



**SZKOŁA DOKTORSKA
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego
i Instytutów Polskiej
Akademii Nauk w Łodzi



Lidia Fiedorowicz

Praca doktorska:

**Znaczenie zmienności genetycznej
i fenotypowej *Mycobacterium
tuberculosis* w procesie transmisji
gruźlicy**

Doctoral thesis:

**The importance of genetic
and phenotypic variance
of *Mycobacterium tuberculosis*
in tuberculosis transmission**

- Promotor/Supervisor
prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Instytut Biologii Medycznej
Polska Akademia Nauk
- Promotor pomocniczy/Assistant Supervisor
dr Alina Minias
Instytut Biologii Medycznej
Polska Akademia Nauk

Praca doktorska powstała w procesie kształcenia w **Szkole Doktorskiej BioMedChem Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów Polskiej Akademii Nauk w Łodzi**. Badania zawarte w niniejszej pracy doktorskiej były przeprowadzone w **Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauki w Łodzi oraz Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie** w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki, OPUS 18 o numerze 2019/35/B/NZ7/00942 pt.: „Czynniki *Mycobacterium tuberculosis* wpływające na częstość transmisji gruźlicy” dla prof. dr hab. Ewy Augustynowicz-Kopec.



Wykształcenie

- **2017 – 2019: magister mikrobiologii ze specjalizacją w mikrobiologii medycznej, immunologii i diagnostyce laboratoryjnej**

Katedra Mikrobiologii Molekularnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki we współpracy z Instytutem Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, Łódź, Polska
promotor pracy: dr. hab. Katarzyna Dzitko, prof. UŁ; prof. dr. hab. Jarosław Dziadek
tytuł pracy: „Genetyczny model prątków gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis* umożliwiający określenie roli wybranych mutacji punktowych w genie *rpoB*”

- **2014 – 2017: licencjat mikrobiologii**

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska
promotor pracy: dr. hab. Marek Fol, prof. UŁ
tytuł pracy: „Autofagia - krótka charakterystyka procesu z uwzględnieniem roli w zakażeniach *Mycobacterium tuberculosis*”

Wykaz osiągnięć

Publikacje zawierające wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej:

- Minias A., **Fiedorowicz L.**, Kozińska M., Zabost A. *et al.* *Local transmission of M. tuberculosis strains in Poland in years 2003-2020*. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease – praca w recenzji
- **Żukowska L.**, Zygała-Pytlos D., Zabost A. *et al.* *An overview of tuberculosis outbreaks reported in the years 2011-2020*. BMC Infectious Diseases 23 (2022). 10.1186/s12879-023-08197-w (100 pkt MNiSW; IF = 3,7)

Pozostałe publikacje:

- Bednarska-Szczepaniak K., Ebenryter-Olbińska K., Gajek G., Śmiatkowski K., Suwara J., **Fiedorowicz L.** *et al.* *Synthesis of DNA-Boron Cluster Composites and Assembly into Functional Nanoparticles with Dual, Anti-EGFR, and Anti-c-MYC Oncogene Silencing Activity*. Chemistry - A European Journal 30(14):e202303531 (2024). 10.1002/chem.202303531 (140 pkt MNiSW; IF = 5,0)
- Leung W., Baxley R., Traband E., Chang Y., Rogers C., Wang L., Durrett W., Bromley K., **Fiedorowicz L.** *et al.* *FANCD2-dependent mitotic DNA synthesis relies on PCNA K164 ubiquitination*. Cell Reports 42, 113523 (2023). 10.1016/j.celrep.2023.113523 (200 pkt MNiSW; IF = 7,5)
- Brzostek A., Gąsior F., Lach J., **Żukowska L.** *et al.* *ATP-Dependent Ligases and AEP Primases Affect the Profile and Frequency of Mutations in Mycobacteria under Oxidative Stress*. Genes 12(4):547 (2021). 10.3390/genes12040547 (100 pkt MNiSW; IF = 4,1)
- Minias A., **Żukowska L.**, Lechowicz E. *et al.* *Early Drug Development and Evaluation of Putative Antitubercular Compounds in the -Omics Era*. Front. Microbiol. 11, 618168 (2021). 10.3389/fmicb.2020.618168 (100 pkt MNiSW; IF = 4,0)
- Minias A., **Żukowska L.**, Lach J. *et al.* *Subspecies-specific sequence detection for differentiation of Mycobacterium abscessus complex*. Sci Rep 10, 16415 (2020). doi.org/10.1038/s41598-020-73607-x (140 pkt MNiSW; IF = 4,4)

Doniesienia konferencyjne

- 28 – 30/11/2022 Pasteur Jubilee Conference, Warszawa, Polska (konferencja międzynarodowa – poster); tytuł *“Comparison of phenotypic and molecular drug resistance testing of Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Poland”*; autorzy: **Żukowska L.**, Lach J., Strapagiel D., Zabost A., Kozińska M., Augustynowicz-Kopeć E., Minias A., Dziadek J.
- 5 – 9/09/2022 European respiratory science conference, Barcelona, Hiszpania (konferencja międzynarodowa – poster współautorstwo); tytuł *“Mutagenesis system for testing single point mutations in rpoB in Mycobacterium tuberculosis”*; autorzy: Olejniczak A., Saktiawati A., **Żukowska L.**, Dziadek J., Minas A.
- 27 – 30/06/2022 IV Polski Kongres Gentyki, Kraków, Polska (konferencja narodowa – poster); tytuł *“The search for Mycobacterium tuberculosis factors affecting the frequency of tuberculosis transmission”*; autorzy: **Żukowska L.**, Lach J., Strapagiel D., Augustynowicz-Kopeć E., Dziadek J., Minias A.
- 28 – 29/06/2021 The 41st Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology (konferencja międzynarodowa online – poster); tytuł: *“Mycobacterium tuberculosis lineages involved in outbreaks worldwide”*; autorzy: **Żukowska L.**, Minias A., Zygata D., Dziadek J.

Nagrody

- 2024 Medal *Universitas Lodzensis Alumno Laude Dignissimo* dla osób studiujących i doktoryzujących się za działalność na rzecz i dla dobra Uniwersytetu Łódzkiego

Wstęp

Gruźlica jest chorobą zakaźną wywoływaną przez patogen wewnątrzkomórkowy *Mycobacterium tuberculosis* (pl. prątka gruźlicy). Gruźlica jest wciąż poważnym problemem dla zdrowia publicznego; według Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) na gruźlicę co roku zapada około 10 milionów osób – 10,8 milionów w 2023, 10,7 mln w 2022 i 10,4 mln w 2021. Z kolei umiera około 1 mln osób – 1,25 mln w 2023, 1,3 mln w 2022 i 1,4 w 2021. Tak wysokie liczby plasują gruźlicę na pierwszym miejscu najbardziej śmiertelnych chorób zakaźnych na świecie ¹. Gruźlica jest chorobą, na którą nie posiadamy obecnie skutecznej szczepionki dającej odporność i ochronę większości populacji ². Stąd też narzędziami do walki z gruźlicą są głównie globalne zmiany pozwalające na kontrolę i zredukowanie liczby przypadków gruźlicy, w tym też przerwanie ścieżki jej transmisji między gospodarzami.

Gruźlica przenosi się drogą kropelkową, gdy osoba z aktywną postacią gruźlicy wydziela prątki, które są następnie wdychane w postaci aerozolu przez gospodarza wtórnego, u którego prątki dostają się do płuc poprzez drogi oddechowe, a następnie do pęcherzyków płucnych. Pierwszą linię obrony przed rozwijającym się zakażeniem stanowią makrofagi alweolarne, które w procesie fagocytozy próbują usunąć prątki z organizmu. Komórki żerne, które nie są w stanie wyeliminować wewnątrzkomórkowego zakażenia są oddzielane od zdrowych tkanek poprzez nacieki komórek odpornościowych i tworzenie zmian ziarniniakowatych. Zakażenie może zostać w pełni wyeliminowane, prowadzić do aktywnej postaci gruźlicy lub przejść w fazę latencji zależnie od sprawności układu odpornościowego gospodarza ³.

Na rozprzestrzenianie się gruźlicy mają wpływ czynniki, które pogrupować można w cztery kategorie związane z: odpornością gospodarza, socjoekonomicznym statusem gospodarza oraz jego

środowiskiem życia, jak i z samym patogenem. Na status odpornościowy gospodarza wpływ mogą mieć współistniejące choroby takie jak cukrzyca ⁴ czy zakażenie wirusem HIV ⁵, ale również palenie tytoniu i nadużywanie alkoholu ⁶. Dodatkowo na to czy u gospodarza rozwinie się choroba i jak będzie ona przebiegała wpływają czynniki genetyczne, które obecnie nie są ściśle poznane ⁷. Z kolei status socjoekonomiczny może mieć wpływ na ryzyko wystąpienia choroby poprzez zwiększone ryzyko ekspozycji na gruźlicę np. w krajach z mniej rozwiniętą infrastrukturą zdrowia publicznego, co wiąże się z utrudnieniami w efektywnej szybkiej diagnostyce i leczeniu pacjentów. Dodatkowo ludzie żyjący w ubóstwie są znacznie bardziej narażeni na niedożywienie i wynikające z niego konsekwencje dla statusu odpornościowego ⁸. Również czynniki środowiskowe takie jak wilgotność czy temperatura mogą mieć pośredni wpływ na rozprzestrzenianie się gruźlicy ⁹. Czynniki związane z patogenem – czyli właściwości decydujące o jego zdolności do zakażenia, omijania mechanizmów obronnych gospodarza, wpływu na przebieg choroby oraz efektywności leczenia są obecnie najmniej poznane ze względu na złożoność przebiegu gruźlicy jak i wysokich kosztów takich analiz.

Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zidentyfikowanie różnic genetycznych oraz fenotypowych między szczepami wysokotransmisyjnymi i niskotransmisyjnymi prątka gruźlicy oraz ich wpływu na transmisyjność tych szczepów.

Cel ten zrealizowano poprzez następujące cele cząstkowe:

1. Analizę dostępnej literatury w celu oceny, jakie linie filogenetyczne powodują wybuchy epidemiczne gruźlicy na świecie oraz strukturę ich rozprzestrzenienia się geograficznego.
2. Identyfikację wysoko- i niskotransmisyjnych szczepów *M. tuberculosis* w obrębie kolekcji szczepów IGiChP.
3. Badania asocjacyjne genomów *M. tuberculosis* w celu wyłonienia różnic genetycznych między szczepami wysokotransmisyjnymi oraz niskotransmisyjnymi.
4. Badania fenotypowe obejmujące analizę kinetyki wzrostu, wzrostu w warunkach obniżonej ilości tlenu, ocenę lekooporności, określenie poziomu dostosowania ewolucyjnego, ocenę poziomu wewnątrzkomórkowego pochtaniania i zdolności przeżywania w makrofagach wybranych szczepów oraz produkcję cytokin prozapalnych przez komórki linii monocytarno-makrofagowej THP-1 infekowane wybranymi szczepami *M. tuberculosis*.

Metodyka i wyniki

Pierwszym etapem pracy była analiza literatury poprzez przegląd systematyczny baz literaturowych Pubmed oraz Web of Science i analizę danych na temat ognisk epidemiologicznych gruźlicy na świecie w latach 2011–2020 monitorowanych przy użyciu sekwencjonowania całogenomowego *Mycobacterium tuberculosis*. Przenalizowane dane w większości pochodziły z Europy, Azji i Ameryki Północnej prawdopodobnie ze względu na koszt jak i dostępność tej technologii. Ogniska gruźlicy występowały na wszystkich kontynentach, zarówno w krajach o wysokiej, jak i niskiej zapadalności na gruźlicę. Mediana liczby izolatów w ogniskach wynosiła pięć izolatów. Przeważającą linią była linia 4, natomiast linia 2 pojawiała się rzadziej. Ponadto, raportowane szczepy często były lekooporne.

Kluczowym etapem przygotowania pracy doktorskiej był wybór szczepów wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych spośród kolekcji szczepów zgromadzonych w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Szczepy były wstępnie klasyfikowane na podstawie genotypowania metodą spoligotyping, rozmieszczenia geograficznego oraz danych

epidemiologicznych (Tabela 1). Na tej podstawie wybrano 347 szczepów, które następnie poddano sekwencjonowaniu całogenomowemu w celu identyfikacji szczepów z potwierdzoną transmisją. Spośród 347 szczepów poddanych całogenomowemu sekwencjonowaniu, 44 szczepy określono jako niskotransmisyjne (nie wykazano transmisji), natomiast pozostałe jako wysokotransmisyjne, potencjalnie pochodzące z wybuchów epidemicznych.

Tabela 1. Cechy na podstawie, których wstępnie przypisywano szczepy w kolekcji IGiChP do poszczególnych kategorii.

Kategoria	Genotypowanie	Rozmieszczenie geograficzne	Dane epidemiologiczne
Szczepy wysokotransmisyjne	Identyczny spoliogotyp	Izolowane wielokrotnie od różnych pacjentów na obszarze w zasięgu 50 km	Możliwość transmisji
Szczepy niskotransmisyjne	Unikalny spoliogotyp	Pojedyncze izolaty	Brak potwierdzonej transmisji

W kolejnym etapie prac dokonano analizy *in silico* wyników sekwencjonowania całogenomowego przy pomocy ścieżki biotechnologicznej MTB_{SEQ}¹⁰, która pozwala na otrzymanie informacji na temat przynależności szczepów do poszczególnych linii filogeograficznych oraz polimorfizmów pojedynczych nukleotydów między szczepami. Na tej podstawie 326 szczepów, dla których udało się uzyskać biblioteki całogenomowego DNA podzielono na szczepy wysokotransmisyjne i niskotransmisyjne. Szczepy różniące się o 12 lub więcej polimorfizmów uznawano za takie, dla których nie wykazano transmisji w analizowanej populacji prątków gruźlicy. Określono również rozszerzony profil oporności szczepów na leki przy pomocy testu komercyjnego HAIN. Wykazano, że 254 (74,0%) szczepów spośród całej kolekcji było wrażliwych na wszystkie analizowane antybiotyki. Natomiast 92 szczepy (26,8%) były szczepami lekoopornymi. Eksperyment wykonano dzięki uprzejmości Zakładu Mikrobiologii IGiChP w Warszawie. Dodatkowo analiza pokrewieństwa pozwoliła na potwierdzenie, lub nie, transmisyjności szczepów, a więc przypisanych im kategorii. W ten sposób wyłoniono 23 klastry szczepów wysokotransmisyjnych, z których do dalszych badań wybrano pojedyncze szczepy będące przedstawicielami poszczególnych klastrow. Jednakże ze względu na lekooporność szczepów oraz trudności techniczne związane z ich ożywieniem, liczbę wybranych do dalszych badań klastrow zmniejszono do 13. Do każdego szczepu wysokotransmisyjnego dopasowano również szczep niskotransmisyjny, który miał to samo pochodzenie genetyczne. Analiza ta pozwoliła również na identyfikację polimorfizmów pojedynczych nukleotydów i porównanie między sobą grup szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych testem statystycznym Fishera. Analiza ta nie ujawniła statystycznie istotnych różnic w polimorfizmach między grupami szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych.

W kolejnych etapach realizowania pracy doktorskiej na wybranych parach 13 szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych dokonano szeregu eksperymentów mających na celu wykazanie potencjalnych różnic fenotypowych między tymi dwoma grupami i ocenę czy różnice w transmisyjności mogą wynikać z cech fenotypowych szczepów. Zbadano wzrost szczepów w warunkach laboratoryjnych na bogatym podłożu, dokonując pomiarów gęstości optycznej OD₆₀₀ oraz oszacowania liczby jednostek tworzących kolonie (CFU) w odpowiednich punktach czasowych. Wykorzystane w pracy szczepy obu grup nie charakteryzowały się istotnie statystycznymi różnicami we wzroście w warunkach laboratoryjnych na podłożu bogatym. Zbadano również odporność obu grup szczepów na wzrost w warunkach ograniczonego dostępu do tlenu. W eksperymencie tym prątki hodowano w warunkach ograniczonego tlenu przez okres 30 dni, następnie oceniano wzrost w skali

McFarlanda. Po zakończeniu eksperymentu, prątki hodowano w warunkach tlenowych, oceniając ich zdolność do regeneracji i dokonywano oceny wzrostu w skali McFarlanda. Nie zaobserwowano znaczących różnic we wzroście obu grup badanych szczepów ani w ich zdolności do regeneracji. Eksperyment wykonano dzięki uprzejmości Zakładu Mikrobiologii IGiChP w Warszawie.

Określono również poziom dostosowania ewolucyjnego wybranych szczepów *M. tuberculosis* w testach kompetycyjnych, aby dokonać oceny wpływu ich dostosowania na transmisyjność. W tym celu skonstruowano 9 rekombinowanych szczepów wysokotransmisyjnych, które uzyskano przy użyciu rekombinacji miejscowo-specyficznej. Posiadały one zintegrowany do genomu plazmid pMV306attP_ercc3_Mtb-gfp zawierający markery selekcyjne – gen warunkujący oporność na kanamycynę oraz gen kodujący białko zielonej fluorescencji. Pozwoliło to na bezpośrednie porównanie zdolności do wzrostu szczepów z każdej pary. Poziom dostosowania porównywano również pośrednio poprzez porównanie ich wzrostu do szczepu referencyjnego H37Rv pozbawionego funkcjonalnego genu *katG*, co powoduje, że szczep uzyskuje oporność na izoniazyd. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami szczepów wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych.

Analizowano także poziom wewnątrzkomórkowego pochłaniania badanych szczepów prątków oraz ich zdolność do przeżywania w ludzkich makrofagach różnicowanych z linii monocytarnej THP-1, a także cytokiny prozapalne syntetyzowane przez komórki żerne zakażone badanymi szczepami. Pochłanianie szczepów z grupy wysokotransmisyjnej było statystycznie istotnie wyższe niż szczepów grupy niskotransmisyjnej ($p = 0.0281$), natomiast wewnątrzkomórkowe przeżywanie szczepów nie różniło się dla obu grup ($p = 0.7451$). Analizując produkcję cytokin przez komórki żerne, nie zauważono istotnie statystycznych różnic dla obu grup szczepów, natomiast dla cytokin IL-1 β , IL-8, MIP-1 α zaobserwowano silną indukcję w obecności szczepów z obu grup w porównaniu do szczepu referencyjnego.

Z wykorzystaniem metody RNASeq, analizowano również globalną ekspresję genów trzech najczęściej izolowanych szczepów wysokotransmisyjnych (G149, G151, L139) w porównaniu do ich niskotransmisyjnych odpowiedników (2904_NT, 8069_NT, 5764_NT) na podłożu bogatym oraz ubogim w składniki odżywcze z dodatkiem cholesterolu. Dla porównywanych par szczepów zwiększonej ekspresji podlegało od 5 do 13 genów, a zmniejszonej ekspresji od 9 do 13 genów. Obserwowane zmiany były jednak unikalne dla badanych par co nie pozwoliło na wskazanie wzoru zmiany poziomu ekspresji charakterystycznego dla porównywanych grup szczepów.

Wnioski

1. Głównym czynnikiem wpływającym na transmisję prątków gruźlicy w obrębie tej samej linii filogenetycznej są czynniki zależne od gospodarza oraz czynniki socjoekonomiczne.
2. Zróżnicowanie genetyczne i związane z tym zróżnicowanie fenotypowe samych patogenów ma ograniczone znaczenie dla zdolności klinicznych szczepów *M. tuberculosis* do transmisji.

Literatura

1. Global Tuberculosis Report 2024. Accessed March 9, 2025. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2024>
2. Fatima S, Kumari A, Das G, Dwivedi VP. Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sciences*. 2020;252:117594. doi:10.1016/j.lfs.2020.117594

3. Alsayed SSR, Gunosewoyo H. Tuberculosis: Pathogenesis, Current Treatment Regimens and New Drug Targets. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(6):5202. doi:10.3390/ijms24065202
4. Ngo MD, Bartlett S, Ronacher K. Diabetes-Associated Susceptibility to Tuberculosis: Contribution of Hyperglycemia vs. Dyslipidemia. *Microorganisms*. 2021;9(11):2282. doi:10.3390/microorganisms9112282
5. Bruchfeld J, Correia-Neves M, Källenius G. Tuberculosis and HIV Coinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(7):a017871. doi:10.1101/cshperspect.a017871
6. Lampalo M, Jukić I, Bingulac-Popović J, Stanić HS, Barišić B, Popović-Grle S. THE ROLE OF CIGARETTE SMOKING AND ALCOHOL CONSUMPTION IN PULMONARY TUBERCULOSIS DEVELOPMENT AND RECURRENCE. *Acta Clin Croat*. 2019;58(4):590-594. doi:10.20471/acc.2019.58.04.04
7. McHenry ML, Williams SM, Stein CM. Genetics and evolution of tuberculosis pathogenesis: New perspectives and approaches. *Infect Genet Evol*. 2020;81:104204. doi:10.1016/j.meegid.2020.104204
8. Duarte R, Lönnroth K, Carvalho C, et al. Tuberculosis, social determinants and co-morbidities (including HIV). *Pulmonology*. 2018;24(2):115-119. doi:10.1016/j.rppnen.2017.11.003
9. Xu M, Li Y, Liu B, et al. Temperature and humidity associated with increases in tuberculosis notifications: a time-series study in Hong Kong. *Epidemiol Infect*. 2020;149:e8. doi:10.1017/S0950268820003040
10. Kohl TA, Utpatel C, Schleusener V, et al. MTBseq: a comprehensive pipeline for whole genome sequence analysis of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *PeerJ*. 2018;6:e5895. doi:10.7717/peerj.5895