. Powtarzalność metody wykazano w niezależnych 3-krotnie powtórzonych analizach dla 16 wybranych losowo

izolatów. Kontrolę pozytywną wszystkich eksperymentów stanowił szczep H<sub>37</sub>Rv. Podobieństwo wzorów określono metodą średnich połączeń – UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages) z wykorzystaniem współczynnika podobieństwa Dice i oprogramowania BioNumeric 5.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Klaster stanowiła grupa co najmniej dwóch izolatów wykazujących identyczne wzory prążkowe. Dla określenia siły różnicującej metody wykorzystano powszechnie stosowany w takich badaniach wskaźnik HGDI (Hunter–Gaston Discriminatory Index) (Hunter, Gaston 1998).

Zastosowana w badaniach metoda FLiP ujawniła wysoki poziom polimorfizmu badanej kolekcji. Metoda pozwoliła na zidentyfikowanie 119 wzorów prążkowych dla 155 analizowanych szczepów, z czego 101 szczepów (65%) wykazało wzory unikatowe, pozostałe 54 (35%) szczepy połączono w 18 klastrów zawierających od 2 do 12. Siła różnicująca metody FLiP dla analizowanej kolekcji wyrażona współczynnikiem HGDI wyniosła 0,991 i okazała się nieco wyższa w porównaniu do siły różnicującej metody MIRU-VNTR zastosowanej wcześniej dla tej samej kolekcji szczepów (HGDI 0,990; 108 różnych profili) (Krawczyk 2011).

Jednoczesne zastosowanie obu metod, FLiP (bazującej na obecności IS6110 w genomie prątków) i MIRU-VNTR (opartej o polimorfizm w różnych regionach genomu), różnicowało kolekcję na poziomie porównywalnym do metody referencyjnej – IS6110-RFLP. Tylko 7% (3/42) szczepów zgrupowanych obiema metodami było dodatkowo zróżnicowane metodą referencyjną. Metoda IS6110-RFLP jest jednak pracochłonna, kosztowna i wymaga dużej ilości chromosomalnego DNA (ok. 2 µg), co wiąże się z koniecznością kilkutygodniowej hodowli prątków. W przedstawionych badaniach wykazano, że metoda FLiP wydaje się wartościową metodą dla weryfikacji analiz MIRU-VNTR i użyteczną we wstępnych badaniach epidemiologicznych gruźlicy.

Następnie przeprowadzono weryfikacje skuteczności metody FLiP w różnicowaniu prątków gruźlicy na kolekcji 62 szczepów porównując uzyskane wyniki do badań tej samej kolekcji szczepów przeprowadzonych w oparciu o metodę IS6110-RFLP (**publikacja nr 2**). Metoda FLiP pozwoliła na zidentyfikowanie 35 różnych wzorów FLiP dla 62 szczepów, z których 21 było unikatowych, natomiast pozostałe 41 szczepów (66%) zgrupowano w 14 klastry zawierające od 2 do 9 szczepów. Metoda IS6110-RFLP natomiast wyróżniła 36 wzorów wśród badanej kolekcji. Siła różnicująca obu metod wyrażona współczynnikiem HGDI okazała się porównywalna, nieznacznie wyższa dla

metody referencyjnej (0,966 vs 0,971). W przedłożonych badaniach wykazano specyficzność metody FLiP i jej potencjalne zastosowanie w mapowaniu IS6110. W tym celu produkty amplifikacji reakcji FLiP dla jednego szczepu reprezentującego największy klastro sklonowano w wektorze pJET, a następnie zsekwencjonowano. Porównanie otrzymanych sekwencji z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank wykazało, że zawierają one 3' koniec sekwencji IS6110, kodujący gen transpozazy, oraz specyficzną dla *M. tuberculosis* sekwencję nukleotydową. W badaniach potwierdzono powtarzalność i specyficzność metody, wykazano jej potencjał różnicujący porównywalny z metodą referencyjną dowodząc użyteczności metody FLiP w różnicowaniu szczepów *M. tuberculosis*.

Przydatność metody FLiP do różnicowania prątków analizowano również w połączeniu z równie szybką i powszechnie stosowaną metodą, lecz charakteryzującą się ograniczonym potencjałem różnicującym - „spoligotyping” (**publikacja nr 3**). Obie te metody zastosowano dla kolekcji 25 szczepów i porównano z metodą MIRU-VNTR. Metoda „spoligotyping” zróżnicowała badaną kolekcję jedynie na 3 grupy szczepów o identycznych wzorach, zawierające odpowiednio po 8, 12 i 5 izolatów. Metoda MIRU-VNTR oparta o 15 *loci* podzieliła kolekcję na 8 klastro. Natomiast zastosowanie metody FLiP pozwoliło na zidentyfikowanie 12 różnych wzorów FLiP, dla 5 szczepów były one unikatowe, pozostałe zgrupowano w 7 klastrach zawierających od 2 do 6 izolatów. Potencjał różnicujący wyrażony współczynnikiem HGDI wyniósł 0,653; 0,837 i 0,917 odpowiednio dla „spoligotyping”, MIRU-VNTR i FLiP. Metoda FLiP wykazała najwyższy potencjał różnicujący dla badanej kolekcji. Natomiast zastosowanie jednocześnie metod „spoligotyping” i MIRU-VNTR dla badanej kolekcji zwiększyło potencjał różnicujący do HGDI 0,930. Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowano wprowadzenie metody FLiP jako uzupełniającej w molekularnej epidemiologii prątków gruźlicy.

Podjęto także prace zmierzające do zaproponowania nowej metody pozwalającej na szybkie różnicowanie szczepów *M. tuberculosis* (**publikacja nr 4**). W tym celu opracowano metodę opartą o ligację adaptorów oligonukleotydowych i zaproponowano jej nazwę - FLAP (Fast Ligation Amplification Polymorphism). Metoda oparta jest o polimorfizm IS6110 i polega na trawieniu restrykcyjnym genomowego DNA prątków dwoma enzymami restrykcyjnymi PvuII oraz SalI. Restryktaza PvuII rozpoznaje odpowiednią sekwencję nukleotydową w obrębie IS6110 i przecinając pozostawia tępe końce. W następnym etapie, oligonukleotydowe adaptory o długości 36 i 40 pz są

ligowane do końców pozostawionych przez Sall. Otrzymuje się pulę 3 rodzajów fragmentów restrykcyjnych: 1) fragmenty o dwóch tępych końcach pozostawionych przez PvuII, 2) fragmenty o jednym tępym końcu powstałym po trawieniu PvuII i drugim po przecięciu przez Sall, do którego przyłączony jest adaptor oraz 3) fragmenty o dwóch końcach powstałych po przecięciu Sall z dołączonymi adaptorami. Wszystkie fragmenty restrykcyjne są użyte jako matryca w reakcji amplifikacji *in vitro*, w której jeden starter jest komplementarny do sekwencji adaptora, a drugi do wewnętrznego fragmentu sekwencji IS6110. Amplifikacja fragmentów niosących adaptory na obu końcach (Sall-Sall) jest hamowana przez supresję DNA (SSH – suppression subtractive hybridisation). Amplifikacja fragmentów z adaptorem zligowanym do jednego końca (Sall-PvuII) wymaga obecności 5' końca sekwencji IS6110 jako matrycy dla drugiego startera. Fragmenty o obu końcach pozostawionych przez PvuII amplifikowane są tylko gdy dwie blisko zlokalizowane sekwencje IS6110 są w orientacji head-to-head. Produkty amplifikacji PCR są rozdzielane elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym generując wzory prążkowe FLAP. Czułość metody FLAP określono wyznaczając najniższe stężenie genomowego DNA, którego użycie do trawienia restrykcyjnego pozwala na otrzymanie widocznych (łatwych do wizualizacji) wzorów FLAP (0,25 ng/μl). Specyficzność metody weryfikowano dla wybranych szczepów wykazując hybrydyzację fragmentów FLAP z odpowiednią sondą zawierającą fragment IS6110.

Nowo opracowana metoda musi być porównana ze standardowymi metodami stosowanymi dla różnicowania szczepów *M. tuberculosis*. W tym celu zastosowano metodę FLAP dla różnicowania kolekcji 62 szczepów, a otrzymane wyniki porównano z wynikami otrzymanymi wcześniej innymi metodami dla tej samej kolekcji szczepów. Metody „spoligotyping”, MIRU-VNTR oparta o 15 *loci* oraz IS6110-RFLP pozwoliły na wyróżnienie odpowiednio 21, 28 i 36 grup. Natomiast metoda FLAP zidentyfikowała 32 wzory dla badanej kolekcji, z czego 14 (22,6%) były unikatowe, pozostałe 18 wzorów objęły 48 szczepów (77,4%). Otrzymane wzory prążkowe FLAP zawierały od 4 do 12 prążków, z czego większość (82%) 7 – 9 prążków. Siła różnicująca nowej metody FLAP wyrażona współczynnikiem HGDI wyniosła 0,973, podczas gdy dla metody MIRU-VNTR i IS6110-RFLP odpowiednio 0,966 i 0,971. Zarówno FLAP jak i IS6110-RFLP różnicowały głębiej 4 klastry otrzymane metodą MIRU-VNTR (M16, M18, M23, M27), a FLAP jeszcze dwa dodatkowe (M19 i M28). Z kolei 4 klastry utworzone przez MIRU-



VNTR (M1, M6, M21 i M22) zostały głębiej zróżnicowane metodą IS6110-RFLP, podczas gdy metoda FLAP ich już nie różnicowała.

Metody oparte o ligację adaptorów oligonukleotydowych, choć stosowane są w badaniach epidemiologicznych wielu bakterii, w badaniach mykobakterii użyteczne są jeśli oparte są o zmienność regionów otaczających sekwencję IS6110. Nowo opracowana metoda FLAP, należąca do metod LM-PCR, wykazała siłę różnicowania szczepów zbliżoną do metody referencyjnej IS6110-RFLP potwierdzając jej użyteczność w badaniach epidemiologicznych *M. tuberculosis*. Metoda FLAP, podobnie jak inne metody LM-PCR, jest wysoce różnicująca, niedroga i szybka w wykonaniu, może więc być wartościowym narzędziem do wstępnych analiz epidemiologicznych, szczególnie niedużych kolekcji szczepów.

Uwzględniając opracowaną metodologię postanowiono sprawdzić głębokość różnicowania kolekcji prątków gruźlicy z wykorzystaniem metod FLAP oraz FLiP, a uzyskane wyniki weryfikowano metodą referencyjną opartą o hybrydyzację typu Southern IS6110-RFLP oraz powszechnie stosowaną dla prątków gruźlicy MIRU-VNTR (**publikacja nr 5**). Obie metody należące do metod LM-PCR - FLAP i FLiP, wykazały podobny stopień różnicowania. Jednak tylko 52% szczepów zostało jednakowo zgrupowane ww. metodami, przy czym podobieństwo FLAP do IS6110-RFLP wyniosło 37,7%, a FLiP do IS6110-RFLP 78,7%. Wśród kolekcji 61 szczepów metoda FLAP wyróżniła 31 wzorów, z czego 13 było unikatowych, a pozostałe zgrupowane zostały w 18 klastrach obejmujących od 2 do 5 szczepów. Metoda FLiP natomiast pozwoliła wyróżnić 35 różnych wzorów, z czego 21 było unikatowych, a pozostałe utworzyły 14 klastrów składających się z 2 do 8 szczepów. Siła różnicująca wyrażona jako HGDI wyniosła 0,9757 i 0,9713 odpowiednio dla FLAP i FLiP. Wcześniej wykonane analizy metodami IS6110-RFLP i MIRU-VNTR wyróżniły 36 i 27 wzorów z HGDI 0,9743 i 0,9697. Wzory otrzymane użytymi metodami różniły się liczbą prążków, przy czym zazwyczaj większa liczba kopii IS6110 była identyfikowana metodą hybrydyzacyjną. Nieco mniejsza liczba prążków we wzorach FLiP może mieć związek z nieznacznie mniejszą siłą różnicowania w porównaniu do metody referencyjnej. Różna liczba prążków we wzorach FLAP i FLiP niekoniecznie odzwierciedla liczbę kopii IS6110 w badanych szczepach. Obserwowane różnice wynikać mogą z trudności technicznych takich jak błędna interpretacja prążków, niewystarczające rozdzielenie produktów PCR na żelu poliakrylamidowym albo z trudności w amplifikowaniu się dużych produktów w reakcji PCR lub z niespecyficznego

amplifikacji. Badania dowiodły, że metody LM-PCR, w tym FLAP i FLiP, są użyteczne w badaniach epidemiologicznych mykobakterii wykazując wysoką siłę różnicującą porównywalną do metody referencyjnej, a przy tym niedrogie i szybkie w wykonaniu. Głównym ograniczeniem metod opartych na reakcji PCR, w tym metod LM-PCR, jest niemożność skonstruowania referencyjnej bazy danych zawierającej wzory szczepów pochodzących z różnych laboratoriów. Dlatego metody te mogą być używane raczej jako badanie drugiej linii dla weryfikacji powiązań epidemiologicznych i mogą być wartościowym molekularnym narzędziem epidemiologicznym dla analiz kolekcji z ograniczoną ilością szczepów. Na podstawie przeprowadzonych analiz oczywistym wydaje się konieczność stosowania w dochodzeniach epidemiologicznych równocześnie więcej niż jednej metody opartej o PCR.

Metody epidemiologiczne służą nie tylko do analizowania dużych kolekcji szczepów. Pozwalają także na monitorowanie i identyfikację ognisk epidemiologicznych w małych społecznościach. W tym kontekście w **publikacji nr 6** wykorzystane zostały metody FLiP i FLAP oraz referencyjna metoda IS6110-RFLP dla analiz epidemiologicznych szczepów w zależności od miejsca ich pochodzenia (od 13 niespokrewnionych pacjentów mieszkających w trzech miejscowościach województwa podkarpackiego) oraz pokrewieństwa (od 8 członków czterech rodzin, każda reprezentowana przez dwóch pacjentów). Miejscowości różniły się liczbą mieszkańców, liczyły 60 000 (miejscowość A), 1 200 (miejscowość B) oraz 35 000 mieszkańców (miejscowość C). Z miejscowości A pochodziły 4 szczepy do analiz, z miejscowości B – 2, z miejscowości C – 7 szczepów, które reprezentowały odpowiednio 20%, 100% i 46% wszystkich szczepów *M. tuberculosis* izolowanych w tych miastach w 2012 roku. Szczepy z lokalizacji A reprezentowały identyczne wzory prążkowe otrzymane metodami FLAP i FLiP, natomiast metoda IS6110-RFLP wykazała identyczność wzorów trzech szczepów, czwarty natomiast posiadał dodatkowy prążek sugerując transpozycję ruchomego elementu. Co więcej, szczep ten wykazał także różnicę w lekooporności, okazał się wrażliwy na izoniazyd (INH), w przeciwieństwie do wszystkich trzech pozostałych, które wykazały oporność na INH. Identyczne profile trzech szczepów otrzymane trzema metodami oraz jednakowy fenotyp lekooporności może sugerować związek albo przypadkowy kontakt pacjentów, który stworzył wysokie prawdopodobieństwo transmisji szczepów między nimi albo wspólne źródło infekcji. Szczepy pochodzące z miejscowości B okazały się wrażliwe na wszystkie testowane antybiotyki (izoniazyd - INH, ryfampicynę - RMP, streptomycynę -



SM i etambutol - ETB) i wykazały jednakowe wzory otrzymane metodą FLAP, natomiast profile prążkowe otrzymane metodami FLiP i IS6110-RFLP różniły się nieznacznie obecnością jednego prążka co wyklucza bezpośrednią transmisję tych szczepów ale nie wyklucza wspólnego źródła infekcji. Spośród analizowanych 7 szczepów z miejscowości C tylko dwa wykazały te same wzory prążkowe otrzymane trzema zastosowanymi metodami, co wskazuje na ich molekularne powinowactwo. Pewne różnice obserwowane były w lekooporności szczepów 16 i 17, natomiast pacjenci, od których były one izolowane mieszkali w bliskim sąsiedztwie (odległość 500 m) więc transmisja szczepów między nimi była prawdopodobna. Jeden pacjent mógł być zarażony od drugiego lub oboje mogli zostać zainfekowani ze wspólnego nieznanego źródła. Pozostałe szczepy z miejscowości C wykazały różne profile DNA wszystkimi trzema metodami potwierdzając osobne źródła infekcji i brak transmisji szczepów między pacjentami.

Przeprowadzone analizy rozdzieliły osiem szczepów izolowanych od spokrewnionych pacjentów na cztery epidemiologiczne grupy odpowiadające czterem rodzinom, z których pochodziły badane szczepy. Zidentyfikowane jednakowe profile DNA oraz wzory oporności na antybiotyki w obrębie każdej rodziny wskazują na transmisję szczepów w rodzinie. Podobną sytuację obserwowano w małej miejscowości gdzie kontakt osób jest bardziej prawdopodobny. Poprawnie sprawowany nadzór epidemiologiczny obejmuje wykrywanie pacjentów gruźliczo-pozytywnych w płwocinie, włączenie leczenia przeciwgruźliczego oraz badanie osób z otoczenia chorego w celu wykluczenia lub wykrycia zakażenia. Choć molekularne metody pozwalają na realizację celów współczesnej epidemiologii to jednak metody te powinny być wsparte przez dostępne dane socjo-demograficzne istotne dla identyfikacji grup, w których transmisja szczepów gruźliczych jest bardziej prawdopodobna takie jak: stopień pokrewieństwa osób diagnozowanych, status socjalny, choroby współistniejące, miejsce zamieszkania itp. Prawdopodobieństwo transmisji szczepów jest większe w przypadku bezpośredniego kontaktu osób np. w rodzinach, małych społecznościach, centrach zdrowia, więzieniach itp. Jednak nawet identyczne wzory molekularne szczepów nie mogą stanowić wystarczającego dowodu, że źródłem zakażenia jest osoba z najbliższego otoczenia. W przedstawionych badaniach molekularna część dochodzeń epidemiologicznych oparta była na trzech różnych metodach. Warto podkreślić, że wyłącznie dane potwierdzone kilkoma metodami różnicowania szczepów wraz ze szczegółowym wywiadem epidemiologicznym mogą wykazać rzeczywistą transmisję poszczególnych szczepów w środowisku. Natomiast

różnice we wzorach molekularnych otrzymanych różnymi metodami wprowadzają dwuznaczność w interpretacji wyników i wykluczają transmisję szczepów pomiędzy pacjentami, od których zostały wyizolowane. W przedstawionych badaniach wykazano wysokie prawdopodobieństwo transmisji szczepów wśród członków rodzin, a także w obrębie niedużej społeczności. Bardziej ogólne wnioski o poziomie transmisji wymagają molekularnych analiz z wielu lat.

Metody oparte o ligację adaptorów oligonukleotydowych są metodami uniwersalnymi. Pozwalają na przeprowadzenie badań epidemiologicznych różnych bakterii nawet bez znajomości sekwencji ich genomów. Dlatego, w kolejnej przedstawionej do oceny pracy, postanowiono wykorzystać metodę należącą do metod LM do analizy bakterii gramujemnych należących do *Salmonella enterica* izolowanych z hodowli kur w różnych fermach na terenie Polski (**publikacja nr 7**).

Gatunek *S. enterica* jest ważnym czynnikiem infekcyjnym zwierząt domowych będącym przyczyną różnych symptomów od gastrycznych po śmierć. Niektóre serowary, np. *S. Typhimurium* i *S. Enteritidis*, mogą też infekować ludzi a ich rezerwuarem często są fermy kurze. Bakteria *S. enterica* jest poważną przyczyną chorób i śmiertelności u drobiu, dlatego monitorowanie tych bakterii, mogących być również przyczyną chorób ludzi, jest jednym z wyzwań przemysłu drobiarskiego, szczególnie, że salmonellozy prowadzą do poważnych ekonomicznych strat. W tym celu uzasadnionym jest opracowywanie szybkich i niedrogich molekularnych metod dla wykrywania i charakteryzowania tych patogenów oraz pozwalających na wykrywanie prawdopodobnego źródła infekcji i na dochodzenie czy izolaty wykrywane w różnych fermach i powodujących salmonellozy są ze sobą powiązane. Standardową metodą stosowaną w epidemiologii salmonelloz od lat 90-tych XX wieku jest metoda REA-PFGE (Restriction Enzyme Analysis – Pulsed Field Gel Electrophoresis). Metoda polega na trawieniu restrykcyjnym genomowego DNA (*XbaI*) i rozdzieleniu otrzymanych fragmentów na żelu agarozowym w zmiennym polu elektrycznym. Choć jest to metoda znormalizowana dla celów porównawczych pomiędzy laboratoriami to jednak potrzebuje kosztownego wyposażenia i odpowiedniego oprogramowania dla porównywania wyników, jest czaso- i pracochłonna, dlatego jej stosowanie ograniczone jest do laboratoriów referencyjnych bądź naukowych.

W przedstawionej do oceny pracy zastosowano metodę MP-PCR (Melting-Profile PCR), należącą do metod LM-PCR i bazującą na ligacji adaptorów oligonukleotydowych. Technika ta, opracowana przez Masny i Plucienniczak (2003), a zmodyfikowana przez

Krawczyk i wsp. (2006) zastosowana była uprzednio dla różnicowania wielu bakterii oraz dermatofitów i drożdży. W przedstawionej pracy metoda MP-PCR użyta została dla różnicowania bakterii *Salmonella* po raz pierwszy, a otrzymane wyniki porównane zostały z wynikami otrzymanymi metodą referencyjną REA-PFGE zastosowaną dla tej samej kolekcji szczepów.

Badana kolekcja obejmowała 99 szczepów *S. enterica*, z czego 85 szczepów, w tym 7 różnych serowarów, pochodziło z weterynaryjnego laboratorium diagnostycznego Vet-Lab Brudzew w centralnej Polsce, natomiast pozostałe dołączone do badań były szczepami kontrolnymi pozyskanymi z Instytutu Weterynaryjnego w Puławach oraz stacji sanitarno-epidemiologicznej w Łodzi. Kolekcja reprezentowana była przez 14 różnych serowarów sklasyfikowanych uprzednio zgodnie z obowiązującymi standardami opartymi o wymagania wzrostowe, morfologię kolonii, charakterystykę biochemiczną i serotypowanie (ISO 6579:2002).

Metoda MP-PCR oparta jest na trawieniu restrykcyjnym genomowego DNA, ligacji otrzymanych fragmentów z adaptorem oligonukleotydowym, a następnie na reakcji PCR z niższą od standardowej temperaturą denaturacji, co skutkuje tym, że tylko mniej stabilne fragmenty są amplifikowane. Optymalizacja metody polegała na wybraniu restryktazy HindIII do trawienia genomowego DNA oraz wyborze temperatury denaturacji w reakcji PCR. Temperaturę denaturacji wybrano eksperymentalnie, dla wszystkich izolatów *Salmonella* 85,7°C. Otrzymane produkty amplifikacji w metodzie MP-PCR rozdzielane są w żelu poliakrylamidowym otrzymując wzory prążkowe. Podobieństwo wzorów określono metodą średnich połączeń – UPGMA z wykorzystaniem współczynnika podobieństwa Dice i oprogramowania BioNumeric 5.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Klaster stanowiła grupa co najmniej dwóch izolatów wykazujących identyczne wzory prążkowe. Dla określenia siły różnicującej metody wykorzystano powszechnie stosowany w takich badaniach wskaźnik HGDI. Powtarzalność metody potwierdzono w ośmiu niezależnych eksperymentach przeprowadzonych dla dwóch różnych serowarów.

Metoda MP-PCR zróżnicowała badaną kolekcję na 38 wzorów unikatowych oraz 22 klastry różnicując szczepy w obrębie serowarów. 59 serowarów *S. Enteritidis* zostało zróżnicowanych na 19 wzorów pojedynczych i 14 klastrów obejmujących 2 do 6 szczepów. W obrębie serowaru *S. Typhimurium* metoda wyróżniła 3 klastry i 4 wzory unikatowe, wśród *S. Virchow* – jeden klaster obejmujący 4 szczepy oraz 3 wzory unikatowe. W przeciwieństwie do wyników otrzymanych metodą REA-PFGE, nie

wykazano żadnego podobieństwa pomiędzy szczepami *S. Virchow* 394, *S. Virchow* PK0 i *S. Enteritidis* WK-6. Trzy szczepy *S. Mbandaka* natomiast zostały zgrupowane tak samo jak metodą PFGE, natomiast 2 kolejne wykazały wzory unikatowe. Dwa z trzech izolatów *S. Hadar* zostały sklasyfikowane tak samo metodą MP-PCR jak i PFGE, a jeden wykazał wzór odmienny. Wśród szczepów należących do *S. Infantis* metoda MP-PCR wyróżniła 2 klastry i 1 wzór pojedynczy, podczas gdy PFGE – 1 klaster taki jak MP i 3 wzory unikatowe. Ponadto, wszystkie pojedyncze szczepy różnych serowarów wykazały odmienne wzory MP. Metoda MP-PCR wykazała wyższą siłę różnicującą niż metoda referencyjna (HGDI 0,939 vs 0,608) zastosowana dla tej samej kolekcji szczepów. Możliwe, że mniejsza liczba prążków we wzorach PFGE ma związek z niższą rozdzielczością metody w porównaniu do MP-PCR. Biorąc pod uwagę dwa największe klastry PFGE widać wyraźnie, że zostały zróżnicowane głębiej metodą MP-PCR. Klaster PFGE-E2 z 32 izolatami został rozdzielony na 11 klastrow metodą MP-PCR. Warto jednak zauważyć, że 3 z 5-ciu pojedynczych wzorów otrzymanych metodą PFGE zostały połączone w klastry z innymi szczepami i nie zostały zróżnicowane metodą MP-PCR na pojedyncze wzory. Niektóre klastry MP (MP-E1, MP-E4, część MP-E6, 9, 12, 13, MP-V, MP-I2 i MP-M) obejmowały szczepy izolowane od kur pochodzących z tych samych ferm, inne natomiast (MP-E2, 4, 9, 11, MP-T3 i MP-I1) pochodziły z tej samej wylęgarni, co wskazuje, że była ona źródłem zakażenia. W przypadku *S. Mbandaka* 913/S/09 i MP-M źródłem zakażenia był hodowca, a nie wylęgarnia ponieważ szczepy izolowane były z klatek należących do tego samego hodowcy. Niektóre szczepy natomiast, choć izolowane od drobiu pochodzącego z jednej wylęgarni i hodowane przez tego samego hodowcę, nie były zgrupowane w te same klastry (MP-E1 i *S. Enteritidis* 1014/S/09 K1, MP-E4 i *S. Enteritidis* 1044/S/09 K2). W tych przypadkach szczepy *Salmonella* izolowane były od kur pochodzących z różnych partii albo hodowanych w różnych okresach czasu.

Wykazano, że metoda MP-PCR jest wysoce różnicująca, niedroga i szybka w wykonaniu, dlatego jest użyteczna w analizach powiązań epidemiologicznych pomiędzy szczepami *Salmonella*, szczególnie *Enteritidis*. Szczepy *S. Enteritidis* stanowiły 62% badanej kolekcji. *S. Enteritidis* jest wysoce monomorficzną grupą, a metoda PFGE z zastosowaniem enzymu XbaI słabo różnicuje ten serowar. Rutynowe kontrole rozprzestrzeniania się salmonelli w przemyśle drobiarskim, poprzez monitorowanie zanieczyszczenia wylęgarni, wymagają szybkich i niedrogich metod. Taką alternatywą jest MP-PCR stosowana dla analiz epidemiologicznych licznych bakterii. Wykazano, że dla

szczepów *S. enterica* MP-PCR też może być metodą użyteczną, zwłaszcza dla ograniczonych kolekcji. Zastosowanie metody MP-PCR dla licznych kolekcji należy potwierdzić na większej liczbie szczepów z różnych regionów geograficznych. Choć wkrótce może pojawić się, jako standardowa wysoce różnicująca metoda w epidemiologii salmonelloz - sekwencjonowanie całego genomu patogena, to jednak dla celów epidemiologicznych siła różnicująca metody MP-PCR wydaje się być wystarczająca.

Ponadto, dla niektórych gatunków bakterii, nawet istotnych z ekonomicznego punktu widzenia, nie opracowano do tej pory skutecznych metod, które pozwalają na śledzenie rozprzestrzeniania się tych drobnoustrojów. W tym celu postanowiono podjąć próbę zastosowania metod opartych o amplifikację DNA *in vitro* do typowania patogenu ziemniaka – *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) (**publikacja nr 8**). Do badań wybrano metody MP-PCR oraz VNTR, które są uniwersalne i powszechnie stosowane w typowaniu różnych bakterii pozwalając na wychwycenie nawet niewielkich różnic w ich genomach. Obie metody zastosowano dla genotypowania Cms po raz pierwszy.

*C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* jest fitopatogenem wywołującym bakteriozę pierścieniową ziemniaka, która stanowi poważne zagrożenie dla plonów. W krajach Unii Europejskiej bakterioza jest choroba kwarantannową, a Cms podlega obowiązkowi zwalczania. Głównym źródłem Cms są zakażone sadzeniaki, w których po wysadzeniu bakterie namnażają się i rozprzestrzeniają w rosnącej roślinie. Symptomy choroby pojawiają się po kwitnieniu lub jeszcze później. Z tych powodów choroba jest trudna do wykrycia albo mylona z innymi chorobami ziemniaków. Z powodu dużych strat ekonomicznych uzasadnione jest rozwijanie metod pozwalających na kontrolę tej bakterii by śledzić transmisję szczepów w środowisku i zapobiegać ich rozprzestrzenianiu.

W przedstawionej do oceny pracy badaniami objęto kolekcję 93 szczepów Cms pozyskaną z Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Środowiska w Rzeszowie. Izolaty były uprzednio zidentyfikowane do gatunku standardowymi metodami immunofluorescencyjnymi IF oraz FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Przed badaniem użyteczności wybranych metod w epidemiologii Cms potwierdzono przynależność gatunkową szczepów z kolekcji również w reakcji amplifikacji DNA z zastosowaniem odpowiednich starterów otrzymując produkt 502 pz. Optymalizacja metody MP-PCR polegała na eksperymentalnym wyborze optymalnej temperatury denaturacji w reakcji PCR. Ze względu na wysoką zawartość par GC w genomie Cms, temperaturę denaturacji ustalono na 92,5°C. Wybrano także restryktazę do

trawienia genomowego DNA pozwalającego na otrzymywanie dobrej jakości profili prążkowych (BamHI) dla poszczególnych izolatów. Metoda MP-PCR różnicowała kolekcję 93 szczepów na 10 klastrów oraz 2 unikatowe wzory. Siła różnicowania metody wyrażona współczynnikiem HGDI wyniosła 0,865. Następnie, spośród otrzymanych różnych grup MP wybrano kolekcję 47 szczepów, dla której zastosowano metodę VNTR bazującą na polimorfizmie zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń w genomie. W tym celu, w analizach *in silico*, zidentyfikowano 518 *loci* VNTR w genomie, z których wybrano 6 *loci*, które były następnie amplifikowane w reakcji PCR z zaprojektowanymi starterami komplementarnymi do sekwencji flankujących. Tylko 4 *loci* pozwalały różnicować badane szczepy dając 4-cyfrowe wzory. Metoda VNTR różnicowała badaną kolekcję 47 szczepów na 5 grup i 2 wzory pojedyncze, podczas gdy metoda MP-PCR różnicowała tą samą kolekcję 47 szczepów na 10 klastrów i 1 wzór unikatowy. Siła różnicowania metod wyrażona HGDI wyniosła 0,522 dla metody VNTR i 0,900 dla MP-PCR. Jak wykazano wcześniej, szczepy Cms charakteryzują się wysoką homogennością, ponadto badane szczepy pochodziły z tego samego regionu geograficznego. Niższa siła różnicująca metody VNTR wynikać może też z faktu, że tylko 1 z czterech *loci* VNTR wykazał wystarczającą siłę różnicującą. Jednoczesne użycie obu metod zwiększyło siłę różnicowania, która wyniosła HGDI 0,983. Otrzymane wyniki wykazały, że obie zastosowane metody są użyteczne w różnicowaniu szczepów badanej kolekcji i mogą być stosowane w analizach epidemiologicznych Cms ale wymagają, szczególnie metoda VNTR, dalszego udoskonalenia. Wskazane jest przede wszystkim zidentyfikowanie większej liczby wysoce zmiennych *loci* dla użyteczności metody VNTR.

**Za najważniejsze osiągnięcia w przedstawionym cyklu publikacji uważam:**

- ✓ opracowanie nowej metody FLAP dla różnicowania szczepów *M. tuberculosis* i wykazanie jej użyteczności w molekularnej epidemiologii gruźlicy,
- ✓ optymalizację metody FLiP i jej zastosowanie w analizach epidemiologicznych gruźlicy w Polsce w odniesieniu do metod referencyjnych,
- ✓ optymalizację metody MP-PCR dla genotypowania szczepów *Salmonella enterica* i wykazanie wyższego potencjału różnicującego tej metody w porównaniu do metody referencyjnej REA-PFGE,
- ✓ zastosowanie po raz pierwszy metod MP-PCR i VNTR w typowaniu genetycznym *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus*.



Genotypowanie bakterii dostarcza wiedzy o epidemiologii chorób przez nie wywołanych oraz umożliwia ich kontrolę oraz zapobieganie. Wysoce różnicujące metody oparte o sekwencjonowanie całych genomów są ciągle zbyt drogie dla rutynowych dociekań epidemiologicznych oraz wymagają specjalistycznych analiz bioinformatycznych. Rutynowe kontrole rozprzestrzeniania się bakterii i ich monitorowanie wymagają szybkich i tanich metod nawet o niższej sile dyskryminacyjnej, szczególnie na wstępnych etapach analiz epidemiologicznych. Dlatego uzasadnionym jest poszukiwanie nowych metod i udoskonalanie dotychczas stosowanych.

#### Literatura uzupełniająca (poza publikacjami tworzącymi osiągnięcie naukowe):

1. Cowan L.S., Diem L., Monson T. iwsp.: Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 688-695. 2005.
2. Demay C., Liens B., Burguière T., Hill V., Couvin D., Millet J., Mokrousov I., Sola C., Zozio T., Rastogi N.: SITVITWEB-a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 12(4): 755-66. 2012.
3. Frothingham R.H., Hills G., Wilson H.: Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1639-43. 1994.
4. Hunter P.R., and Gaston M.A.: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index in diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465-6. 1988.
5. Jagielski T., Minias A., van Ingen J., Rastogi N., Brzostek A., Żaczek A., Dziadek J.: Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other *Mycobacteria*. *Clin. Microbiol. Rev.* 29(2):239-90. 2016.
6. Krawczyk M., Brzostek A., Gorna A., Knapska K., Ziolkiewicz M., Wojtasik A., Dziadek J.: Epidemiological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Lodz, Poland. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15(9): 1252-8. 2011.
7. Krawczyk B., Samet A., Leibner J., Sledzińska A., Kur J.: Evaluation of a PCR melting profile technique for bacterial strain differentiation. *J ClinMicrobiol.* 44(7):2327-32. 2006.
8. Kremer K., Arnold C., Cataldi A., Gutiérrez M.C., Haas W.H., Panaiotov S., Skuce R.A., Supply P., van der Zanden A.G., van Soolingen D.: Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J. Clin. Microbiol.* 43(11):5628-38. 2005.
9. Masny A., Płucienniczak A.: Ligation mediated PCR performed at low denaturation temperatures--PCR melting profiles. *Nucleic Acids Res.* 15;31(18):e114. 2003.
10. Mathema B., Kurepina N.E., Bifani P.J., Kreiswirth B. N.: Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 658-685. 2006.
11. Reisig F., Kremer K., Amthor B., et al.: Fast ligation-mediated PCR, a fast and reliable method for IS6110-based typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5622-5627. 2005.
12. Supply P., Allix C., Lejean S., Cardoso-Oelemann M., Rush-Gerdes S., Willery E., et al.: Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *M. tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4498-510. 2006.
13. Thierry D., Cave M.D., Eisenach K.D., et al.: IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.* 18, 188. 1990.

14. van Embden J.D.A., Cave M.D., Crawford J.T., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B.: Strain identification of *M. tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31: 406-9. 1993.
15. van Embden J.D., van Gorkom T., Kremer K., Jansen R., van Der Zeijst B. A., Schouls L.M.: Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J. Bacteriol.* 182(9): 2393-401. 2000.

## 5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO – BADAWCZYCH

### **Badania epidemiologiczne lekoopornych szczepów *Mycobacterium* oraz mechanizmy nabywania oporności.**

Brak leczenia, niewłaściwa terapia, brak współpracy pacjenta i lekarza to najczęstsze przyczyny prowadzące do pojawiania się gruźlicy odpornej na leki. WHO raportuje corocznie wzrost liczby zakażeń szczepami lekoopornymi, wielolekoopornymi (MDR – multi drug resistant, opornymi na izoniazyd, INH oraz rifampicynę, RMP), szczepami o rozszerzonej oporności (XDR – extensively drug resistant, opornymi na INH, RMP oraz fluorochinolony i co najmniej jeden z leków iniekcyjnych) oraz szczepami całkowicie opornymi na leki (TDR- totally drug resistant). Monitorowanie rozprzestrzeniania się lekooporności prątków jest jednym w najważniejszych elementów dobrze prowadzonych programów walki z gruźlicą.

Oporność prątków gruźlicy na podstawowe tuberkulostatyki wynika z akumulacji mutacji w genach kodujących miejsca docelowe dla leków bądź enzymy niezbędne dla wewnątrzkomórkowej aktywacji leku. Identyfikacja zależności pomiędzy obecnością określonej mutacji a poziomem oporności pozwala na opracowanie nowych, szybkich testów molekularnych wykrywających oporność bez konieczności długotrwałej hodowli prątków *M. tuberculosis*. W pracy opublikowanej, wspólnie z zespołem prof. Dziadka z Instytutu Biologii Medycznej PAN, w *BMC Microbiology*, w której zrealizowałam większość zaplanowanych eksperymentów, a także uczestniczyłam w wypracowaniu koncepcji projektu oraz w przygotowaniu manuskryptu, skonstruowano model genetyczny, który pozwolił na badanie bezpośredniej zależności pomiędzy obecnością mutacji w genie *rpoB*, a poziomem oporności szczepów *M. tuberculosis* na rifampicynę (Żaczek, 2009). Ogromna większość szczepów opornych na jeden z najważniejszych leków przeciwgruźliczych pierwszej linii, rifampicynę (RMP), nosi mutacje w genie *rpoB*



kodującym podjednostkę  $\beta$ -polimerazy RNA stanowiącą jego miejsce docelowe. Znakomita większość mutacji związanych z opornością na RMP została opisana wyłącznie na podstawie ich obecności w genie *rpoB* szczepów opornych na RMP. W naszych badaniach dzięki zastosowaniu modelu genetycznego byliśmy w stanie precyzyjnie zweryfikować zależność pomiędzy obecnością danej mutacji a poziomem oporności na RMP. Badaniu poddano 8 różnych mutacji zidentyfikowanych w 81-nukleotydowym fragmencie genu *rpoB* klinicznych szczepów *M. tuberculosis* opornych na rifampicynę. Spośród badanych mutacji tylko mutacje 526(His→Asp), 516(Asp→Val), 531(Ser→Leu) odpowiadały za nabycie oporności na wysokie stężenia rifampicyny, niezależnie od właściwości gospodarza. Inne badane mutacje identyfikowane w genie *rpoB* lekoopornych szczepów klinicznych, powodowały nabycie oporności wyłącznie w wybranych szczepach *M. tuberculosis*. Wykazano, że poziom oporności na rifampicynę zależy od rodzaju i miejsca mutacji oraz właściwości szczepu gospodarza. Ponadto stwierdzono, że obserwowany efekt nabycia oporności nie jest związany z nadprodukcją białka RpoB noszącego badane mutacje.

W kolejnych badaniach opublikowanych w *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, prowadzonych we współpracy z dr Jagielskim z Uniwersytetu Warszawskiego oraz zespołem prof. Dziadka z IBM PAN, określono występowanie mutacji w całym genie *rpoB* wśród 115 klinicznych izolatów *M. tuberculosis*, zarówno opornych, jak i wrażliwych na RMP (Jagielski 2018). Wśród 58 szczepów (89,2%) opornych na RMP zidentyfikowano 22 różne typy mutacji w genie *rpoB*. Spośród nowo odkrytych mutacji w *rpoB*, przetestowano empirycznie rolę trzech substytucji w nabywaniu oporności na RMP wykazując, że są to mutacje kompensacyjne. Wyniki doświadczeń mutagenezy *in vitro* połączono z oceną częstości występowania mutacji *rpoB* i ich wzajemnego współwystępowania w populacjach globalnych *M. tuberculosis* oraz z dokowaniem molekularnym zmutowanych białek RpoB z cząsteczką leku. Moim zadaniem w wyżej opisanych badaniach było przygotowanie układu kontrolnego pozwalającego na zweryfikowanie funkcjonalności zastosowanego modelu genetycznego.

Ze względu na wysoki poziom naturalnej oporności narastającym problemem zdrowotnym są zakażenia prątkami niegruźliczymi (NTM – *Non-tuberculosis mycobacterium*). Najliczniejszą grupę bakterii spośród wszystkich prątków atypowych izolowanych od pacjentów stanowi *Mycobacterium kansasii*, oportunistyczny patogen

wywołujący m. in. choroby płuc. Objawy kliniczne wywołane przez *M. kansasii* mogą być bardzo zbliżone do objawów gruźlicy wywoływanej przez *M. tuberculosis*. Błędne rozpoznanie choroby stanowi poważny problem w dobraniu odpowiedniego leczenia. Koniecznym wydaje się podjęcie działań mających na celu usprawnienie diagnostyki *M. kansasii*, jak i molekularnego typowania izolatów klinicznych. Badania realizowane w ramach współpracy z zespołami dr Jagielskiego (UW) oraz prof. Dziadka (IBM PAN) i opublikowane w *Scientific Reports*, zmierzały do opracowania nowej metody o wysokiej rozdzielczości dla różnicowania szczepów *M. kansasii* (Bakuła, 2018). Genom referencyjny szczepu *M. kansasii* ATCC 12478 przeszukano pod kątem występowania zmiennej liczby tandemowych powtórzeń (VNTR) przy użyciu programu Tandem Repeat Finder. Zidentyfikowano 24 VNTR z czego 17 użyto do zróżnicowania kolekcji 67 szczepów uprzednio podzielonych na 6 podtypów. Wyniki porównano z wynikami otrzymanymi metodą PFGE dla tej samej kolekcji szczepów. Tylko jeden VNTR(19) zróżnicował wszystkie badane podtypy *M. kansasii*. Różne *loci* wykazały różny poziom zmienności. Zastosowanie 17 VNTR wyróżniło wśród badanej kolekcji 19 profili prążkowych (w tym 6 klastrów i 13 wzorów unikatowych). PFGE z zastosowaniem enzymu AseI dla tej samej kolekcji szczepów, pozwoliła na otrzymanie 33 różnych wzorów (zebranych w 12 klastrach i 21 szczepów o wzorach unikatowych). Siła różnicująca metody VNTR wyrażona współczynnikiem HGDI wyniosła 0,95 a PFGE 0,66. Siła różnicująca obu metod zastosowanych łącznie wyniosła 0,97 co pozwoliło na zaproponowanie nowego 2-etapowego schematu typowania genetycznego *M. kansasii*, w którym pierwszy etap stanowi metoda VNTR, a kolejny PFGE. Moim zadaniem w wyżej opisanych badaniach była weryfikacja możliwości zastosowania zidentyfikowanych *in silico loci* VNTR do różnicowania szczepów *M. kansasii* poprzez opracowanie warunków amplifikacji i rozdziału elektroforetycznego powstałych produktów.

Efektom powyższych prac oraz moich zainteresowań związanych z metodami typowania bakterii w oparciu o metody LC-PCR było zaproszenie mnie do uczestnictwa w przygotowaniu pracy przeglądowej dla prestiżowego czasopisma *Clinical Microbiology Review* (Jagielski, 2016). Moją rolą w tej publikacji było odniesienie się do badań związanych z metodami molekularnego typowania mykobakterii. Opisałam metody oparte o analizę genomu (PFGE – Pulsed-Field Gel Electrophoresis, RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA, AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism) oraz metody bazujące na sekwencjach powtórzonych (REA – Restriction Enzyme Analysis), a

także metody oparte o ligacje adaptorów oligonukleotydowych, w tym metody bazujące na sekwencjach minisatelitarnych (ERIC – Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, TRS – Trinucleotide Repeat Sequences i rep-PCR). W publikacji tej przedstawiono również, za zgodą czasopisma, moją rycinę umieszczoną uprzednio w artykule w *Int J Tuberc Lung Dis.* (Żaczek, 2014).

### **Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału u Mykobakterii.**

Ostatnio, we współpracy z zespołem prof. Dziadka, podjęto badania nad dwukomponentowymi systemami transdukcji sygnału (TCS Two-Component regulatory System) u *Mycobacterium*. TCS występują powszechnie u bakterii i odgrywają bardzo ważną rolę w regulacji wielu procesów życiowych, uczestniczą w regulacji szlaków metabolicznych i transporcie substancji odżywczych, a także umożliwiają adaptację bakterii do zmieniających się warunków środowiska. Opisano kilkaset takich systemów u bakterii ale funkcje wielu z nich są ciągle nieznane. Mykobakterie posiadają niewiele TCS (np. u *M. tuberculosis* znanych jest 12 TCS), ale mają one kluczowe znaczenie dla przeżycia bakterii i odgrywają ważną rolę w procesie wirulencji.

Typowy dwuskładnikowy system regulacyjny składa się z błonowego białka sensorowego, którym jest kinaza histydynowa (HK), odbierająca sygnał ze środowiska oraz cytoplazmatycznego białka regulatorowego – regulatora odpowiedzi (RR). RR po odebraniu sygnału zmienia konformację, przez co reguluje ekspresję docelowego genu. Dwuskładnikowe systemy pozwalają doskonale połączyć bodziec oraz reakcję na ten bodziec. Wśród czynników, które mogą być odbierane przez TCS wyróżniono wiele sygnałów chemicznych i fizycznych.

Moim zadaniem w przeprowadzonych badaniach była globalna analiza fenotypowa przeprowadzona w oparciu o mikromacierze fenotypowe szczepów-mutantów skonstruowanych w celu wstępnej identyfikacji funkcji badanych białek dwuskładnikowych systemów regulacyjnych *M. smegmatis*. Mikromacierze fenotypowe systemu Biolog (PM – Phenotype Microarray), w których się wyspecjalizowałam, pozwalają na ilościową analizę blisko 2000 fenotypów danego mikroorganizmu w trakcie jednego badania w formie płytek titracyjnych i obserwacje kinetyki aktywności metabolicznej szczepów badanego i kontrolnego.

W pracy opublikowanej we *Frontiers Microbiology*, w procesie homologicznej rekombinacji skonstruowano mutantą *M. smegmatis* pozbawionego zdolności do syntezy kinazy histydynowej PdtaS (Dadura, 2017). Badanie przy użyciu PM pozwoliło na zaobserwowanie zwiększonej wrażliwości szczepu mutantą na antybiotyki aminoglikozydowe, oporności na antybiotyki tetracyklinowe, upośledzony transport międzybłonowy i proces oddychania. Funkcje białka PdtaS były następnie badane innymi metodami. Aby poznać mechanizmy molekularne odpowiedzialne za obserwowany fenotyp porównano rybosomalne profile RNA i profile białkowe mutantą i szczepu dzikiego. Wykazano, że niedobór PdtaS wpływa na efektywność oddychania i skład białek rybosomalnych powodując istotne zmiany w oporności na wybrane antybiotyki, w tym także na tuberkulostatyki powszechnie stosowane w leczeniu zakażeń prątkami gruźlicy.

W kolejnej pracy, opublikowanej w *Scientific Reports*, badano geny zaangażowane w metabolizm azotu u *Mycobacterium* (Antczak, 2018). Kluczowym regulatorem odpowiedzi przyczyniającym się do przeżycia prątków podczas głodzenia azotowego jest białko GlnR. Zidentyfikowano wiele genów znajdujących się bezpośrednio lub pośrednio pod kontrolą tego regulatora jednak tylko nieliczne z nich zostały dotychczas scharakteryzowane. Wśród wielu genów regulowanych bezpośrednio przez aktywność GlnR są czynniki transkrypcyjne. Jednym z nich jest NnaR (kodowany przez gen 0432, regulator transportu azotu u *Streptomyces coelicolor*). W pracy skonstruowano szczepy-mutantą pozbawione funkcjonalnych genów *glnR* oraz *nnaR*, które hodowano w warunkach ograniczonego dostępu azotu. Zdolność mutantów do wzrostu na różnych źródłach azotu oceniono przy użyciu mikromacierzy fenotypowych. Zweryfikowano rolę tych genów w metabolizmie azotu oraz zbadano ich wzajemne powiązania. Wykazano, że regulator NnaR jest niezbędny dla wykorzystania azotanów i azotynów jako źródła azotu u mykobakterii - szczep  $\Delta nnaR$  był całkowicie niezdolny do wzrostu na azotanie lub azotynie jako jedynym źródle azotu, choć gen ten nie jest niezbędnym dla *M. smegmatis* w warunkach bogatych w azot. Ponadto wykazano, że NnaR wymaga funkcjonalnego białka GlnR dla regulacji ekspresji genów związanych z asymilacją azotanów/azotynów.

Obecnie badania dotyczące mykobakteryjnych TCS są kontynuowane w ramach przyznanego mi grantu **Miniatura 2**, którego celem jest poznanie funkcji produktów genów *msmeg\_6236/6238* u *M. smegmatis*.

## Wykorzystanie mikromacierzy fenotypowych w badaniach środowiskowych.

System Biolog (Biolog EcoPlates) wykorzystywałam także w badaniach środowiskowych prowadzonych we współpracy z zespołem prof. Mankiewicz-Boczek z Centrum Ekohydrologii PAN oraz zespołem prof. Dziadka. Badania opublikowane w *Ecological Engineering* dotyczyły opracowania optymalnego sposobu usuwania związków azotowych ze ścieków (**Mankiewicz-Boczek, 2017**). W tym celu przygotowano bioreaktory polowe i wypełniono je różnymi substratami węglowymi z aktywatorami mikrobiologicznymi i uzupełniono ściekami. Badano 5 różnych wariantów źródeł węgla pod kątem aktywności drobnoustrojów. Wykazano najszybsze i najbardziej skuteczne usuwanie azotanów po dodaniu do badanych bioreaktorów mieszanki węgiel-słoma oraz mikroflory pochodzącej z czynnych/pracujących barier denitryfikacyjnych. Mikromacierze fenotypowe wykorzystano do analizy aktywności metabolicznej mikroorganizmów w bioreaktorach. W tym celu używano płytek EcoPlates zawierających 31 różnych źródeł węgla w trzech powtórzeniach, na które nanoszono badane konsorcja bakteryjne. Wykazano, że dodanie mieszanki węgiel-słoma jako substratu do bioreaktorów utrzymuje mikrobiologiczną aktywność wybranych konsorcjów bakteryjnych na wysokim poziomie i przez czas dłuższy niż inne substraty węglowe. Zaszczepienie złoża bioreaktora dodatkową pulą mikroorganizmów pochodzącej z innej aktywnej bariery azotowej może zwiększać wydajność złoża i stymulować procesy zarówno nityfikacji jak i denitryfikacji. System Biolog (Gen III MicroPlate test panel) wykorzystywałam również do określenia przynależności gatunkowej 12 badanych bakterii o zdolnościach denitryfikacyjnych.

### Publikacje habilitanta dotyczące opisanych powyżej osiągnięć naukowo-badawczych:

**Żaczek A**, Brzostek A, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Dziadek J. 2009 Genetic evaluation of relationship between mutations in *rpoB* and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin. *BMC Microbiol.* 2009 Jan 15;9:10. doi: 10.1186/1471-2180-9-10.

Jagielski T, Bakula Z, Brzostek A, Minias A, Stachowiak R, Kalita J, Napiórkowska A, Augustynowicz-Kopeć E, **Żaczek A**, Vasiliauskiene E, Bielecki J, Dziadek J. 2018 Characterization of Mutations Conferring Resistance to Rifampin in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Sep 24;62(10). pii: e01093-18. doi: 10.1128/AAC.01093-18. Print 2018 Oct.

Bakuła Z, Brzostek A, Borówka P, **Żaczek A**, Szulc-Kiełbik I, Podpora A, Parniewski P, Strapagiel D, Dziadek J, Proboszcz M, Bielecki J, van Ingen J, Jagielski T. 2018 Molecular typing of *Mycobacterium kansasii* using pulsed-field gel electrophoresis and a newly designer variable-number tandem repeat analysis. *Sci Rep*. 2018 Mar 13;8(1):4462. doi: 10.1038/s41598-018-21562-z.

Jagielski T, Minias A, van Ingen J, Rastogi N, Brzostek A, **Żaczek A**, Dziadek J. 2016 Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* and Other *Mycobacteria*. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Apr; 29(2):239-90. doi: 10.1128/CMR.00055-15. Review.

Dadura K, Płocińska R, Rumijowska-Galewicz A, Płociński P, **Żaczek A**, Dziadek B, Zaborowski A, Dziadek J. 2017 PdtA S Deficiency Affects Resistance of *Mycobacteria* to Ribosome Targeting Antibiotics. *Front Microbiol*. 2017 Nov 3;8:2145. doi: 10.3389/fmicb.2017.02145. eCollection 2017.

Antczak M, Plocinska R, Plocinski P, Rumijowska-Galewicz A, **Żaczek A**, Strapagiel D, and Dziadek J. 2018 The NnaR orphan response regulator is essential for the utilization of nitrate and nitrite as sole nitrogen sources in *mycobacteria*. *Sci Rep* 2018 Dec 3;8(1):17552. doi: 10.1038/s41598-018-35844-z.

Mankiewicz-Boczek J, Bednarek A, Gąła-Borowska I, Serwecinska L, Zaborowski A, Kolate E, Pawelczyk J, **Żaczek A**, Dziadek J, Zalewski M. 2017 The removal of nitrogen compounds from farming wastewater - The effect of different carbon substrates and different microbial activators. *Ecol Eng* 2017 Aug; 105:341-354. Doi: 10.1016/j.ecoleng.2017.05.014



## 6. DANE BIBLIOMETRYCZNE

Łączna punktacja, wyliczona w oparciu o IF i punktację MNiSW z roku wydania, za publikacje w czasopismach z wyłączeniem publikacji wybranych do osiągnięcia naukowego:

Suma punktów MNiSW: **279**

Impact Factor: **44,049**

Na mój dorobek naukowy składa się 15 prac oryginalnych o łącznej wartości 416 pkt MNiSW, w tym 210 jako pierwszy autor.

Sumaryczny Impact Factor prac oryginalnych wynosi 37,887, w tym 16,686 jako pierwszy autor.

Ponadto jestem współautorem publikacji przeglądowej o wartości 50 pkt MNiSW oraz Impact Factor 19,958.

Osiągnięcie naukowe stanowi 8 publikacji o łącznej wartości 190 pkt MNiSW oraz sumarycznym Impact Factor 13,796.

**Łączna punktacja:** IF = **57,845** IF<sub>5-letni</sub> = **63,588** MNiSW = **469**

Liczba cytowań wszystkich prac:

Web of Science v. 5.30 All Databases	112
w tym bez autocytowań	95
h-index	6
Web of Science v. 5.30.2 Core Collection	109
w tym bez autocytowań	92
h-index	6