

## **Streszczenie rozprawy doktorskiej**

**mgr Katarzyna Krystopa-Grzybowska**

**„Genetyczna charakterystyka *Mycobacterium bovis* BCG podszczeptu Moreau stosowanego do powszechnych szczepień przeciw gruźlicy w Polsce”**

**Promotor: prof. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopeć**

Żywa, atenuowana szczepionka przeciw gruźlicy BCG jest jedną z najstarszych i najczęściej stosowanych szczepionek w historii medycyny. Oryginalny szczep BCG został uzyskany poprzez osłabienie bydlęcego patogenu gruźlicy *Mycobacterium bovis* za pomocą pasażu prowadzonych w latach 1908–1921. Od 1924 r. rodzicielski szczep *M. bovis* BCG rozsyłano do laboratoriów na całym świecie w celu uruchomienia produkcji szczepionki. Specyfika stosowanej przez dziesięciolecia technologii produkcji szczepionek BCG z wykorzystaniem oryginalnego francuskiego szczepu *M. bovis* BCG oraz ciągłe jego pasażowanie w różnych częściach świata wywołała indywidualne zmiany genetyczne wśród szczepów potomnych. Zmiany te, prawdopodobnie przełożyły się na różnice w atenuacji szczepów szczepionkowych, a tym samym skuteczność i bezpieczeństwo poszczególnych szczepionek BCG. W chwili obecnej immunoprofilaktyka gruźlicy opiera się wyłącznie o szczepienia BCG a część nowych potencjalnych szczepionek przeciw gruźlicy będących w fazie badań klinicznych bazuje na genomie BCG. W związku z tym wydaje się, że prowadzenie dalszych prac nad lepszą charakterystyką szczepów szczepionkowych BCG pozwoli na wiarygodniejszą ocenę skuteczności i kontrolę jakości szczepionek oraz pełniejsze zrozumienie mechanizmów ich działania.

Szczep *M. bovis* BCG Moreau PL do chwili obecnej nie został genetycznie scharakteryzowany chociaż od ponad 65 lat wchodzi w skład szczepionki stosowanej do szczepienia przeciw gruźlicy w Polsce. Przesłanką do podjęcia badań zaplanowanych w pracy doktorskiej stały się uzyskane wcześniej wyniki własne. Badania te wykazały obecność 876-nukleotydowej insercji w genomie *M. bovis* Moreau PL w porównaniu z genomem najbliższego siostrzanego szczepu BCG, wywodzącego się z tego samego szczepu macierzystego BCG-Moreau – *M. bovis* BCG Moreau Rio de Janeiro (RDJ). Zidentyfikowana różnica świadczyła o zmienności molekularnej i wskazywała na możliwość występowania większej liczby mutacji różniących oba podszczepty BCG. Poza tym, aby prześledzić nabywanie w czasie wykrytych zmian oraz ocenić stabilność

genetyczną szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL porównano pięć serii szczepu szczepionkowego pochodzących z lat 1957-2015.

Celem niniejszej rozprawy była genetyczna charakterystyka szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL wykorzystywanego do produkcji szczepionki BCG stosowanej do powszechnych szczepień przeciw gruźlicy w Polsce. Cel pracy realizowano poprzez: 1. ocenę stabilności genetycznej szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL; 2. uzyskanie pełnej sekwencji nukleotydowej genomu szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL; 3. zidentyfikowanie różnic genetycznych pomiędzy szczepem *M. bovis* BCG Moreau PL a najbliższym siostrzanym szczepem BCG – *M. bovis* BCG Moreau RDJ (AM412059.2); 4. zidentyfikowanie różnic genetycznych pomiędzy szczepem *M. bovis* BCG Moreau PL a najbardziej odległym siostrzanym szczepem BCG – *M. bovis* BCG Pasteur (AM408590.1).

Do przeprowadzenia analiz genomowych zastosowano sekwencjonowanie nowej generacji na platformie Illumina i MinION oraz analizy bioinformatyczne – narzędzia które pozwoliły na zdobycie precyzyjnych informacji do scharakteryzowania genomu polskiego podszczepu Moreau.

W badaniu stabilności genetycznej szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL analizowano wyniki uzyskane z przeprowadzonego sekwencjonowania nowej generacji na platformie Illumina pięciu serii szczepu pochodzących z różnych lat. Najstarsza z badanych serii 1250557 pochodziła ze szczepionki doustnej, która została zliofilizowana w 1957 roku, dwa lata po uruchomieniu produkcji szczepionki BCG w Polsce z podszczepu Moreau. Należy nadmienić, że w tym okresie nie obowiązywał jeszcze system serii siewnych. Dwie kolejne serie: 8112000 i 3122000, wyprodukowane zostały z dwóch różnych serii macierzystych w 2000 roku i są seriami roboczymi, z których aktualnie produkowane są krajowe szczepionki BCG. Natomiast dwie ostatnie serie objęte analizą: 00615 i 01115 to serie pochodzące z produktów końcowych czyli szczepionek BCG wyprodukowanych w 2015 roku. Taki dobór materiału miał umożliwić zidentyfikowanie ewentualnych zmian genetycznych przed i po wprowadzeniu systemu serii siewnych, różnic między roboczymi seriami używanymi do produkcji szczepionki BCG oraz między daną serią roboczą a uzyskanym z niej produktem końcowym. Analiza genetycznego podobieństwa pięciu badanych serii szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL nie wykazała żadnych istotnych różnic między seriami. Średnie podobieństwo sekwencji nukleotydowych genomów roboczych uzyskanych dla poszczególnych serii wobec czterech pozostałych wyniosło  $\geq 99,988\%$ , co

potwierdziło bardzo wysokie podobieństwo badanych pięciu serii polskiego szczepu BCG. Analizie poddano również zidentyfikowane dla każdej serii mutacje oraz miejsca o słabym/zerowym pokryciu opierając się na danych uzyskanych z sekwencjonowania na platformie Illumina względem genomu referencyjnego *M. bovis* BCG Moreau RDJ. Stwierdzono, że wszystkie zidentyfikowane zmiany były wspólne dla pięciu badanych serii. Wyniki te świadczą o stabilności genetycznej szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL na przestrzeni prawie 60 lat. Można zatem wnioskować, że sposób w jaki szczep szczepionkowy był przechowywany i pasażowany w Polsce nie doprowadził do zmian genetycznych, a do zidentyfikowanych mutacji obecnych we wszystkich pięciu seriach szczepu BCG doszło przed rokiem 1957.

W wyniku złożenia hybrydowego długich odczytów uzyskanych z sekwencjonowania nowej generacji na platformie MinION oraz krótkich odczytów uzyskanych z sekwencjonowania nowej generacji na platformie Illumina otrzymano wstępną sekwencję genomu polskiego szczepu szczepionkowego. Przeprowadzone w trakcie badań liczne weryfikacje oraz korekty pozwoliły na uzyskanie pełnej sekwencji *M. bovis* BCG Moreau PL, którą zdeponowano w międzynarodowej bazie danych GeneBank pod numerem CP085532. Uzyskana sekwencja genomu *M. bovis* BCG Moreau PL charakteryzowała się następującymi cechami: długość – 4 333 682 pz, %GC – 65,65, liczba genów – 4 056 (w tym kodujących białka – 3 782, pseudogenów – 223), liczba rRNA – 3, liczba tRNA – 45. Jest to pierwsza i jedyna do chwili obecnej dostępna sekwencja genomowa szczepu wchodzącego w skład szczepionki przeciwgruźliczej produkowanej w Polsce. Sekwencja ta będzie mogła stanowić przede wszystkim punkt odniesienia w genetycznej kontroli stabilności szczepu szczepionkowego w przyszłości, jednocześnie umożliwi porównywanie zmian genetycznych do jakich mogło dojść *in vivo* w przypadku klinicznych szczepów wyizolowanych od pacjentów z niedoborami odporności, u których rozwinęło się uogólnione zakażenie BCG.

Na podstawie przeprowadzonej analizy porównawczej w genomie szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL w odniesieniu do genomu *M. bovis* BCG Moreau RDJ wykazano obecność 175 mutacji, w tym 143 mutacji typu SNP oraz 32 mutacji typu INDEL. Wśród zidentyfikowanych mutacji SNP 77 występowało w obszarach kodujących i powodowało zmiany w sekwencjach aminokwasowych białek, natomiast 3 mogły mieć wpływ na kodowane białka z powodu ich lokalizacji w prawdopodobnych obszarach promotorowych. Wśród niesynonimicznych mutacji SNP ponad połowę stanowiły mutacje w genach

kodujących białka PE, co świadczy o ich wysokim polimorfizmie. Wśród zidentyfikowanych mutacji INDEL 17 dotyczyło obszarów kodujących. Dwie największe delecje zidentyfikowane w genomie *M. bovis* BCG Moreau PL posiadały długość 9 758 pz oraz 100 pz i obejmowały łącznie 10 genów, w tym 3 powiązane są ze zjadliwością prątków. Zmiany te mogą mieć przełożenie na opisywane w literaturze większe bezpieczeństwo polskiej szczepionki BCG w porównaniu z BCG-Moreau RDJ.

W wyniku analiz porównawczych i przeprowadzonych weryfikacji w genomie szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL w odniesieniu do genomu *M. bovis* BCG Pasteur zidentyfikowano łącznie 69 istotnych mutacji, w tym 41 mutacji typu SNP oraz 28 mutacji typu INDEL. Analiza uzyskanych wyników potwierdziła obecność zmian charakterystycznych dla szczepu BCG-Moreau czyli brak DU1, insercja IS6110 przed genem *phoP*, N-RD18, RD14, RD2, delecja C-końca genu *fadD2* i N-końca genu *ppsA*, DU2-I, delecja RD16, delecja S-RD13. Łącznie zidentyfikowano 40 mutacji SNP i 23 mutacje INDEL wspólne dla *M. bovis* BCG Moreau PL oraz *M. bovis* BCG Moreau RDJ, które odróżniały je od szczepu *M. bovis* BCG Pasteur. Analiza sekwencji genomowych podszczerpów BCG zdeponowanych w GeneBanku wykazała obecność 1 mutacji SNP oraz 2 mutacji INDEL charakterystycznych wyłącznie dla *M. bovis* BCG Moreau PL.

Uzyskane w niniejszej rozprawie, pierwsze w Polsce wyniki, uzupełniają wiedzę dotyczącą mikroewolucji i atenuacji szczepionkowych podszczerpów *M. bovis* BCG. Zidentyfikowane markery mogą zostać wykorzystywane do opracowania bardziej specyficznych testów badania tożsamości szczepów szczepionkowych oraz porównań taksonomicznych. Poza tym uzyskane w pracy wyniki będą także punktem wyjścia do podjęcia kolejnych badań związanych m.in. z ekspresją zidentyfikowanych genów specyficznych dla polskiego podszczerpu oraz oceny ich znaczenia w immunogenności i bezpieczeństwie szczepionek BCG.