

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

Głębokie zrozumienie mechanizmów rozprzestrzeniania się gruźlicy jest kluczowe w walce z tą chorobą i niezbędne do opracowania skutecznych globalnych systemów kontroli przez organy zdrowia publicznego. Wiadomo, że na transmisyjność gruźlicy wpływa szereg złożonych i wzajemnie powiązanych czynników, co znacznie utrudnia projektowanie i analizę badań nad jej rozprzestrzenianiem. Czynniki te obejmują warunki środowiskowe, takie jak temperatura i wilgotność powietrza, czynniki socjoekonomiczne, m.in. gęstość zaludnienia czy szybki i efektywny dostęp do opieki zdrowotnej, a także czynniki związane z gospodarzem, wpływające na jego status immunologiczny, takie jak współistniejące choroby (np. cukrzyca) oraz niedożywienie. Ważne są również cechy patogenu, takie jak jego zakaźność czy zdolność do wywoływania reakcji prozapalnej oraz podłoże genetyczne (pochodzenie z konkretnej linii filogenetycznej). Istotnym aspektem pozostaje fakt, że czynniki patogenne wpływające na transmisyjność gruźlicy nie zostały jeszcze w pełni zidentyfikowane i nadal stanowią przedmiot intensywnych badań, ze względu na sprzeczne wyniki różnych analiz.

Celem niniejszej pracy było określenie zmienności genotypowej i fenotypowej prątków gruźlicy o wysokiej oraz niskiej transmisyjności w Polsce.

W pierwszym etapie realizacji niniejszej pracy doktorskiej wytypowano szczepy o wysokiej i niskiej transmisyjności z kolekcji Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie na podstawie ich spoligotypu. Wyłoniono 347 kandydatów na szczepy o wysokiej transmisyjności oraz 44 kandydatów na szczepy o niskiej transmisyjności. Następnie przeprowadzono sekwencjonowanie całego genomu (WGS) tych szczepów, co umożliwiło analizę asocjacyjną i przyporządkowanie ich do odpowiednich klastrow na podstawie różnic w polimorfizmach pojedynczych nukleotydów (SNP). Początkowo wyodrębniono 23 klastry szczepów o wysokiej transmisyjności, jednak liczba ta została zredukowana do 13 z powodu trudności z prowadzeniem badań *in vitro*. Szczepy, które nie grupowały się w klastry, uznano za niskotransmisyjne. Kryteria doboru szczepów omówiono szczegółowo w rozdziale 4. Metody. W kolejnym kroku, do wybranych szczepów wysokotransmisyjnych dopasowano szczepy niskotransmisyjne, co umożliwiło dalsze porównawcze analizy fenotypowe. Pary szczepów pochodziły z tych samych

linii i sublinii filogenetycznych oraz nie mogły różnić się o więcej niż określoną liczbę SNP. Wszystkie analizowane szczepy pochodziły z filogenetycznej linii 4, z wyjątkiem jednego szczepu należącego do linii 2. Analiza statystyczna wariantów między szczepami o wysokiej i niskiej transmisyjności nie wykazała istotnych różnic między tymi dwiema grupami.

W kolejnych etapach pracy skupiono się na badaniach fenotypowych, mających na celu identyfikację różnic w kinetyce wzrostu między szczepami wysokotransmisyjnymi i niskotransmisyjnymi. W pierwszej kolejności przeprowadzono hodowlę w standardowych warunkach laboratoryjnych na podłożu płynnym 7H9 z dodatkiem OADC, a kontrolnie szczepy wysiewano na podłoże stałe 7H10 z dodatkiem OADC, aby ocenić ich żywotność. Wyniki tej analizy nie wykazały różnic w kinetyce wzrostu między obiema grupami szczepów. Następnie przeprowadzono eksperyment w warunkach ograniczonego dostępu tlenu, naśladując *in vitro* środowisko, w jakim prątki mogą znajdować się w płucach gospodarza. Szczepy hodowano przez 30 dni w podłożu beztlenowym, po czym reaktywowano je na podłożu płynnym, aby ocenić ich zdolność do wzrostu po okresie uśpienia. Ta analiza również nie wykazała istotnych różnic między szczepami o wysokiej i niskiej transmisyjności.

W następnym etapie uzyskano rekombinowane szczepy wysokotransmisyjne, wykorzystując plazmid pMV306attP_{ercc3_Mtb-gfp}, zawierający gen reporterowy *gfp*, kodujący białko zielonej fluorescencji pod kontrolą silnego promotora genu *ercc3*. Umożliwiło to efektywną identyfikację rekombinantów przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. Uzyskano 9 rekombinowanych szczepów wysokotransmisyjnych. Plazmid pMV306attP_{ercc3_Mtb-gfp} zawierał również gen oporności na kanamycynę, co umożliwiło selekcję szczepów na podłożu 7H10 suplementowanym OADC z dodatkiem kanamycyny. Następnie przeprowadzono testy kompetycji w celu określenia poziomu dostosowania względnego z jednoczesną hodowlą szczepów wysokotransmisyjnych (rekombinowanych) i niskotransmisyjnych oraz testy kompetycji w celu określenia poziomu dostosowania bezwzględnego, gdzie hodowano szczepy wysokotransmisyjne lub niskotransmisyjne ze szczepem kontrolnym *M. tuberculosis* Δ katG. Analiza tych eksperymentów nie wykazała istotnych statystycznie różnic między szczepami o wysokiej i niskiej transmisyjności.

Następnie określano poziom wewnątrzkomórkowego pochłaniania wybranych szczepów *M. tuberculosis* przez makrofagi. Ta analiza wykazała statystycznie istotne różnice między badanymi grupami szczepów – szczepy wysokotransmisyjne były pochłaniane w większym stopniu niż szczepy niskotransmisyjne. Przeprowadzono także eksperyment dotyczący przeżywalności prątków wewnątrz makrofagów. Analiza przeżywalności prątków nie wykazała statystycznie istotnych różnic między szczepami wysokotransmisyjnymi a niskotransmisyjnymi.

Ostatnim etapem pracy była analiza transkryptomu grup szczepów wysokotransmisyjnych oraz niskotransmisyjnych. Hodowle bakteryjne prowadzono w podłożu płynnym bogatym 7H9 suplementowanym OADC, oraz w drugim wariancie, z dodatkiem 0,01% cholesterolu oraz 0,01% tyloxapolu. Nie zaobserwowano dla szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych konkretnych genów wspólnych, które podlegałyby zmienionej ekspresji.

Uzyskane wyniki pokazują, że badanie transmisyjności jest złożonym procesem. Między badanymi grupami szczepów nie wykazano istotnych statystycznie różnic genotypowych ani fenotypowych.