

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Instytut Biologii Medycznej

Polskiej Akademii Nauk



Dariusz Stanisław Jarych

Molekularne analizy genomowe patogennych szczepów

Pseudomonas aeruginosa i Escherichia coli

Promotor rozprawy doktorskiej

Prof. dr hab. Paweł Parniewski, IBM PAN

Promotor pomocniczy

Dr inż. Marta Majchrzak

Łódź 2023

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Praca została wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Pawła Parniewskiego w Pracowni Genetyki Molekularnej, Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi.

*Badania były finansowane ze środków statutowych Instytutu Biologii Medycznej PAN oraz z minigrantu Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN nr G50: „Typowanie molekularne wybranych szczepów klinicznych *E. coli* metodą MLST”.*

Autoreferat rozprawy doktorskiej

ŻYCIORYS NAUKOWY

WYKSZTAŁCENIE:

Data uzyskania tytułu naukowego: 8 grudnia 2015 – tytuł magistra inżyniera, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej, tytuł pracy: „Targeted gene knock-out in the yeast *Pichia pastoris* using the CRISPR/Cas9 system”.

PUBLIKACJE (Σ IF=79,278; H=4):

1. Puła A, Robak P, **Jarych D**, Mikulski D, Misiewicz M, Drozd I, Fendler W, Szemraj J, Robak T. The Relationship between Serum miRNAs and Early Mortality in Multiple Myeloma Patients Treated with Bortezomib-Based Regimens. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 2;24(3):2938. doi: 10.3390/ijms24032938. PMID: 36769265; PMCID: PMC9917942. IF=6.208
2. Gajek G, Świerzek AS, **Jarych D**, Mikulski D, Kobiela P, Chojnacka K, Kufelnicka-Babout M, Szala-Poździej A, Chrzanowski J, Sobczuk K, Fendler W, Matsushita M, Domżańska-Popadiuk I, Mazela J, Kalinka J, Sekine H, Cedzyński M. Association of low ficolin-2 concentration in cord serum with respiratory distress syndrome in preterm newborns. *Front Immunol.* 2023 Jan 17;14:1107063. doi: 10.3389/fimmu.2023.1107063. PMID: 36733481; PMCID: PMC9886859. IF=8.787
3. Szala-Poździej A, Świerzek AS, Gajek G, Kufelnicka-Babout M, Chojnacka K, Kobiela P, **Jarych D**, Sobczuk K, Mazela J, Domżańska-Popadiuk I, Kalinka J, Sekine H, Matsushita M, Cedzyński M. Association of the FCN2 Gene Promoter Region Polymorphisms with Very Low Birthweight in Preterm Neonates. *Int J Mol Sci.* 2022 Dec 5;23(23):15336. doi: 10.3390/ijms232315336. PMID: 36499663; PMCID: PMC9740280. IF=6.208
4. Kania KD, Haręza D, Wilczyński JR, Wilczyński M, **Jarych D**, Malinowski A, Paradowska E. The Toll-like Receptor 4 Polymorphism Asp299Gly Is Associated with an Increased Risk of Ovarian Cancer. *Cells.* 2022 Oct 5;11(19):3137. doi: 10.3390/cells11193137. PMID: 36231099; PMCID: PMC9563956. IF=7.666
5. Mikulski D, Robak P, Perdas E, Węglowska E, Łosiewicz A, Drózd I, **Jarych D**, Misiewicz M, Szemraj J, Fendler W, Robak T. Pretreatment Serum Levels of IL-1 Receptor Antagonist and IL-4 Are Predictors of Overall Survival in Multiple Myeloma Patients Treated with Bortezomib. *J Clin Med.* 2021 Dec 26;11(1):112. doi: 10.3390/jcm11010112. PMID: 35011853; PMCID: PMC8745099. IF= 4.964
6. Świerzek AS, **Jarych D**, Gajek G, Chojnacka K, Kobiela P, Kufelnicka-Babout M, Michalski M, Sobczuk K, Szala-Poździej A, Matsushita M, Mazela J, Domżańska-Popadiuk I, Kilpatrick DC, Kalinka J, Sekine H, Cedzyński M. Polymorphisms of the FCN2 Gene 3'UTR Region and Their Clinical Associations in Preterm Newborns. *Front Immunol.* 2021 Oct 28;12:741140. doi: 10.3389/fimmu.2021.741140. PMID: 34777352; PMCID: PMC8581395. IF = 8.787
7. Robak P, Szemraj J, Mikulski D, Drozd I, Juszcak K, **Jarych D**, Misiewicz M, Kościelny K, Fendler W, Robak T. Prognostic Value of Resistance Proteins in Plasma Cells from Multiple Myeloma Patients Treated with Bortezomib-Based Regimens. *J Clin Med.* 2021 Oct 28;10(21):5028. doi: 10.3390/jcm10215028. PMID: 34768548; PMCID: PMC8584776. IF= 4.964
8. **Jarych D**, Augustynowicz-Kopec E, Iwanska A, Parniewski P, Majchrzak M. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Sci Rep.* 2021 Jul 29;11(1):15460. doi: 10.1038/s41598-021-95034-2. PMID: 34326452; PMCID: PMC8322141. IF = 4.997
9. Robak P, **Jarych D**, Mikulski D, Drózd I, Węglowska E, Kotkowska A, Misiewicz M, Smolewski P, Stawiski K, Fendler W, Szemraj J, Robak T. The Prognostic Value of Whole-Blood PSMB5, CXCR4, POMP, and RPL5 mRNA Expression in Patients with Multiple Myeloma Treated with

Autoreferat rozprawy doktorskiej

- Bortezomib. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 25;13(5):951. doi: 10.3390/cancers13050951. PMID: 33668794; PMCID: PMC7956525. IF= 6.575
10. Katarzyna Boguszewska-Byczkiewicz, **Dariusz Jarych**, Izabela Drózdź, Hamed Hamed Al Huwaidi, Izabela Zawlik, Agnieszka Kołacińska. A comparison of four commercial kits used for isolating circulating cell-free DNA: QuickGeneMINI8L (Kurabo), Maxwell RSC cfDNA Plasma Kit (Promega), cfKapture 21 Kit (MagBio), and QIAamp MinElute ccfDNA Kit (Qiagen). *Medical Research Journal*. 2020;5:92-99. doi:10.5603/mrj.a2020.0021. 100 pkt MEiN
 11. Robak P, Drózdź I, **Jarych D**, Mikulski D, Węglowska E, Siemieniuk-Ryś M, Misiewicz M, Stawiski K, Fendler W, Szemraj J, Smolewski P, Robak T. The Value of Serum MicroRNA Expression Signature in Predicting Refractoriness to Bortezomib-Based Therapy in Multiple Myeloma Patients. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 9;12(9):2569. doi: 10.3390/cancers12092569. PMID: 32916955; PMCID: PMC7565855. IF= 6.639
 12. Robak P, Węglowska E, Drózdź I, Mikulski D, **Jarych D**, Ferlińska M, Wawrzyniak E, Misiewicz M, Smolewski P, Fendler W, Szemraj J, Robak T. Cytokine and Chemokine Profile in Patients with Multiple Myeloma Treated with Bortezomib. *Mediators Inflamm*. 2020 Jun 6;2020:1835836. doi: 10.1155/2020/1835836. PMID: 32587468; PMCID: PMC7294367. IF = 4.711
 13. Majchrzak M, Kubiak-Szeligowska AB, **Jarych D**, Parniewski P. Numerical interpretation of TRS-PCR profiling results for *Escherichia coli* strains isolated from patients with bacteriuria in Lodz region, Poland. *Mol Biol Rep*. 2019 Oct;46(5):5543-5553. doi: 10.1007/s11033-019-04932-2. Epub 2019 Jun 25. PMID: 31240528. IF= 1.402
 14. Adamus-Białek W, Wawszczak M, Arabski M, Majchrzak M, Gulba M, **Jarych D**, Parniewski P, Głuszek S. Ciprofloxacin, amoxicillin, and aminoglycosides stimulate genetic and phenotypic changes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Virulence*. 2019 Dec;10(1):260-276. doi: 10.1080/21505594.2019.1596507. PMID: 30938219; PMCID: PMC6527016. IF = 5.542
 15. Kubiak-Szeligowska AB, Bartnicka M, **Jarych D**, Majchrzak M. TRS-PCR profiling for discrimination of *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea under 5 years of age in Lodz region, Poland. *Mol Biol Rep*. 2016 Sep;43(9):871-80. doi: 10.1007/s11033-016-4031-x. Epub 2016 Jul 7. PMID: 27389591; PMCID: PMC4990611. IF=1.828

KOMUNIKATY I DONIESIENIA ZJAZDOWE:

1. **D. Jarych**, K. D. Kania, E. Jabłonowska, K. Wójcik-Cichy, E. Paradowska. "RIG-I-like receptor gene polymorphisms in patients hospitalized due to COVID-19". 18th European Congress of Virology. 04.05.2023-07.05.2023. Gdańsk, Polska
2. K. D. Kania, D. A. Haręża, **D. Jarych**, E. Jabłonowska, K. Wójcik-Cichy, E. Paradowska. "Frequency of TLR3, 7 and 8 gene polymorphisms in patients with moderate and severe COVID-19". 18th European Congress of Virology. 04.05.2023-07.05.2023. Gdańsk, Polska
3. E. Paradowska, **D. Jarych**, K. Wójcik-Cichy, M. Borowiec, K. D. Kania, D. A. Haręża, D. Izabela, T. Płoszaj, D. Strapagiel, J. Dziadek, E. Jabłonowska. "Cytokine profiles in patients with mild and severe COVID-19". 18th European Congress of Virology. 04.05.2023-07.05.2023. Gdańsk, Polska
4. D. A. Haręża, K. D. Kania, M. Wilczyński, J. R. Wilczyński, **D. Jarych**, E. Paradowska. "A single-nucleotide polymorphism in TLR9 is associated with a risk of ovarian cancer and higher CMV viraemia". 18th European Congress of Virology. 04.05.2023-07.05.2023. Gdańsk, Polska
5. Katarzyna D. Kania, Daria Haręża, **Dariusz Jarych**, Jacek R. Wilczyński, Miłosz Wilczyński, Andrzej Malinowski, Edyta Paradowska. "TLR Polymorphism and HPV Infection in Patients with Ovarian Cancer." 35th International Papillomavirus Conference, 17.04.2023-21.04.2023. Washington D.C., USA.

Autoreferat rozprawy doktorskiej

6. Edyta Paradowska, Daria Haręża, Katarzyna D. Kania, **Dariusz Jarych**, Miłosz Wilczyński, Andrzej Malinowski, Monika Kawecka, Jacek R. Wilczyński. "A Prevalence of Human Papillomavirus, Cytomegalovirus and Epstein-Barr Infections in Ovarian Cancer Patients." 35th International Papillomavirus Conference, 17.04.2023-21.04.2023. Washington D.C., USA.
7. Magdalena Czemerska, Aneta Wiśnik, **Dariusz Jarych**, Izabela Zawlik, Piotr Strzałka, Kinga Krawiec, Agnieszka Pluta, Barbara Cebula-Obrzut, Agata Majchrzak, Marcin Kozłowski, Agnieszka Wierzbowska. „MiR-199-5p as prognostic factor in intensively treated AML patients.” 64th ASH Annual Meeting & Exposition. 10.12.2022-13.12.2022. Nowy Orlean, USA.
8. **Dariusz Jarych**, Ewelina Perdas, Damian Mikulski, Miłosz Wilczyński, Jacek R. Wilczyński, Wojciech Fendler, Katarzyna D. Kania, Daria Haręża, Andrzej Malinowski, Edyta Paradowska. „HPV-related miRNA expression in ovarian cancer.” Polski Kongres Genetyki. 27.06.2022-30.06.2022. Kraków, Polska
9. Anna Puła, Paweł Robak, **Dariusz Jarych**, Damian Mikulski, Izabela Dróżdż, Janusz Szemraj, Tadeusz Robak. „A circulating serum miRNAs-based model to predict early mortality in multiple myeloma patients treated with bortezomib-based regimens.” European Hematology Association - EHA2022 Hybrid Congress. 09.06.2022-12.06.2022, Vienna, Austria.
10. Daria A. Haręża, **Dariusz Jarych**, Katarzyna D. Kania. “Zastosowanie emulsyjnego PCR do wykrywania i oceny ilościowej DNA ludzkiego wirusa brodawczaka typu 16”. XIV Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2022. 24.03.2022-27.03.2022. Lublin, Polska.
11. Paradowska E., **Jarych D.**, Borowiec M., Kania K. D., Wójcik-Cichy K., Strapagiel D., Dziadek J., Jabłonowska E. „Analiza ekspresji cytokin u osób zakażonych SARS-CoV-2.” XXIX ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. 15-17 września 2022, Warszawa, Polska
12. Daria A. Haręża, Katarzyna D. Kania, **Dariusz Jarych**, Miłosz Wilczyński, Jacek R. Wilczyński, Andrzej Malinowski, Edyta Paradowska. „Zakażenia wirusowe w guzach i strzępkach jajowodów u kobiet z rakiem jajnika.” XXIX ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. 15.09.2022-17.09.2022, Warszawa, Polska
13. Daria A. Haręża, Katarzyna D. Kania, **Dariusz Jarych**, Miłosz Wilczyński, Jacek R. Wilczyński, Andrzej Malinowski, Edyta Paradowska. „Zwiększone ryzyko zakażenia HPV w raku jajnika u homozygoty recesywnych względem w zakresie polimorfizmu TLR4 THR399ILE.”. XXIX ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. 15.09.2022-17.09.2022, Warszawa, Polska
14. Katarzyna D. Kania, Daria A. Haręża, **Dariusz Jarych**, Miłosz Wilczyński, Jacek R. Wilczyński, Andrzej Malinowski, Edyta Paradowska. „Wariant heterozygotyczny w zakresie polimorfizmu TLR4 ASP299GLY zwiększa ryzyko zachorowania na raka jajnika.” XXIX ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. 15.09.2022-17.09.2022, Warszawa, Polska
15. E. Paradowska, K. Kania, D. Haręża, M. Kawecka, **D. Jarych**, M. Wilczyński, A. Malinowski, J. Wilczyński. “Detection of HPV16 in ovarian cancer and fallopian tube specimens.” 15.11.2021 – 19.11.2021 – 34th International Papillomavirus Conference - IPVC 2021
16. Damian Mikulski, Paweł Robak, Izabela Dróżdż, Małgorzata Misiewicz, **Dariusz Jarych**, Piotr Smolewski, Wojciech Fendler, Janusz Szemraj, Tadeusz Robak. “Pretreatment serum IL-13 influence outcome in multiple myeloma patients treated with bortezomib- a pilot study.” 02/09/2021 – 03/09/2021 – XXIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów
17. Roland Prielhofer, Juanjo Barrero, Stefanie Steuer, Richard Zahr, Kristin Baumann, Lina Heisteringer, **Dariusz Jarych**, Franz Zehetbauer, Matthias Mattanovich, Matthias Steiger, Hans Marx, Michael Sauer, Diethard Mattanovich, Brigitte Gasser, “Synthetic biology toolbox and application for recombinant protein production in Pichia pastoris: Golden Gate cloning and CRISPR/Cas9.”, Pichia Conference, 03.04.2016-06.04.2016. Antalya, Turcja.

Autoreferat rozprawy doktorskiej

UDZIAŁ W PROJEKTACH BADAWCZYCH:

1. Projekt NCN OPUS nr 2020/37/B/NZ6/04037. „Przebieg choroby COVID-19 w aspekcie odpowiedzi odpornościowej oraz zmienności genetycznej gospodarza i SARS-CoV-2.” 01/02/2021 – OBECNIE. Kierownik projektu: dr hab. Edyta Paradowska, prof. IBM PAN
2. Projekt NCN OPUS nr 2019/33/B/NZ7/02872. „Badania mechanizmów molekularnych związanych z zakażeniami HPV i CMV w patogenezie raka jajnika.” 01/10/2020 – OBECNIE. Kierownik projektu: dr hab. Edyta Paradowska, prof. IBM PAN
3. Projekt NCN OPUS nr 2016/23/B/NZ5/02529. „Ocena pierwotnych i wtórnych zaburzeń molekularnych warunkujących oporność na leki z grupy inhibitorów proteasomu (bortezomib, carfilzomib) i innych leków przeciwszpiczakowych u chorych na szpiczaka plazmocytoowego.” 01/10/2017 – 31/12/2021. Kierownik projektu: Prof. Tadeusz Robak
4. Projekt NCN OPUS nr 2015/17/B/NZ6/04250. „Uwarunkowane genetycznie i regulowane epigenetycznie niedobory fikoliny-2 w podatności na zakażenia noworodków urodzonych przedwcześnie.” 13/07/2016 – 12/07/2021. Kierownik projektu: Prof. Anna Świerzko

Autoreferat rozprawy doktorskiej

WPROWADZENIE

Epidemiologia molekularna stanowi naukę zajmującą się badaniem chorób zakaźnych w odniesieniu do wybranych cech genetycznych drobnoustroju, który powoduje zakażenia u gospodarza. Molekularne badania epidemiologiczne pomagają zrozumieć mechanizmy oddziaływania między gospodarzem i patogenem, a także określić czynniki wirulencji, pokrewieństwo filogenetyczne i szlaki transmisji drobnoustrojów patogennych. Wśród bakterii Gram-ujemnych, istotne zagrożenie stanowią pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym pałeczki *Escherichia coli* oraz wielolekooporne szczepy *Pseudomonas aeruginosa*. Wśród metod typowania drobnoustrojów, znajdujących zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej, wyróżnić można metody oparte na analizie cech fenotypowych oraz materiału genetycznego mikroorganizmów. Metody genotypowe znalazły zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej oraz badaniach epidemiologicznych. Zastąpienie metod fenotypowych metodami molekularnymi, m.in. opartymi na reakcji PCR, do charakteryzowania izolatów klinicznych, pozwoliło na skrócenie czasu wykonywania analiz, często również na zmniejszenie ich kosztów i pracochłonności. Pozwoliło to także na badanie mikroorganizmów, których hodowla laboratoryjna jest utrudniona lub niemożliwa.

ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

1. Ulepszenie metodyki różnicowania patogennych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* techniką TRS-PCR.
2. Porównanie nowej metodyki TRS-PCR z metodą VNTR-MLVA dla szczepów *Pseudomonas aeruginosa* oraz z metodą MLST dla szczepów *Escherichia coli*.

ZNACZENIE PROWADZONYCH BADAŃ

Patogenne szczepy *P. aeruginosa* i *E. coli* mogą wywoływać zakażenia prowadzące do przedłużonego leczenia, jak również do zgonów, zwłaszcza u pacjentów hospitalizowanych. Istotne jest zatem poznanie źródeł zakażeń oraz szlaków rozprzestrzeniania się infekcji, a także monitorowanie różnorodności szczepów, zarówno u pacjentów, jak i w środowisku. Diagnostyka medyczna w zakażeniach mikrobiologicznych ma na celu wykrycie czynnika wywołującego chorobę zakaźną, bądź będącego przyczyną bezobjawowego nosicielstwa, co jest istotne w zapobieganiu szerzenia się zakażeń. W przypadku zakażeń bakteryjnych istotnym celem badania mikrobiologicznego jest także ustalenie wrażliwości patogenu na leki przeciwdrobnoustrojowe, ponieważ niewłaściwa kwalifikacja mikrobiologiczna może w konsekwencji prowadzić do podjęcia niewłaściwego leczenia. Natomiast w badaniach

Autoreferat rozprawy doktorskiej

epidemiologicznych istotne jest również określanie pokrewieństwa genetycznego w obrębie gatunku i różnicowania wewnątrzgatunkowego, gdzie zastosowanie znalazły metody molekularne. Istnieje potrzeba poszukiwania metod molekularnych charakteryzujących się niskim kosztem, łatwością w przeprowadzeniu doświadczeń i wysoką powtarzalnością wyników, pozwalających na dokładną identyfikację drobnoustrojów na poziomie szczepu. Duża zmienność szczepów bakteryjnych odgrywa ważną rolę w rozprzestrzenianiu się organizmów opornych na antybiotyki, zdolnych do powodowania zakażeń trudnych do wyleczenia, co łączy się z wysoką zachorowalnością i śmiertelnością. Dlatego też istotne jest wprowadzanie ulepszeń do metod już istniejących i proponowanie nowych rozwiązań dla dochodzeń epidemiologicznych.

MATERIAŁ DO BADAŃ

Jako materiał biologiczny w prowadzonych badaniach wykorzystano kolekcje patogennych szczepów klinicznych *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Szczepy kliniczne E. coli

W pracy wykorzystano 124 szczepy kliniczne UPEC wyizolowane w latach 2005-2006 z moczu pacjentów Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego Nr 2 im. Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi. Dodatkowo, w typowaniu molekularnym metodą MLST uwzględniono 8 szczepów klinicznych STEC, posiadających wyspę patogenności LEE, otrzymanych z Center for Molecular Biology of Inflammation – ZMBE, Institute of Infectiology, Münster w Niemczech w latach 2011-2012.

Szczepy kliniczne P. aeruginosa

Sześćdziesiąt trzy izolaty *P. aeruginosa* pozyskano w latach 2012-2019 od ośmiu pacjentów z Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Wszystkie szczepy kliniczne pochodziły od dorosłych pacjentów (≥ 18 lat) z mukowiscydozą i były pobierane w szpitalu podczas kolejnych infekcji.

GLÓWNE METODY BADAWCZE

Trinucleotide Repeat Sequences-based PCR, TRS-PCR

Metoda TRS-PCR opiera się na obecności w genomach bakterii rozproszonych, powtarzających się, mikrosatelitarnych, trójnukleotydowych sekwencji różniących się liczbą kopii i rozmieszczeniem w genomach. W metodzie TRS-PCR wykorzystuje się pojedyncze

Autoreferat rozprawy doktorskiej

startery określonego typu, np. $N_6(CTG)_4$, które są komplementarne do odpowiednich regionów w badanym genomie. Startery te umożliwiają amplifikację fragmentów DNA położonych pomiędzy trójnukleotydowymi sekwencjami od końca 5' na obu niciach DNA. Powstałe podczas amplifikacji fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie, a uzyskany układ prążków DNA na żelu jest charakterystyczny dla różnych szczepów bakterii. Metoda TRS-PCR należy do metod określanych jako PCR fingerprinting, których zasada różnicowania polega na powielaniu polimorficznych regionów DNA metodą PCR.

Multi-Locus Sequence Typing, MLST

Metoda MLST polega na sekwencjonowaniu sześciu bądź siedmiu genów niezbędnych do utrzymania metabolizmu komórkowego (tzw. geny „housekeeping”, które uważane są za reprezentatywne dla całego genomu), a następnie identyfikacji szczepów mikroorganizmów na podstawie różnic w sekwencjach tych genów. Zazwyczaj sekwencjonowaniu podlegają określone dla danego mikroorganizmu regiony o długości 450 – 500 pz. W celu przeprowadzenia analiz wykorzystywane są globalne bazy danych sekwencji i typów sekwencyjnych (ang. *sequence type, ST*).

Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) Analysis (MLVA)

Metoda MLVA jest techniką molekularną typowania mikroorganizmów w oparciu o obecność w genomach bakteryjnych regionów DNA o zmiennej liczbie powtórzeń tandemowych (ang. *Variable Number Tandem Repeats, VNTR*). Sekwencje VNTR stanowią powtarzające się sekwencje nukleotydowe, których liczba w danym regionie VNTR jest indywidualną cechą mikroorganizmu. Analiza MLVA wykorzystuje PCR do amplifikacji fragmentów VNTR, zawierających powtórzenia tandemowe obecne w chromosomie bakteryjnym. Długość amplifikowanego produktu określa się za pomocą elektroforezy żelowej lub elektroforezy kapilarnej o wysokiej rozdzielczości i stanowi podstawę do wyznaczenia liczby powtórzeń tandemowych dla badanych alleli. Polimorfizmy w sekwencjach genów skutkują zmienną liczbą powtórzeń tandemowych, co stanowi podstawę porównań między szczepami. Zestawy alleli, z kilku powtarzających się regionów, wykorzystuje się do identyfikacji nowych grup klonalnych, lub już istniejących, umieszczonych w publicznych bazach danych.

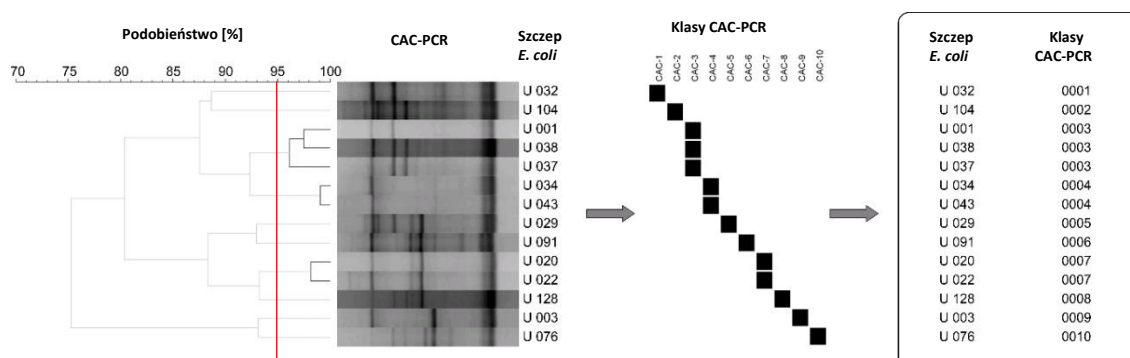
WYNIKI I DYSKUSJA

Celem niniejszej rozprawy było ulepszenie metodyki różnicowania patogennych szczepów *P. aeruginosa* i *E. coli* z wykorzystaniem techniki TRS-PCR, oraz porównanie nowej metodyki TRS-PCR z metodą MLST dla szczepów *E. coli* oraz z metodą VNTR-MLVA dla szczepów *P. aeruginosa*.

W pierwszej kolejności przeprowadzono badania, które pozwoliły na opracowanie i oszacowanie użyteczności dodatkowego, do już stosowanych [1,2], testu TRS-PCR z wykorzystaniem startera $N_6(CAC)_4$ w różnicowaniu uropatogennych szczepów *E. coli*. Biorąc pod uwagę wysoką powtarzalność tej metody, identyczną, jak dla testu GTG-PCR, jednakże mniejszą niż dla CGG-PCR, metoda CAC-PCR pozwoliła pogrupować 124 badane szczepy UPEC w 52 unikalne klastry.

Przeprowadzona dla izolatów UPEC uśredniona analiza profili prążkowych w oparciu o trzy testy TRS-PCR, pozwoliła na ocenę ich potencjału różnicującego. Biorąc pod uwagę wyznaczoną wysoką wartość współczynnika powtarzalności wynoszącą 95 %, otrzymano 111 unikalnych szczepów spośród 124 badanych izolatów UPEC. Wskazuje to na wysoką efektywność różnicowania szczepów UPEC z zastosowaniem uśrednionej analizy profili prążkowych w oparciu o wyżej wymienione testy TRS-PCR.

Metodykę analiz profili prążkowych TRS-PCR ulepszono, wprowadzając numeryczną klasyfikację dla identycznych profili, uzyskiwanych w poszczególnych testach TRS-PCR. Za identyczne uznano profile, o podobieństwie powyżej obliczonej wartości powtarzalności. (Rysunek Nr 1).



Rysunek Nr 1. Schemat przedstawiający przypisanie klas numerycznych, na przykładzie CAC-PCR (każdemu unikalnemu profilowi przypisano numer klasy — dla zaprezentowanych 14 szczepów przypisano 10 klas CAC); opracowano na podstawie Majchrzak M. i wsp., 2019 [3].

Autoreferat rozprawy doktorskiej

Nowa metoda TRS-PCR została zastosowana do różnicowania kolekcji uropatogennych szczepów klinicznych *E. coli*, w wyniku której otrzymano 52 klasy CAC-PCR, 86 klasy GTG-PCR i 99 klas CGG-PCR. Spośród powyższych technik, opracowana w tej pracy metoda CAC-PCR cechowała się najmniejszą zdolnością do różnicowania genetycznego badanych szczepów. Następnie, każdy izolat *E. coli* posiadający unikalny profil numeryczny poszczególnych klas TRS-PCR (CAC-, GTG- i CGG-PCR), został przyporządkowany do osobnej grupy TRS-PCR. Takie podejście do interpretacji wyników pozwoliło na zróżnicowanie 121 unikalnych szczepów, różniących się co najmniej w jednej klasie, spośród 124 badanych izolatów *E. coli*. Ulepszona metodyka TRS-PCR posiada zatem większą zdolność różnicowania szczepów niż uśredniona analiza porównania profili prążkowych z trzech testów TRS-PCR, na co wskazują obliczone wartości współczynników różnicowania DI [4] (Tabela Nr 1).

Tabela Nr 1. Porównanie wartości współczynników różnicowania (DI) metod wykorzystywanych w typowaniu kolekcji szczepów UPEC.

Gatunek bakterii	<i>Escherichia coli</i>				
Zastosowana metoda	CAC-PCR	GTG-PCR	CGG-PCR	Uśredniona analiza porównania podobieństwa profili prążkowych TRS-PCR	Numeryczny system klasyfikacji TRS-PCR
Indeks różnicowania (DI)	0,9462	0,989	0,9946	0,9979	0,9996

Przeprowadzona następnie analiza porównawcza dla kilku wybranych szczepów UPEC i STEC, przy użyciu dwóch różnych technik typowania molekularnego: w oparciu o metodę numerycznego systemu nadawania klas i grup TRS-PCR, oraz metodę MLST [5], dostarczyła wyników różnicujących szczepy *E. coli* w sposób podobny do tych, uzyskanych w wyniku analizy MLST. Uzyskane wyniki sugerują, że metoda TRS-PCR pozwala na różnicowanie szczepów, które są identyczne, zgodnie z metodą MLST, tzn. wykazały zróżnicowanie niektórych szczepów o identycznych profilach ST.

W niniejszej pracy po raz pierwszy sprawdzono użyteczność metodyki porównywania profili prążkowych CGG- i GTC-PCR do określania genetycznego zróżnicowania patogennej kolekcji klinicznych szczepów *P. aeruginosa*, wyizolowanych od pacjentów z mukowiscydozą [6]. Wyznaczone wartości współczynników powtarzalności przeprowadzonych analiz dla obu testów TRS-PCR były na bardzo wysokim i zbliżonym poziomie, jednak test CGG-PCR wykazał większy potencjał różnicujący, niż GTC-PCR. Następnie przeprowadzono uśrednioną analizę podobieństwa otrzymanych profili prążkowych dla obu testów TRS-PCR, która

Autoreferat rozprawy doktorskiej

pozwoili na przyporządkowanie 63 badanych szczepów *P. aeruginosa* do 26 klastrów. W kolejnym etapie, badanym szczepom przypisano numery klas CGG- i GTC-PCR, a szczepy *P. aeruginosa* o wzorach profili prążkowych o podobieństwie powyżej wartości powtarzalności dla obu testów CGG- i GTC-PCR, traktowano jako identyczne. Na podstawie nadanego profilu dla poszczególnych klas TRS-PCR, badane szczepy zakwalifikowano do 40 grup TRS-PCR, różniących się przynajmniej w jednej klasie TRS-PCR. W ten sposób wyodrębniono 25 pojedynczych grup TRS-PCR oraz 15 kompleksów, do których przyporządkowano dwa, bądź więcej izolatów *P. aeruginosa*.

W dalszej części pracy doktorskiej, wyniki różnicowania badanej kolekcji szczepów *P. aeruginosa* z wykorzystaniem systemu numerycznego TRS-PCR, porównano z wynikami analizy VNTR-MLVA [7]. Określono 26 grup MLVA dla 63 izolatów *P. aeruginosa*, posiadających unikalny profil VNTR. Na podstawie grup MLVA zostały nadane numery szczepów, bądź ich wariantów dla poszczególnych pacjentów. Analizę tę poszerzono, biorąc dodatkowo pod uwagę określone wartości numeryczne grup TRS-PCR. Pozwoliło to na dalsze zróżnicowanie kolekcji szczepów *P. aeruginosa*. Porównując powyższe metody, przypisanie numerycznych klas i grup TRS-PCR silniej różnicuje izolaty kliniczne w porównaniu do VNTR-MLVA, na co wskazują również obliczone wartości współczynnika Wallace'a [8], oraz wartości współczynników różnicowania DI (Tabela Nr 2).

Tabela Nr 2. Porównanie wartości współczynników różnicowania (DI) metod wykorzystywanych w typowaniu kolekcji szczepów *P. aeruginosa*.

Gatunek bakterii	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
Zastosowana metoda	CGG-PCR	GTC-PCR	Uśredniona analiza porównania podobieństwa profili prążkowych TRS-PCR	Numeryczny system klasyfikacji TRS-PCR	MLVA	MLVA+numeryczny system klasyfikacji TRS-PCR
Indeks różnicowania (DI)	0,9611	0,7967	0,9544	0,9831	0,9478	0,9867

WNIOSKI:

1. Różnicowanie klinicznych szczepów *Escherichia coli* w oparciu o numeryczny system nadawania klas i grup TRS-PCR wykazuje większą zdolność różnicowania izolatów niż klasyczna analiza podobieństwa profili prążkowych.
2. Wstępna analiza szczepów *Escherichia coli* z wykorzystaniem uzupełniających się badań: MLST i numerycznego systemu klasyfikacji TRS-PCR, wydaje się być skuteczną i silnie różnicującą metodą, która może być stosowana do typowania molekularnego tych bakterii.
3. Różnicowanie klinicznych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* w oparciu o numeryczny system nadawania klas i grup TRS-PCR wykazuje większą zdolność różnicowania izolatów, niż klasyczna analiza podobieństwa profili prążkowych.
4. Numeryczny system klasyfikacji TRS-PCR wykazuje większą siłę różnicowania niż metoda VNTR-MLVA w analizie szczepów *Pseudomonas aeruginosa* i pozwala na rozróżnienie izolatów identycznych w schemacie VNTR-MLVA.
5. Analiza szczepów *Pseudomonas aeruginosa* z wykorzystaniem uzupełniających się badań: VNTR-MLVA i numerycznego systemu klasyfikacji TRS-PCR, stanowi skuteczną i silnie różnicującą metodę, która może być z powodzeniem stosowana do typowania molekularnego tych bakterii.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Adamus-Bialek W, Wojtasik A, Majchrzak M, Sosnowski M, Parniewski P (2009) (CGG)₄-based PCR as a novel tool for discrimination of uropathogenic *Escherichia coli* strains: comparison with enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J Clin Microbiol* 47:3937–3944. <https://doi.org/10.1128/JCM.01036-09>
- [2] Kubiak-Szeligowska AB, Bartnicka M, Jarych D, Majchrzak M (2016) TRS-PCR profiling for discrimination of *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea under 5 years of age in Lodz region. *Poland Mol Biol Rep* 43:871–880. <https://doi.org/10.1007/s11033-016-4031-x>
- [3] M. Majchrzak, A. B. Kubiak-Szeligowska, D. Jarych, i P. Parniewski, „Numerical interpretation of TRS-PCR profiling results for *Escherichia coli* strains isolated from patients with bacteriuria in Lodz region, Poland”, *Mol Biol Rep*, t. 46, nr 5, s. 5543–5553, paź. 2019, doi: 10.1007/s11033-019-04932-2.
- [4] P. R. Hunter i M. A. Gaston, „Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson’s index of diversity”, *J Clin Microbiol*, t. 26, nr 11, s. 2465–2466, lis. 1988, doi: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.
- [5] T. Wirth i in., „Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective”, *Mol Microbiol*, t. 60, nr 5, s. 1136–1151, cze. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.
- [6] Jarych D, Augustynowicz-Kopec E, Iwanska A, Parniewski P, Majchrzak M. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Sci Rep*. 2021 Jul 29;11(1):15460. doi: 10.1038/s41598-021-95034-2
- [7] J. F. Turton, S. E. Turton, L. Yearwood, S. Yarde, M. E. Kaufmann, i T. L. Pitt, „Evaluation of a nine-locus variable-number tandem-repeat scheme for typing of *Pseudomonas aeruginosa*”, *Clinical Microbiology and Infection*, t. 16, nr 8, s. 1111–1116, sie. 2010, doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03049.x.
- [8] D. L. Wallace, „A Method for Comparing Two Hierarchical Clusterings: Comment”, *Journal of the American Statistical Association*, t. 78, nr 383, s. 569, wrz. 1983, doi: 10.2307/2288118.