

Streszczenie

Charakterystyka struktury wyspy patogenności Ysa-PI epidemicznego szczepu *Yersinia enterocolitica* 1B/O8 występującego na terenie Polski ze szczególnym uwzględnieniem genów regulatorowych *ysrR* – *ysrS*

Pałeczki *Yersinia enterocolitica* są jednym z najczęstszych czynników etiologicznych odpowiadających za bakteryjne zakażenia pokarmowe u ludzi. Najczęściej zakażenia wywołują szczepy linii europejskiej (szczególnie szczepy bioserotypu 4/O3) określane mianem nisko patogennych. Wysoce patogenne szczepy *Yersinia enterocolitica* należące do bioserotypu 1B/O8 posiadają szereg dodatkowych mechanizmów wirulencji takich jak systemy transportu typu III – Ysa i typu II – Yts1 czy siderofor jersiniabaktyna. Badania prowadzone na szczepach tego wysoce patogenicznego bioserotypu, związanych z wywoływaniem zakażeń w Polsce od 2004 roku wykazały, że nie posiadają one zdolności do wydzielania białek Ysp transportowanych przez system T3SS Ysa. Wynik ten sugerował albo delecję całej wyspy patogenności Ysa-PI, w której obrębie znajdują się geny kodujące ten mechanizm wirulencji, w genomie tego szczepu, albo wyłączenie funkcjonowania tego locus.

W przedstawionej pracy badaniu poddano izolat DM0110, który wykazuje bardzo bliskie pokrewieństwo z pozostałymi izolatami pałeczek *Y. enterocolitica* 1B/O8 izolowanymi w Polsce, co zostało wcześniej wykazane w licznych badaniach. Przeprowadzone sekwencjonowanie kompletnego locus Ysa-PI wykazało, że omawiana wyspa patogenności jest obecna w całości w genomie badanego szczepu. Co więcej wykazuje ona wysoki stopień ogólnego podobieństwa, na poziomie sekwencji nukleotydowej oraz organizacji struktury, do homologicznych sekwencji szczepów *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8 8081, WA314 i A127/90. Wszystkie te trzy szczepy zostały wykorzystane w analizie porównawczej jako szczepy odniesienia, gdyż posiadają one potwierdzone funkcjonowanie systemu T3SS Ysa. Dokładna analiza wykazała równocześnie istnienie lokalnie licznych istotnych różnic. Część z nich, szczególnie dotyczących porównania ze szczepem A127/90, skutkowałą występowaniem istotnych zmian w sekwencji aminokwasowej białek systemu Ysa. Ze względu jednak na udowodnione funkcjonowanie systemu Ysa w szczepie A127/90, oraz fakt nie występowania tych zmian u pozostałych szczepów odniesienia, można przyjąć, że nie mają one wpływu na ogólne funkcjonowanie tego systemu transportu w szczepie DM0110.

Przeprowadzona *in silico* analiza sekwencji genów analizowanej wyspy patogenności oraz przewidywanej sekwencji aminokwasowej kodowanych przez nie białek wykazała obecność pojedynczej punktowej substytucji charakterystycznej dla badanego izolatu *Y. enterocolitica* 1B/O8 wyosobnionego na terenie Polski i nie występującej w żadnym z porównywanych szczepów. Mutacja ta występowała w genie kodującym białko YsrR i skutkowała pojawieniem się przedwczesnego kodonu STOP translacji. Przeprowadzone analizy, polegające na wytworzeniu rekombinowanego białka YsrR zarówno w wersji dzikiej, jak i zmutowanej potwierdziły, że białko szczepu DM0110 posiada znacznie niższą wielkość niż wersja dzika.

Białko YsrR jest częścią systemu regulacyjnego YsrRST. System ten należy do rodziny systemów dwuskładnikowych i odpowiada za regulację ekspresji całej wyspy patogenności Ysa-PI. W omawianym nietypowym, bo aż trzy składnikowym systemie, białko YsrR pełni funkcję regulatora. Po ufosforylowaniu domeny REC białka YsrR przez białka YsrS i YsrT, wiąże się ono do DNA w obrębie wyspy Ysa-PI i aktywuje transkrypcję jej genów.

Przeprowadzona *in silico* analiza struktury białka YsrR badanego szczepu DM0110 wykazała, że w wyniku przedwczesnej terminacji translacji ekspresji nie ulegają istotne, z punktu widzenia funkcji tego białka, domeny. W obrębie całkowicie nie transkrybowanej domeny LuxR-C-like, w dzikiej wersji białka, znajduje się motyw HTH charakterystyczny dla białek oddziaływujących z DNA. Druga wykryta w tym białku domena, zwana REC, jest transkrybowana jedynie w połowie. Odpowiada ona za interakcje z białkami YsrS i YsrT. W jej obrębie znajduje się również kwas asparaginowy D2 będący ostatecznym akceptorem grupy fosforanowej w procesie przekazywania sygnału. Przeprowadzona analiza wykazała, że białko YsrR nie może spełniać swojej funkcji co należy uznać za przyczynę wyłączenia funkcjonowania systemu transportu Ysa. Przedstawione badania dobrze korelują z licznymi danymi piśmiennictwa, wskazujących, że inaktywacja białka YsrR, skutkuje inaktywacją całego systemu Ysa. Badania te były jak dotąd prowadzone jedynie na szczepach laboratoryjnych. Opisany izolat DM0110, będący przedstawicielem epidemicznego szczepu występującego w Polsce, stanowi pierwszy przypadek szczepu klinicznego posiadającego tego typu dysfunkcję.

W celu zbadania stabilności opisanej mutacji przeprowadzono sekwencjonowanie genu *ysrR* izolatów szczepu DM0150 (bardzo blisko spokrewnionego z badanym szczepem

DM0110) poddanego wcześniej serii 145 pasażu. Sekwencjonowanie tego genu przeprowadzono również dla pięciu szczepów wyizolowanych na terenie Polski na przestrzeni lat 2004 – 2013. Analiza ta wykazała bardzo wysoki poziom konserwacji sekwencji genu *ysrR*.

W dalszym ciągu badania przeprowadzona została analiza populacyjna mająca na celu sprawdzenie wszystkich szczepów zgromadzonych w kolekcji Zakładu Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny pod kątem obecności mutacji inaktywującej system transportu *Ysa*. Na potrzeby poniższego badania zaprojektowany został szybki test PCR-RFLP pozwalający na zidentyfikowanie szczepów *Y. enterocolitica* 1B/O8, u których występuje opisana mutacja. Zastosowanie tego testu pozwoliło potwierdzić obecność omawianej mutacji u wszystkich izolatów zgromadzonych w latach 2004 – 13, czyli od początku trwania ogniska zakażeń *Y. enterocolitica* 1B/O8 w Polsce.

Opracowany szybki test RFLP-PCR może być również przydatny w prostym diagnozowaniu zakażeń wywołanych przez epidemiczny szczep *Y. enterocolitica* 1B/O8. Na jego podstawie został zaprojektowany test dupleks-PCR-RFLP, który skutecznie charakteryzuje wyżej wymienione szczepy. Test ten może również być przydatny w dochodzeniu epidemiologicznym mającym na celu ustalenie źródła zakażeń tymi pałeczkami w Polsce.

Uzyskane wyniki rzucają nowe światło na zagadnienie funkcjonowania systemu T3SS *Ysa* i jego znaczenia dla pałeczek *Y. enterocolitica*, szczególnie w kontekście jego inaktywacji w szczepie odpowiadającym za trwające od przeszło dziesięciu lat ognisko rozproszone w Polsce i równoczesny brak tego systemu u dominującej *Y. enterocolitica* linii europejskiej. Dane te sugerują bowiem, że system T3SS *Ysa* nie jest niezbędny w przebiegu zakażenia, zaś jego inaktywacja może nieść za sobą istotne oszczędności energetyczne dla komórki bakteryjnej. Może to więc, przynajmniej po części, tłumaczyć pewnego rodzaju sukces ekologiczny jakim jest stabilne i wieloletnie utrzymywanie się na terytorium Polski szczepu *Y. enterocolitica* 1B/O8.

Podobne wnioski nasuwają przeprowadzone analizy porównawcze badanego szczepu *Y. enterocolitica* 1B/O8 DM0110 do szczepów 8081, WA-314 oraz A127/90. Wykryte liczne istotne różnice sekwencji w ostatnim z wymienionych szczepów sugerują bowiem, że w toku ewolucji system T3SS *Ysa* był kilkakrotnie wyłączany i powtórnie włączany. Hipoteza ta koreluje z niedawno publikowanymi wynikami badań sugerującymi, że system T3SS *Ysa* może

mieć znaczenie przede wszystkim w procesie infekowania owadów. Tymczasem jego aktywność nie przekłada się na kolonizację głównego rezerwuaru pałeczek *Y. enterocolitica* jakim jest trzoda chlewna. W tym kontekście podwyższona zjadliwość szczepów posiadających aktywny system T3SS Ysa powinna być traktowana bardziej jako efekt uboczny niż jako właściwa aktywność tego czynnika wirulencji.

Główne wnioski:

- Badany izolat *Y. enterocolitica* 1B/O8 – DM0110, będący przedstawicielem epidemicznego szczepu izolowanego od chorych z jersiniozą w Polsce od 2004 roku posiada kompletną wyspę patogenności Ysa-PI.
- W ogólnym zarysie locus Ysa-PI szczepu DM0110 wykazuje bardzo wysoki stopień podobieństwa sekwencji nukleotydowej do zsekwencjonowanych homologicznych loci szczepów *Y. enterocolitica* 8081, WA-314 i A127/90.
- Lokalnie locus Ysa-PI szczepu DM0110 wykazuje znaczne lokalne różnice sekwencji szczególnie w porównaniu z homologiczną sekwencją szczepu A127/90. Obserwowane różnice są jeszcze większe przy porównaniu na poziomie sekwencji aminokwasowych kodowanych białek. Opisywane zmiany wykryte przy porównaniu ze szczepem A127/90 w zdecydowanej większości nie były wykryte przy porównaniu ze szczepami 8081 i WA-314, nie powinny więc mieć wpływu na ogólne funkcjonowanie systemu T3SS Ysa.
- Szczepy *Y. enterocolitica* DM0110 i WA-314 wykazują bardzo wysoki stopień podobieństwa sekwencji wyspy patogenności Ysa-PI, zarówno na poziomie sekwencji nukleotydowej jak i aminokwasowej kodowanych białek (z wyjątkiem białka YsrR).
- Za inaktywację wyspy patogenności Ysa odpowiada punktowa mutacja w genie *ysrR* kodującym nadrzędny regulator transkrypcji systemu T3SS Ysa. Udowodniono, że wpływa ona na powstawanie jedynie krótkiego odcinka białka YsrR.
- Zmiana w genie *ysrR* wydaje się być charakterystyczna dla epidemicznego szczepu *Y. enterocolitica* 1B/O8 izolowanego w Polsce od 2004 roku.
- Opisywana mutacja cechuje się wysoką stabilnością, gdyż została wykryta we wszystkich szczepach tego bioserotypu wyizolowanych w Polsce na przestrzeni dziesięciu lat (2004-2013) i zgromadzonych w kolekcji Zakładu Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny.

- Opracowany test PCR-PFLP może stanowić przydatne narzędzie w szybkiej charakterystyce szczepów *Y. enterocolitica* 1B/O8 należących do opisywanego epidemicznego szczepu.