

Maciej Czerkies, Adrianna Raczkowska, Katarzyna Brzostek*

Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii,
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło we wrześniu 2009 r.

1. Wstęp. 2. Enteropatogenne gatunki z rodzaju *Yersinia*. 3. *Y. pestis* – epidemiologia i patogenezę. 4. Czynniki zjadliwości *Y. pestis* kodowane na chromosomie. 5. Czynniki wirulencji kodowane na plazmidach: pCD1, pPCP1 oraz pMT1. 6. Struktura genomu *Y. pestis*. Inne elementy mające wpływ na patogenność. 7. Badania nad pokrewieństwem ewolucyjnym patogennych gatunków z rodzaju *Yersinia*. 8. Relacje wewnątrzgatunkowe i taksonomia *Y. pestis*. 9. Zastosowanie filogenomiki porównawczej do badania ewolucji *Y. enterocolitica*. 10. Proponowany model ewolucji patogennych gatunków z rodzaju *Yersinia*. 11. Podsumowanie

Quo vadis *Yersinia pestis*? The evolution of pathogenic species of the genus *Yersinia*

Abstract: The genus *Yersinia* includes three closely related species which are pathogenic to humans. *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* cause gastroenteritis, while *Y. pestis* is the causative agent of plague. Thanks to whole-genome sequencing it has become possible to conduct a detailed phylogenetic analysis leading to the construction of a „relationship tree” which shows the probable evolution of the genus *Yersinia*. It appears that *Y. enterocolitica* has diverged from an ancestor of pathogenic yersiniae and evolved independently. *Y. pestis*, a highly virulent pathogen, evolved from *Y. pseudotuberculosis* in a short amount of time by the acquisition of several loci and two plasmids by lateral gene transfer. These events seem to be counterbalanced by gene silencing and shuffling, which probably enhances virulence.

1. Introduction. 2. Enteropathogenic species of *Yersinia*. 3. *Y. pestis* – epidemiology and pathogenesis. 4. Chromosomally encoded virulence factors of *Y. pestis*. 5. Plasmids pCD1, pPCP1 and pMT1 encoding virulence factors. 6. Genome structure of *Y. pestis*. Other elements influencing pathogenicity. 7. Studies on evolutionary relationships of yersinia. 8. Intraspecies relationships and taxonomy of *Y. pestis*. 9. Application of comparative genomics to study the evolution of *Y. enterocolitica*. 3. Model of the evolution of pathogenic yersinia. 4. Summary

Słowa kluczowe: dżuma, ewolucja, genomika, patogenezę, *Yersinia*

Key words: evolution, genomics, pathogenesis, plague, *Yersinia*

1. Wstęp

Do rodzaju *Yersinia* zaliczamy obecnie 15 gatunków: *Y. aleksiciae*, *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederikseni*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. pestis*, *Y. philomiragia*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. similis* (www.bacterio.cict.fr/xz/yersinias.html). Rodzaj *Yersinia* został wyodrębniony w ramach rodziny *Enterobacteriaceae* w 1964 roku przez Wilhelma F r e d e r i k s e n a, który zaliczył do niego trzy gatunki patogenne dla ssaków, w tym ludzi, tj. *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica*, wcześniej klasyfikowane do rodzaju *Pasteurella*.

Gatunki te stały się obiektem szczegółowych badań dotyczących ich ekologii, epidemiologii, mechanizmów patogenezę oraz filogenezy. Od momentu przeklasyfikowania tych trzech gatunków w jeden rodzaj *Yersinia*, próbowano ustalić stopień pokrewieństwa pomiędzy nimi. Problem dotyczył zwłaszcza relacji między bakteriami enteropatogennymi, tj. *Y. pseudotuberculosis*

i *Y. enterocolitica*, a znacznie groźniejszym gatunkiem *Y. pestis*, wywołującym dżumę. W latach siedemdziesiątych do badań porównawczych użyto metody hybrydyzacji DNA, polegającej na ocenie stabilności temperatury zhybrydowanych próbek zdenaturowanego DNA porównywanych organizmów. Otrzymane wyniki, poddane analizie filogenetycznej, wskazały na znacznie bliższe niż się spodziewano pokrewieństwo pomiędzy *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis*. Stopień homologii DNA-DNA wyniósł ponad 90% [5] i był znacznie niższy w stosunku do trzeciego badanego gatunku – *Y. enterocolitica*, który wyniósł zaledwie 48%. Co więcej, badania wykazały, że sekwencje 16S rRNA *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* są identyczne [44].

Według obowiązujących zasad klasyfikacji, większość szczepów *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* można zaklasyfikować do jednego gatunku lub obecnie obowiązujące taksony przeklasyfikować do rang podgatunków nowo określonego taksonu (spełnione są wymagania dotyczące podobnej zawartości par GC, 70% homologii DNA i 97% homologii sekwencji 16S

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego; ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kbrzostek@biol.uw.edu.pl

rRNA). Ze względu jednak na wyraźnie odróżnialne fenotypy obu gatunków oraz ogromne różnice w zakresie wywoływanych chorób, a także podłoże historyczne i epidemiologiczne, reklasyfikacji nie dokonano. Spowodowało to jednak ożywienie dyskusji na temat aktualnych zasad wyodrębniania gatunku jako taksonu oraz opracowania bardziej uniwersalnej definicji gatunku. Zwrócono uwagę, że obecne normy określania gatunku stosowane dla *Eukarya*, u bakterii wskazują na ekotypy, a nazwane gatunki odpowiadają rangą eukariotycznym rodzajom [11]. W celu uporządkowania systematyki zaproponowano m. in. włączenie pojęcia „klonu” do bakteryjnej systematyki [31].

W większości opracowań dotyczących ewolucji *Yersinia* pojawia się termin mikroewolucja, który używany bywa w stosunku do modyfikacji puli genowych populacji prowadzących do stosunkowo niewielkich zmian organizmów, ale nie kończących się specjacją, do której prowadzi tzw. makroewolucja [1]. Terminy te (tj. mikro- i makroewolucja), wprowadzone w 1927 roku, są obecnie używane bardzo niekonsekwentnie, a zasadność takiego rozróżnienia jest przedmiotem licznych dyskusji. Zagadnienie jest ponadto komplikowane, wspomnianym wyżej, brakiem ogólnie akceptowanej definicji gatunku, a więc także i specjacji. W przypadku *Yersinia* termin mikroewolucja używany jest by zaznaczyć istotną rolę horyzontalnego transferu genów (jednego z głównych mechanizmów mikroewolucji, obok mutacji i dryfu genetycznego) w ewolucji zachodzącej w obrębie tego rodzaju, a także podkreślić, że wyodrębnienie w systematyce *Y. pestis* jako gatunku ma właśnie charakter czysto formalny.

Wprowadzenie w ostatnich latach nowych metod badawczych, a także zsekwencjonowanie genomów *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* pozwoliło na zebranie danych dotyczących czynników zjadliwości, filogenetycznego pokrewieństwa oraz domniemanych czasów specjacji tych patogennych gatunków. W pracy przedstawiono wyniki badań nad ewolucją *Y. pestis* w świetle ostatnich badań, wzbogaconych o analizę genomowego DNA. Wyniki sekwencjonowania genomu dwóch szczepów *Y. pestis*, tj. KIM (biotyp *Mediaevalis*) oraz CO92 (*Orientalis*) zostały opublikowane [14, 37] natomiast genomu szczepu 8081 *Y. enterocolitica* http://www.sanger.ac.uk/Projekts/Y_enterocolitica/ oraz IP32953 *Y. pseudotuberculosis* (<http://bbrp.llnl.gov/ggrp/html/microbe.html>) są dostępne w wersji elektronicznej.

2. Enteropatogenne gatunki *Yersinia*

Y. pseudotuberculosis i *Y. enterocolitica* są gatunkami szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie. Występują w glebie i wodzie, a za główny rezerwuuar tych

drobnoustrojów uważane są świnie. Oba gatunki są chorobotwórcze dla ludzi. Do zakażenia najczęściej dochodzi poprzez spożycie żywności skażonej bakteriami. Objawy kliniczne jersiniozy, choroby wywołanej przez *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis*, przybierają różne postaci. Z infekcją tymi patogenami wiąże się zapalenie żołądka i jelit, ostre zapalenie węzłów chłonnych, rzekome zapalenie wyrostka robaczkowego, zapalenia stawów, zapalenie spojówki, wysypkę szkarlatynową, rumień guzowaty oraz biegunkę [6].

Wywoływane dysfunkcje i objawy chorobowe w przypadku zakażenia tymi enteropatogenami są bardzo podobne, natomiast szczegółowe analizy pozwalają odróżnić od siebie ww. infekcje. W przeciwieństwie do kolonizującej głównie kępkę Peyera *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* znacznie szerzej rozprzestrzenia się w organizmie. Występują także różnice między ww. gatunkami w wywoływanych postaciach biegunki, stopniu nasilenia bólów brzucha itp. [4, 6].

Y. enterocolitica jest biochemicznie i genetycznie heterogenną grupą organizmów. W obrębie tego gatunku wyróżnia się obecnie około trzydzieści cztery serotypy. Różnice metaboliczne i biochemiczne pozwalają na wyodrębnienie sześciu biotypów (1A, 1B, 2, 3, 4 i 5) [6]. Poszczególne szczepy *Y. enterocolitica* różni także stopień zjadliwości. Wirulentne szczepy biotypów 1B, 2, 3, 4 i 5 posiadają plazmid pYV (*Yersinia* virulence) [18]. Plazmid pYV koduje adhezynę YadA, a także system sekrecji III typu. Podstawową funkcją efektorowych białek Yop (*Yersinia* outer membrane proteins) systemu sekrecji jest hamowanie reakcji obronnej gospodarza. Charakterystykę III systemu sekrecji funkcjonującego u patogennych gatunków z rodzaju *Yersinia* oraz rolę białek Yop w procesie patogenezy przedstawiliśmy szczegółowo wcześniej [8, 21, 27].

Do biotypu 1A należą szczepy, które utraciły plazmid pYV, a także locus *ail*, geny *myf* i *ystA* oraz nie mają funkcjonalnego genu *inv*. Biotyp 1B – „Nowego Świata” (złożony głównie ze szczepów izolowanych w Stanach Zjednoczonych) posiada dodatkowe czynniki zjadliwości, w tym wyspę patogenności HPI 1 (high pathogenicity island) i jest najbardziej zjadliwy. Na wyspie HPI 1 znajdują się geny, kodujące białka uczestniczące w biosyntezie i transporcie sideroforu – jersiniobaktyny. Biotypy od 2 do 5, (izolowane głównie w Europie i Japonii) pozbawione wyspy HPI, zestawia się często w jedną grupę nazywaną *Y. enterocolitica* „Starego Świata”, o znacząco mniejszej zjadliwości niż biotyp 1B [6, 40].

Pozostałymi czynnikami zjadliwości *Y. enterocolitica*, kodowanymi chromosomowo są: inwazyjna *Inv*, adhezyny *Ail* i *Myf*, ureaza oraz enterotoksyny *Yst*.

Ze względu na różnice w budowie antygeny O-swoistego LPSu wyróżnia się 21 serotypów *Y. pseudotuberculosis*. Serotypy te przyporządkowuje się do

sześciu grup, biorąc pod uwagę zdolność do produkcji egzotoksyn YPM (*Y. pseudotuberculosis*-derived mitogen), obecność całej wyspy HPI lub tylko jej prawej części (R-HPI) oraz różnice w występowaniu i wybranych cechach biochemicznych [19]. We wszystkich szczepach *Y. pseudotuberculosis* obecny jest plazmid pYV, a na chromosomie kodowane są oprócz toksyn YPM, także: inwazyjna Inv, adhezyna Ail, antygen pH 6 (odpowiednik Myf *Y. enterocolitica*). Białka Hms kodowane są na jednej z mniejszych wysp genomowych. Hms umożliwiają tworzenie biofilmów, ale ich rola w procesie patogenyzy jest prawdopodobnie niewielka (odwrotnie niż u *Y. pestis*) [13].

3. *Y. pestis* – epidemiologia i patogenyza

W przeciwieństwie do spokrewnionych enteropatogennych gatunków *Yersinia*, *Y. pestis* jest bardzo wrażliwa na promieniowanie słoneczne i temperaturę, i nie jest zdolna do przetrwania dłuższego okresu czasu poza organizmem gospodarza. Głównym rezerwuarem *Y. pestis* są dzikie populacje gryzoni, wliczając w to różne gatunki szczurów, myszy, nornic i myszokoczków. Wśród tych enzootypycznych gospodarzy większość jest odporna na zachorowanie (bądź, w przypadku niektórych gatunków, spowodowane dżumą ubytki w populacji są rekompensowane znacznym rocznym przyrostem). Mechanizmy przenoszenia, utrzymywania się pałeczki dżumy w populacjach ssaków i zdolności do wywoływania nagłych epidemii są trudne do zbadania, m.in. ze względu na kryptyczny charakter inwazji w enzootypycznych populacjach ssaków. Ostatnio jednak zwiększone zainteresowanie tym zagadnieniem i nowe metody badawcze przyniosły rezultaty w postaci opracowania kilku modeli zależności pomiędzy drobnoustrojami, przenoszącymi je gospodarzami i zwierzętami wrażliwymi na zakażenie. Otrzymano także wstępne dane dotyczące ekspansywności szczepów *Y. pestis* na nowe terytoria i mechanizmów wybuchania nagłych epidemii [20].

Głównym wektorem odpowiedzialnym za przeniesienie zakażenia w populacjach zwierząt są pchły, ponad 80 gatunków (z ponad 1500), z których najczęstszym są *Xenopsylla cheopis* (pchła szczurza) i *Pulex irritans* (pchła ludzka). Pchły odpowiedzialne są także za transmisję bakterii na inne, wrażliwe ssaki (ponad 200 gatunków z 70 rodzajów, w tym także ludzie), u których wywołują dżumę, chorobę o bardzo ciężkim przebiegu i wysokiej śmiertelności.

Przeniesienie bakterii rozpoczyna się, gdy pchła ugryzie ssaka – nosiciela. Zainfekowana krew tworzy w przedniej części jelita, zwanej przedżołądkiem (proventriculus) skrzep, który uniemożliwia insektowi przełykanie, a dla bakterii jest miejscem namnażania.

Pchła nie jest także w stanie przełknąć krwi, zaaspirowanej po ugryzieniu kolejnego wrażliwego gospodarza. Zwraca ją z powrotem do miejsca ugryzienia wraz ze znaczną liczbą bakterii, ocenianą na 11 000–24 000 komórek, które rozprzestrzeniają się do okolicznych węzłów chłonnych. Ze względu na niższą temperaturę ciała pchły, bakterie w momencie inwazji pozbawione są ochronnej otoczki (antygen F1, eksprymowany w 37°C), co czyni je podatnymi na fagocytozę przez leukocyty polimorfonuklearne (PMN) i makrofagi. Jednakże zdolność do przeżycia i namnażania w makrofagach (choć nie w PMN) pozwala *Y. pestis* przetrwać okres dostosowania się do zmienionego środowiska. Synteza indukowanych temperaturą 37°C czynników wirulencji (ekspresja antygeny F1 w 37°C zachodzi po 3h w warunkach *in vitro*) prowadzi do masowej proliferacji *Y. pestis* w węzłach chłonnych, po czym bakterie przechodząc do krwiobiegu infekują m.in. wątrobę, śledzionę i płuca. Rozwój ciężkiej bakteremii (stężenie bakterii osiąga co najmniej 10⁶CFU/ml) pozwala na skuteczne zakażenie niezainfekowanych pcheł żerujących na gospodarzu [33].

Obecność i masowe namnażanie się bakterii w węzłach chłonnych prowadzi do stanu zapalnego. Znacznie powiększone gruczoły limfatyczne (nawet do 10 cm) przyjmują postać tzw. dymienic. Jest to typowy objaw choroby zwanej dżumą dymieniczą. Chorobę tę charakteryzują ponadto: gorączka, drgawki, osłabienie, bóle głowy i brzucha itp. W końcowych fazach dochodzi do krwotoków, zakrzepic i zapaści. Nieleczona dżuma dymienicza prowadzi do śmierci w 50% przypadków. Przedostanie się bakterii do płuc wywołuje dżumę płucną. Objawia się ona wysoką gorączką, bólami głowy, dreszczami, apatią oraz kaszlem (często krwawym lub ropnym). Okazjonalnie występują także dymienice na szyi. Infekcji towarzyszą krwotoki, a płuca wypełniają się płynem. Nieleczona w ciągu pierwszych 24 godzin choroba ma 100% śmiertelność, wskutek uszkodzeń układu oddechowego i systemowej zapaści. Postać płucna charakteryzuje się ponadto wysoką zakaźnością. Masowa obecność bakterii w krwiobiegu jest charakterystyczna dla wszystkich postaci dżumy, prowadząc do typowych objawów szoku septycznego. Dżuma posocznicowa charakteryzuje się podobnymi objawami jak posocznice wywoływane przez inne Gram-ujemne bakterie (m.in. szok septyczny i zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego), a śmiertelność wynosi 100% (nieleczona). Jeden z charakterystycznych objawów, martwica dystalnych naczyń krwionośnych, towarzyszących infekcji, spowodował, że dżuma zyskała nazwę „Czarna Śmierć”.

Y. pestis uważa się za czynnik etiologiczny trzech wielkich pandemii, z których dwie pierwsze zdiesiątkowały ludność Europy i Afryki Północnej: plaga Justyniana (541–767 A.D.) i „Czarna Śmierć” (od 1346

do piętnastego wieku). Współcześnie (od roku 1894) trwa trzecia pandemia (Pandemia Nowożytna), wywoływana przez szczepy klasyfikowane do biotypu Orientalia [45].

Jeszcze do niedawna w powszechnym użyciu pozostawał wprowadzony przez Devignata w 1951 roku podział *Y. pestis*, oparty na zdolności do fermentacji glicerolu i redukcji azotanów, na trzy biotypy (Antiqua, Mediaevalis i Orientalis) skorelowany historycznie z tymi trzema wielkimi epidemiami dżumy. Od lat trwają badania mające na celu zweryfikowanie poglądu, że pierwsza i druga pandemia zostały wywołane przez odpowiednio, bakterie z biotypów Antiqua i Mediaevalis. Wprowadzenie nowych metod badawczych w ostatnich latach przyniosło wyniki podważające zarówno monofiletyczność tych biotypów (a więc i zasadność podziału), jak i ich historyczne powiązania. Potwierdzono także przynależność do gatunku *Y. pestis* odmiennych fenotypowo szczepów, przypisanych obecnie do biotypów Microtus i *Yersinia pestis pestoides* (oba awirulentne dla człowieka) [1]. Relacje wewnątrzgatunkowe i taksonomia *Y. pestis* są obecnie przedmiotem intensywnych analiz. Omówienie dotychczasowych wyników i propozycja zrewidowanej taksonomii zostaną przedstawione w dalszej części pracy.

4. Czynniki zjadliwości *Y. pestis* kodowane na chromosomie

Y. pestis syntetyzuje wiele czynników zjadliwości niezbędnych do infekcji i namnażania się w organizmach gospodarzy oraz efektywnej transmisji przez pchły. Wiele z tych czynników charakterystyczna jest także dla *Y. pseudotuberculosis*.

Kodowany chromosomowo czynnik PsaA (antygen pH 6, odpowiednik Myf *Y. enterocolitica*) podobnie jak u *Y. pseudotuberculosis*, wyrażany jest tylko w temperaturze od 35°C do 41°C i zakresie pH od 5 do 6,7. Jest to fibrylarne białko o masie cząst. 15 kDa, biorące udział w odporności bakterii na fagocytozę. PsaA produkowane jest głównie wewnątrz komórek eukariotycznych, przede wszystkim makrofagów, w odpowiedzi na zakwaszenie środowiska fagolizosomu [38]. Do niedawna postulowano także rolę PsaA jako adhezyny, lecz badania wykazały, że mutanty PsaA⁻ nie mają zmniejszonej zdolności adhezji do komórek eukariotycznych. Jednocześnie zaobserwowano, że po zaindukowaniu ekspresji PsaA w makrofagach, uwolnione komórki bakteryjne wykazują zwiększoną oporność na fagocytozę. Antygen pH 6 wydaje się być trzecim, obok białek Yop (kodowanych na plazmidzie pCD1 u *Y. pestis* i pYV u *Y. pseudotuberculosis*) i antygeny F1 (kodowanego na plazmidzie pMT1 *Y. pestis*) czynnikiem obrony przed fagocytozą, szczególnie istotnym

we wczesnych etapach inwazji [26]. Jest to jednocześnie jeden z niewielu kodowanych chromosomowo czynników wirulencji *Y. pseudotuberculosis*, który utrzymał się w funkcjonalnej postaci u pałeczki dżumy. Główna adhezyna i inwazyjna *Y. pseudotuberculosis*, tj. odpowiednio YadA oraz Inv odpowiadające za infekcję przewodu pokarmowego, są nieaktywne u *Y. pestis*. Najnowsze badania wykazały, że w procesie kolonizacji i rozprzestrzeniania *Y. pestis* udział biorą adhezyny: Ail [29], YadBC [17] oraz YapE [30].

Na chromosomie *Y. pestis* znajduje się kompletna i funkcjonalna wyspa patogenności HPI 1 [9, 40]. Wyspa jest prawdopodobnie wysoce konserwowana w obrębie zarówno rodzaju, jak i gatunku; wykazano bowiem 98% podobieństwo sekwencji genów HPI pomiędzy *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* 1B i *Y. pseudotuberculosis*. Należy także zauważyć, że wysoki stopień homologii sekwencji nukleotydurowej wyspy zachodzi także pomiędzy patogenami z rodzaju *Yersinia*, a innymi bakteriami przenoszącymi HPI, np. *E. coli*. Wysoka homologia sekwencji dotyczy bogatej w pary GC, „funkcjonalnej” części wyspy, nie zaś wysoce zmiennej w obrębie rodzaju *Yersinia* części bogatej w pary AT. Ta ostatnia charakteryzuje się niższą, odmienną od reszty HPI zawartością procentową par GC (32–44%, przy 56,4% dla części konserwowanej i 47,64% dla reszty genomu *Y. pestis* CO92) i zajmuje od 13% (u *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis*) do 28% (u *Y. enterocolitica*) długości wyspy. W konserwowanej ewolucyjnie części znajdują się wszystkie geny biosyntezy i transportu yersiniobaktyny (tj. geny *irp1* – 9), receptora dla tego sideroforu – białka *fyuA* oraz sekwencje: *intB* – integrazy oraz regulatora transkrypcji – *ybtA*.

U *Y. pestis* obecne są wszystkie elementy insercyjne wykryte w HPI u *Y. pseudotuberculosis* oraz delecja 10 kbp odcinka nie kodującego w lewej części wyspy, a obecne u *Y. enterocolitica*.

HPI 1 u *Y. pestis* znajduje się w obrębie większego chromosomalnego locus zwanego *pgm* (pigmentation), w skład którego wchodzi także geny *hms*. Cały, 102 kb fragment oflankowany jest sekwencjami IS100 i wycina się z chromosomu z częstością 10⁻⁵. Sekwencja HPI posiada wszystkie niezbędne do samodzielnego wycinania się elementy i prawdopodobnie jest zdolna do spontanicznej delekcji (jak u *Y. pseudotuberculosis*) jednak jej mobilność jest maskowana przez wyższą mobilność całego *pgm* [9].

Warto zauważyć, że *Y. pestis* z delecją locus *pgm* charakteryzuje się obniżoną wirulencją u myszy, która może zostać przywrócona wstrzyknięciem żelaza zakażonym zwierzętom. Wskazuje to na bardzo istotną rolę żelaza w procesach życiowych patogenów, a co za tym idzie, na rolę sideroforów jako czynników wirulencji [9].

Białka Hms kodowane są na pozostałej części locus *pgm*. Fenotyp Hms⁺ objawia się tworzeniem w temp.

25–28°C, brązowych lub czerwonych kolonii bakterii hodowanych na odpowiednich podłożach różnicujących (np. z heminą lub strukturalnym analogiem – czerwienią Congo). Ta cecha „pigmentacji” nadała nazwę całemu 102 kb regionowi *pgm*, w obrębie którego znajduje się locus *hms*. W sekwencji nukleotydowej tego regionu zidentyfikowano 4-genowy operon *hms*HFRS. Dwa kolejne geny *hmsT* i *hmsP* znajdują się poza locus *hms*. Ekspymowane białka HmsF i HmsH mają zdolność wiązania heminy i zatrzymywania jej w postaci związanej z błoną zewnętrzną. Białka HmsR, HmsS i Hms T są enzymami związanymi z błoną cytoplazmatyczną i uczestniczą w syntezie zewnątrzkomórkowego polisacharydu podobnego do poli(N-acetyloglukozaminy). Rola białek Hms w wirulencji u ssaków nie została potwierdzona i prawdopodobnie jest niewielka (zwłaszcza, że geny *hms* ulegają ekspresji głównie w temperaturze 25°C). Natomiast obecność funkcjonalnego locus *hms* jest niezbędna do zablokowania, przez masę bakteryjną, jelita pchły, a ściślej przedłożadka [25]. Ten żywieniowy zator (zahamowanie przepływu zaaspirowanej krwi) sprzyja efektywnej transmisji zainfekowanej pchły, która „wygłodzona” poszukuje kolejnego gospodarza. Rola białek Hms polega prawdopodobnie na zdolności komórek bakterii do aglutynacji i tworzenia biofilmów (obserwowana także u *Y. pseudotuberculosis*) [13]. W przeciwieństwie do HPI, część *pgm* kodująca białka Hms nie różni się znacząco zawartością par GC od reszty chromosomu *Y. pestis* i nie jest uważana za wyspę patogenności [40].

Na podstawie różnic w procentowej zawartości par GC, na chromosomie *Y. pestis*, podobnie jak u *Y. pseudotuberculosis* wykryto ok. 20 innych, pomniejszych wysp genomowych, z których większość to wyspy patogenności. Domniemywane produkty ekspresji genów zlokalizowanych w tych obszarach to m.in. siderofory, toksyny owadzie, adhezyny i geny metabolizmu kwasów tłuszczowych. Część z tych genów u *Y. pestis* została zainaktywowana w toku ewolucji, co wykazały analizy porównawcze z genomem *Y. pseudotuberculosis*, w którym wykryto 18 z 21 obecnych u *Y. pestis* wysp genomowych. Przykładem są tutaj geny toksyn owadzie (np. *tcaB*) [45]. Na jednej z wysp patogenności kodowany jest także drugi system sekrecji typu III, homologiczny do kodowanego na SPI 2 *S. enterica* serovar Typhimurium, choć nie wydaje się pełnić równie ważnej funkcji w namnażaniu wewnątrzkomórkowym jak u *Salmonella*.

Międzygatunkowe porównania zawartości i funkcjonalności wysp genów pomiędzy *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis* wykazały, że u tego ostatniego gatunku wiele z tych genów jest nieaktywnych. Analizy te wniosły bardzo wiele w zrozumienie mechanizmów mikroewolucji i pomogły stworzyć wiarygodny model rozwoju *Y. pestis* w kierunku wysoce patogennego

gatunku. Uwagę zwraca tu zwłaszcza rola toksyn owadzie i ich późniejszej inaktywacji, w przystosowaniu się bakterii do wykorzystywania pcheł jako wektora transmisji.

5. Czynniki wirulencji kodowane na plazmidach: pCD1, pPCP1 oraz pMT1

Plazmid pCD1, homologiczny do plazmidu pYV *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica*, określane także pCad, pVW, pYV, lub pLcr wyizolowany ze szczepu CO92 *Y. pestis* ma wielkość 70 305 pz, natomiast plazmid ze szczepu KIM10 – 70 509 pz. Różnicę w wielkości przypisuje się delecji 212 pz w sekwencji IS285 [3]. Zawartość par GC wynosi 44,8% (KIM10). Na plazmidzie rozpoznano dużą liczbę różnych sekwencji insercyjnych (głównie IS100 i IS285) i transpozonów. Dwa geny kodujące: *YadA*, ważny czynnik adhezji oraz oporności na surowicę u *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* oraz lipoproteinę YlpA są nieaktywne (w wyniku delecji prowadzącej do zmiany ramki odczytu – *ang.* frameshift). Odnaleziono natomiast funkcjonalne homologi wszystkich białek Yop i Ysc systemu sekrecji III typu, zlokalizowanych na plazmidzie pYV u *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica*. Jednak sam układ genów plazmidu pCD1 uległ znaczącej rearanzacji w stosunku do plazmidów pYV tych dwóch enteropatogennych gatunków [25].

Kodowane na plazmidzie pCD1 białka Ysc systemu sekrecji, tworzą strukturę „molekularnej strzykawki”, za pomocą której białka efektorowe Yop dostają się do cytoplazmy komórek eukariotycznych. Paraliżując funkcje makrofagów, białka te chronią komórki bakteryjną przed fagocytozą. Efektem działania białek Yop jest hamowanie nieswoistej odpowiedzi immunologicznej (od blokowania odpowiedzi zapalnej do indukcji apoptozy makrofagów włącznie). Cały system sekrecji III typu ma pierwszorzędne znaczenie dla wirulencji gatunków *Yersinia*, zapewniając przeżycie w organizmie gospodarza [21].

Plazmid pPCP1 (określany także jako pPst, pPla) jest to najmniejszy z typowych plazmidów *Y. pestis* (9 610 pz w szczepie KIM10, 45,3% zawartości par GC) i zawiera geny: pestycyny (bakteriocyna), oporności na pestycynę (wprowadzają presję selekcyjną w kierunku utrzymania plazmidu na zasadzie klasycznego systemu toksyna – antytoksyna) oraz aktywatora plazminogenu (proteaza Pla) [3].

Białko Pla o masie cząsteczkowej 34,6 kDa posiada aktywność proteolityczną w stosunku do plazminogenu, aktywując go do plazminy. W dodatku Pla inaktywując inhibitor plazminy, alfa 2-antyplazminę prowadzi do niekontrolowanej proteolizy plazminy, co ułatwia bakteriom rozprzestrzenianie się w organizmie

gospodarza, głównie wskutek likwidacji skrępow fibryny i innych mechanicznych przeszkód, np. składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Jednakże rola proteazy Pla w wirulencji pałeczki dżumy była przez pewien czas kwestionowana, gdyż badane *in vitro* mutanty Pla⁻ zachowywały pełną zjadliwość [38]. Dopiero niedawne badania wykazały, że obecność Pla jest nieodzowna dla efektywnej infekcji przez skórę, a mutanty Pla⁻ zachowują zdolność do infekcji tylko po bezpośrednim przeniknięciu do krwiobiegu [7]. Wyrażanie białka Pla wydaje się mieć też wpływ na śmiertelność zakażonych pcheł, jednak jego rola w organizmie insekta pozostaje bliżej niewyjaśniona.

Prowadzone od 2000 roku badania dowiodły, że *Y. pestis* jest zdolna do inwazji komórek nabłonkowych, mimo braku kluczowych dla tego procesu adhezyn i inwazyj (YadA i Inv), obecnych u spokrewnionych enteropatogenów. Badania wykazały także niewielką rolę domniemanych czynników inwazji, jak np. antygeny pH6 i białka CafI, wskazując równocześnie na proteazę Pla jako główną adhezynę, a prawdopodobnie także inwazyję *Y. pestis* [12]. Udało się także rozdzielić aktywność proteolityczną od właściwości adhezyjnych i inwazyjnych białka Pla. Ponadto w strukturze trzeciorzędowej Pla zidentyfikowano motyw odpowiadający za wiązanie białka z lipidem A lipopolisacharydu (LPS). Ostatnio dowiedziono także, że O-antygen gładkiej formy LPS może sterycznie hamować aktywność proteolityczną Pla, co sugeruje że w ewolucji *Y. pestis* utrata O-antygeny w cząsteczce LPS dawała przewagę selekcyjną związaną z funkcjonowaniem białka Pla [43].

Wielkość trzeciego plazmidu *Y. pestis* – pMT1 (określany także jako pFra, pTox lub pYT) w szczepie KIM10 wynosi 100 984 bp; a zawartość par GC – 50,2%. Plazmid zawiera kilka kopii elementów insercyjnych, m.in. dwie kopie IS100 i jedną kopię IS200 (ich obecności przypisuje się inwersje w układzie genów obserwowane w porównaniu do plazmidów izolowanych z innych szczepów). Na plazmidzie pMT1 znajduje się kilka genów o znanej roli w wirulencji *Y. pestis*, np. gen toksyny mysiej – *ymt* i antygeny F1 – *cafI* wraz z genami białek regulatorowych i pomocniczych (np. regulator CafIR i białko opiekuńcze CafIM). Poza tym, plazmid zawiera ok. 40 ORF-ów o nieznanym funkcjach (m.in. ORF-y homologiczne do genu piliny *E. coli* i genu transportera z rodziny ABC) [26].

Antygen F1 to wyrażane w 37°C białko występujące w formie wysokocząsteczkowych (kilka MDa) polimerów, otaczających komórkę bakterii dwuwarstwową otoczką. Polimery utworzone są prawdopodobnie przez dimeryczne podjednostki połączone wiązaniami wodorowymi. Otoczka chroni bakterie przed fagocytozą ze strony monocytów.

Toksyna mysia (Ymt) jest białkiem wielkości 61 kDa, tworzącym polimery o masach cząsteczkowych 120 kDa

i 240 kDa. Toksyna mysia należy do rodziny fosfolipaz D. Jej rola w wirulencji została potwierdzona eksperymentalnie. Udowodniono, że jest to czynnik zwiększający śmiertelność w populacjach zakażonych gryzoni i co ważniejsze, wymagany do przeżycia bakterii w przewodzie pokarmowym pchły [23]. Badania prowadzone nad wyizolowaną z komórek bakterii toksyną przyniosły odpowiedzi odnośnie aktywności katalitycznej i specyficzności substratowej Ymt, jednak mechanizmy jej działania jako czynnika wirulencji pozostają nieznane [42]. Również kwestia specyficzności działania Ymt wobec przedstawicieli rodziny *Muridiae* (Myszowate) nie została wyjaśniona. Wcześniejsze badania sugerowały, że Ymt może działać poprzez blokadę receptora β -adrenergicznego doprowadzając do zapaści (co wyjaśniałoby toksyczny efekt u myszy i szczurów), hipoteza ta nie została jednak potwierdzona [38]. Innym postulowanym mechanizmem działania jest ochrona komórek przed toksycznymi produktami trawienia surowicy krwi w jelicie pchły [24].

Warto podkreślić, że ponad 50% sekwencji nukleotydowej plazmidu wykazuje bardzo duże podobieństwo (ponad 95%) do kryptycznego plazmidu pHCM2 obecnego w szczepach *Salmonella enterica* serovar Typhi, przy czym homologiczne rejony nie tworzą ciągłego obszaru, lecz są rozsiane po plazmidzie. Zawartość par GC w tych sekwencjach jest bliższa rodzajowi *Salmonella* niż *Yersinia*, co sugeruje enteropatogenne pochodzenie prototypowego plazmidu. Wydaje się zatem prawdopodobne, że między patogenami tych rodzajów zachodziła i nadal zachodzi wymiana materiału genetycznego, choć nie wykluczono też możliwości nabycia plazmidów z odrębnych źródeł [3].

Plazmid pYC jest kryptycznym plazmidem o wielkości 5,9 pz, izolowany ze szczepów *Y. pestis* w Chinach, nie zawiera żadnych wykrytych czynników wirulencji. Odnaleziono na nim 12 ORF-ów, z czego 3 kodują białka homologiczne do znanych białek (m.in. indukowanych uszkodzeniami białek DinJ1 i DinJ2 *E. coli*). Postuluje się rolę tych białek w zwiększaniu zdolności *Y. pestis* do przetrwania niesprzyjających warunków, choć nie obserwuje się u tych bakterii wyraźnie zmienionego fenotypu. Obszar, z którego izoluje się bakterie zawierające pYC stopniowo się powiększa [3], co zdaje się potwierdzać hipotezę, że obecność tego plazmidu daje *Y. pestis* pewne korzyści selekcyjne.

6. Struktura genomu *Y. pestis*.

Inne elementy mające wpływ na patogenność

Zsekwencjonowany genom *Y. pestis* CO92 ma wielkość 4 653 728 pz i procentową zawartość par GC równą 47,64%. W porównaniu z nim, genom *Y. pestis* KIM jest o ok. 50 kb mniejszy (4 600 755 bp) i zawiera

4 198 ORF-ów (z czego zaledwie 3 672 odpowiada ORF-om szczepu CO92) [14, 37]. Różnice wielkości przypisuje się większemu udziałowi elementów insercyjnych w genomie szczepu CO92. Ponadto występuje też szereg innych różnic między genomami obu szczepów, m.in.: jeden dodatkowy operon tRNA w sekwencji szczepu KIM oraz znaczny stopień rearanżacji układu genów, zwłaszcza typu inwersji. Charakterystyczne jest występowanie trzech tzw. regionów MIR (multiple inversion regions), w których obserwuje się szczególnie dużo inwersji przy porównaniu obu sekwencji. Dane te świadczą o tym, że genom *Y. pestis* jest wciąż obiektem nieustannych zmian, w przeciwieństwie do dość stabilnych genomów spokrewnionych enteropatogenów.

Zawartość elementów insercyjnych (IS)

Projekty sekwencjonowania genomów *Yersinia* przyniosły dość niespodziewane dane dotyczące liczby obecnych IS, która okazała się nadspodziewanie duża, zwłaszcza w porównaniu z blisko spokrewnioną *Y. pseudotuberculosis*. W sekwencji chromosomów i plazmidów *Y. pestis* CO92 odnaleziono 138 elementów insercyjnych, a u *Y. pestis* KIM – 117 [37]. Najczęściej występującym elementem insercyjnym jest IS1541, następnie IS100, IS285 i IS1661. Natomiast liczba IS w genomie *Y. pseudotuberculosis* nie przekracza 20 (są to także głównie IS1541 i IS100; ich liczba waha się pomiędzy szczepami) [10]. Umieszczenie 12 z tych elementów odpowiada układowi obserwowanemu w obu szczepach *Y. pestis*. Porównanie miejsc integracji IS do genomów szczepów *Y. pestis* CO92 i KIM pozwoliło na stwierdzenie, że ich wspólny przodek miał 109 IS, a więc od czasu rozejścia się linii ewolucyjnych doszło do, odpowiednio, 28 i 8 nowych integracji. Z kolei porównania pomiędzy *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* dotyczące układu konserwowanych bloków genów pozwoliły na ustalenie prawdopodobnych miejsc rekombinacji genomowych i przybliżonej struktury genomów bakterii będących przodkami izolowanych dziś patogenów. Stwierdza się obecnie, że elementy insercyjne i powodowane przez ich obecność rekombinacje odegrały znaczącą rolę w różnicowaniu się pałeczki dżumy.

Duża liczba i aktywność elementów IS są prawdopodobnie głównymi czynnikami odpowiadającymi za niestabilność genomu *Y. pestis* [46]. Przykładem tego jest obserwowana u co najmniej dwóch szczepów znaczna niestabilność wzorów restrykcyjnych genomów, zdradzająca zachodzenie ciągłych rearanżacji genomowych, utrzymująca się nawet po wielokrotnych pasażach [3].

Innym zaobserwowanym efektem obecności elementów IS w genomie *Y. pestis*, wskazującym na ich rolę w gwałtownych przetasowaniach strukturalnych,

są anomalie w typowym układzie nukleotydów na nici prowadzącej i opóźnionej. Po zsekwencjonowaniu genomów kilku gatunków bakterii odkryto zauważalną preferencyjność występowania guaniny na nici wiodącej w replikacji. U *Y. pestis* zaobserwowano natomiast trzy duże anomalie sekwencji bogatych w guaniny (jedną translokację i dwie inwersje), z których każda oflankowana jest elementami insercyjnymi, co sugerowało zajście homologicznej rekombinacji. Przeprowadzone następnie badania (za pomocą reakcji PCR) wykazały, że w populacji bakterii sekwencje te mogą występować w obu orientacjach, dając w rezultacie kilka możliwych wariacji strukturalnych genomu. Rearanżacje wydają się być częste i zachodzić powszechnie podczas wzrostu mikroorganizmów, ale ich wpływ na wirulencję pozostaje bliżej niezbadany [37, 46].

Należy też zauważyć, że elementy insercyjne odpowiedzialne są za inaktywację znacznej części pseudogenów odnajdywanych w genomach szczepów *Y. pestis*, co nie jest powszechnie spotykanym zjawiskiem, jako że najczęstszym mechanizmem inaktywacji genów są mutacje typu frameshift, powodowane przez niewielkie delecje. Podobną do *Y. pestis* tendencję obserwuje się u *Shigella flexneri*, również dość młodego ewolucyjnie patogenu (ok. 270 000 lat od czasu wyodrębnienia z *E. coli*) [32].

Zawartość pseudogenów

Chociaż genomy bakteryjne z reguły są zwarte i zawierają stosunkowo mało niekodującego DNA, pseudogeny spotykane są powszechnie i występują nawet w najmniejszych bakteryjnych genomach. Jednak koncepcja roli utraty genów lub ich inaktywacji w ewolucji patogenych drobnoustrojów powstała stosunkowo niedawno, gdy zsekwencjonowano genomy organizmów takich jak: *Rickettsia prowazekii*, *Mycobacterium leprae* i patogenów z rodzaju *Yersinia*.

Wczesne badania postulowały obecność 149 pseudogenów w genomie *Y. pestis* [37], a nawet ponad dwukrotnie większej liczby [36]. Badania z 2004 roku ustaliły liczbę pseudogenów na 208, z czego 84 jest obecnych w postaci funkcjonalnej u IP32953 *Y. pseudotuberculosis*, a inaktywowanych w KIM10 *Y. pestis*. Pozostałe 124 geny są nieczynne u KIM10 i CO92 *Y. pestis*, lecz tylko dwa z nich mają funkcjonalne homologi u *Y. pseudotuberculosis*. Lista wykrytych pseudogenów nie jest w żadnym razie zamknięta, gdyż wyniki najnowszych badań (przeprowadzanych metodą wielokrotnych porównań sekwencji spokrewnionych drobnoustrojów) podają liczbę 337 pseudogenów w genomie *Y. pestis* (co stanowi jego 8%) i 186 w genomie *Y. pseudotuberculosis* (poprzednie badania wykazały obecność 62). Powstawały one najczęściej wskutek wspomnianych już mutacji typu frameshift i obecności elementów insercyjnych oraz mutacji

nonsensownych [32]. Warto dodać, że w niektórych przypadkach, przy zastosowaniu odpowiednich podłoży selekcyjnych, możliwe jest przywrócenie pierwotnej funkcji genu.

Generalnie, pseudogeny występują częściej u młodych ewolucyjnie, wysoko zjadliwych patogenów (jak *Y. pestis*) niż u ich mniej zjadliwych, a pokrewnych gatunków (*Y. pseudotuberculosis*). Akumulacja ta jest efektem działania głównie dwóch czynników. Pierwszym jest obfitość substancji odżywczych w organizmie gospodarza, która czyni bezużytecznymi wiele genów metabolizmu, potrzebnych drobnoustrojom w środowisku zewnętrznym. Drugim jest zmniejszenie efektywnej wielkości populacji patogenu, która bierze udział w infekcji. Prowadzi to do obniżenia presji selekcyjnej i akumulacji delecji w populacji. Te same przyczyny leżą u podstaw nagromadzenia elementów insercyjnych, które powodują powstawanie kolejnych pseudogenów. W przypadku *Y. pestis* nabycie zdolności do kolonizowania pcheł pozwoliło na uzyskanie dostępu do substancji odżywczych (aminokwasy, nukleozydy, witaminy) i źródeł energii (D-glukoza i kwasy tłuszczowe) rozpuszczonych w pobieranej przez insekta krwi. Zgodnie z podanym wyżej mechanizmem, spowodowało to utratę genów odpowiedzialnych za np. fermentację złożonych węglowodorów czy syntezę pewnych aminokwasów. Poza tym, w przypadku niektórych mutacji, niewykluczone jest, że zaszły późno w ewolucji i przyczyniły się efektywnie do zwiększenia wirulencji. Rozważa się możliwość, że np. utrata funkcji aspartazy (prowadząca do zmian w metabolizmie kwasu L-glutaminowego) lub dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu (uniemożliwiająca wykorzystywanie szlaku pentozofosforanowego) mogła okazać się korzystna dla patogenów i powodować nasilenie objawów chorobowych [7].

Należy w tym miejscu zaznaczyć rolę jaką miało nabycie genów toksyn owadzych (jeszcze przed wyodrębnieniem się *Y. pseudotuberculosis*), a następnie ich inaktywacja, w procesie kolonizowania organizmu pchły. *Y. pseudotuberculosis* posiada na chromosomie geny kompleksów toksyn owadzych, należące do trzech rodzin genowych (*tcaA/tcaB/tcdA*, *tcaC/tcdB* i *tccC*). Ich obecność sugeruje, że patogen ten jeszcze przed wyodrębnieniem się *Y. pestis* był w stanie zakażać i zabijać owady, prawdopodobnie w celu pozyskania dodatkowych substancji odżywczych. Homologi tych genów są obecne u *Y. pestis*, lecz tylko gen *tcaA* zachował funkcjonalność. Gen *tcaB* zawiera mutację typu frameshift, a gen *tcaC* wewnętrzną delecję [37]. Inaktywacja tych genów mogła okazać się konieczna, by wykorzystać możliwości transmisji, które otworzyło nabycie plazmidu pMT1, w połączeniu z produktami *locus* Hms. Jednak wyniki badań z 2004 roku przeczą hipotezie jakoby inaktywacja *tcaB* była niezbędna do transmisji

poprzez owada, gdyż gen ten został odnaleziony w kompletnej formie u kilku w pełni wirulentnych szczepów z biotypów *Mediaevalis* i *Antiqua* [10]. Kwestia roli mutacji w tych genach pozostaje więc na razie nie rozstrzygnięta.

Na uwagę zasługuje też utrata przez *Y. pestis* wielu genów związanych bezpośrednio z wirulencją *Y. pseudotuberculosis*. Inaktywacji uległo wiele genów związanych z inwazją tkanki nabłonkowej jelita jak np. *inv*, *yadA*, *ureD* (wszystkie z nich należą do podstawowych czynników wirulencji *Y. pseudotuberculosis*, a także *Y. enterocolitica*) oraz genów struktury i biosyntezy rzęsek. Inne pseudogeny *Y. pestis*, które wpływają na zwiększenie inwazyjności u innych patogenów (np. u zjadliwych szczepów *E. coli*) to m.in. geny intyminy oraz czynnika CNF (który oddziałując z Rho-GTPazami wpływa na rearanżacje cytoszkieletu komórek eukariotycznych). Inaktywacja tych genów w toku ewolucji dobrze odzwierciedla proces adaptacji pałeczki dżumy do nowej niszy; utratę możliwości infekcji poprzez układ pokarmowy na rzecz transmisji z udziałem insekta i rozprzestrzenianie się w organizmie wraz z krwią. Trudno było za to początkowo wytłumaczyć charakterystyczną cechę fenotypu *Y. pestis*, jaką jest obecność „szorstkiego” lipopolisacharydu, tj. pozbawionego bocznego łańcucha O-swoistego (co jest efektem mutacji w pięciu genach, m.in. *wzy*). U *Y. pseudotuberculosis* jest on obecny, zawiera rzadko spotykane cukry, 3,6-dideoksyheksozy i uważany był pierwotnie za ważny czynnik wirulencji, któremu przypisywano rolę m.in. w obronie bakterii przed składnikami osocza, fagocytozą oraz kationowymi peptydami produkowanymi w jelicie cienkim przez komórki Panetha [37]. Utrata łańcucha O-swoistego wydawała się więc niekorzystna dla wirulencji *Y. pestis*. Jednak nowsze badania wskazują, że jego rola polega raczej na ochronie enteropatogenów poza organizmem gospodarza (szczepy *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* hodowane w temperaturze 37°C w ogóle nie syntetyzują łańcuchów O-swoistych) oraz, że to właśnie „szorstka” forma LPSu odpowiada za skuteczną obronę przed układem dopełniacza i innymi składnikami ludzkiego osocza oraz indukuje bardzo słabą nieswoistą odpowiedź immunologiczną [7]. Ostatnio wykazano także, że genetycznie zmodyfikowany szczep *Y. pestis* syntetyzujący kompletny LPS nie jest w stanie wywołać systemowej infekcji na modelu mysim [34].

7. Badania nad pokrewieństwem ewolucyjnym patogennych gatunków z rodzaju *Yersinia*

Już w latach siedemdziesiątych XX wieku próbowano ustalić stopień pokrewieństwa między patogennymi gatunkami *Yersinia*. Dopiero jednak przeprowadzone

w końcu XX wieku badania nad pokrewieństwem ewolucyjnym tych trzech gatunków przyniosły ostateczne potwierdzenie wcześniejszych spostrzeżeń o bliskim pokrewieństwie *Y. pestis* z *Y. pseudotuberculosis* oraz zaskakujące wyniki dotyczące prawdopodobnego czasu specjacji *Y. pestis*. Badania te prowadzono używając metody MLST (Multi Locus Sequence Typing). Zsekwencjonowano odcinki (każdy o wielkości ok. 400 bp) pięciu genów metabolizmu podstawowego (*thrA*, *trpE*, *glnA*, *tmk*, *dmsA*) oraz genu fosfo-mannomutazy *manB*, zaangażowanej w syntezę lipopolisacharydu. Źródłem sekwencji było 36 szczepów *Y. pestis*, 12 szczepów *Y. pseudotuberculosis* i 13 szczepów *Y. enterocolitica*. Wykryte różnice w sekwencjach tych genów stanowiły podstawę do analiz filogenetycznych. Potwierdzona została w ten sposób przynależność gatunkowa wszystkich zbadanych szczepów *Y. pestis* (praktyczny brak różnic w allelach wszystkich sześciu genów), wskazując jednocześnie, że wyodrębnienie się ze wspólnego przodka zaszło niedawno. Natomiast różnice pomiędzy szczepami *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* nie były znacząco większe niż w obrębie szczepów samej *Y. pseudotuberculosis*. Niewielka liczba zmian polimorficznych, stanowiących element zmienności genomu (zmian w sekwencji nukleotydowej DNA występujących w populacji z częstością większą niż 1%, ale nie prowadzących do zmian w sekwencji polipeptydowej i cech fenotypowych) dowiodła, że *Y. pestis* jest klonem *Y. pseudotuberculosis* i to niedawno wyodrębnionym. Natomiast pokrewieństwo do *Y. enterocolitica* okazało się dalsze niż przypuszczano, odpowiadając dystansem genetycznym relacji *E. coli* z *Salmonella* sp. [2].

Do określenia prawdopodobnego czasu wyodrębnienia się *Y. pestis* zastosowano metodę zegara molekularnego. Ta zaproponowana w latach 60-tych analiza opiera się na hipotezie, która zakłada stałe tempo zachodzenia podstawień nukleotydowych w czasie. Znając tempo podstawień można, na podstawie różnic w sekwencji alleli, określić czas dywergencji sekwencji wyjściowej. Głównym problemem ograniczającym użycie zegara jest skalibrowanie go, gdyż tempo zmian jest różne dla różnych organizmów i może się zmieniać nawet w obrębie gatunku. Ponadto należy zauważyć, że metoda ta pozwala określić czas, jaki upłynął od wyodrębnienia się wspólnego przodka, tzw. „molekularnej Ewy”, nie zaś czas specjacji. Wykazano jednak, że w przypadku *Y. pestis* „molekularna Ewa” mogła rzeczywiście być przodkiem wyodrębnionego później gatunku (m.in. ze względu na brak głęboko zakorzenionych różnic w stosunku do *Y. pseudotuberculosis*) [16]. Wyliczane na podstawie różnych danych (m.in. porównań z czasem specjacji *Salmonella* sp.) tempa podstawień wahały się od 6×10^{-9} (podstawień/parę/rok) do 3×10^{-8} nagromadzonych polimorfizmów na

rok. W oparciu o te założenia oceniono czas zaistnienia „molekularnej Ewy” dla *Y. pestis* i *Y. enterocolitica* na 41–186 milionów lat wstecz. Analogicznie, wspólny przodek dla *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* istniał około 0,4–1,9 miliona lat temu. Natomiast czas zróżnicowania się *Y. pestis* jako „gatunku” określono na 1 500 – 20 000 lat temu [2].

Choć wyniki te spotkały się z zainteresowaniem i były szeroko cytowane w literaturze naukowej, w 2004 roku ten sam zespół badawczy wskazał na niedoskonałości zastosowanej metody i zaproponował jej udoskonalenie. Ponieważ zaobserwowane niedokładności zależały od użytej do kalibrowania zegara molekularnego metody, tym razem oparto wnioskowanie na danych zebranych przy użyciu trzech technik: poszukiwania synonimicznych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (sSNP), analizy zróżnicowania liczby tandemowych powtórzeń (MLVA) i analizy wzorów insercji elementów IS100.

Należy zauważyć, że zwłaszcza MLVA zyskała w ostatnich latach uznanie jako wartościowa metoda genotypowania. Spośród innych używanych metod trudno o taką, która łączyłaby wysoką zdolność rozdzielczą, prostotę wykonania oraz powtarzalność z możliwością łatwego porównywania danych między ośrodkami badawczymi. Analiza metodą MLST charakteryzuje się znacznie mniejszą rozdzielczością niż MLVA, pochłaniając jednocześnie dużo czasu. Typowanie elementów IS w połączeniu z metodą „Southern blot” daje bardzo dobre wyniki, jednak otrzymane dane trudno porównywać z wynikami z innych laboratoriów. Modyfikacja tej metody, typowanie PCR-IS, ułatwia wymianę danych, lecz otrzymywana zdolność rozdzielcza jest już dużo mniejsza [39]. MLVA opiera się na wykrywaniu różnic w zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń (VNTR – Variable Number of Tandem Repeats) w różnych *loci* na chromosomie bakterii, które można łatwo i szybko wykryć poprzez zastosowanie metody PCR z użyciem specyficznych starterów. Ponadto istnienie wielu różnych wariacji liczby powtórzeń w porównywanych *loci* znacznie zwiększa zdolność rozróżnienia blisko spokrewnionych izolatów, co okazało się bardzo istotne w przypadku badań nad *Yersinia* [28], zwłaszcza dla ustalenia filogenetycznego pokrewieństwa drobnoustrojów izolowanych z różnych *foci* na świecie (brak było wcześniej wygodnej metody mogącej wykryć drobne różnice w wysoce homogenym, w obrębie gatunku, genomie *Y. pestis*). Ostatnia z zastosowanych metod, poszukiwanie sSNP, okazała się również zbyt mało rozdzielcza w stosunku do wysoce monomorficznej pałeczki *Y. pestis*. Wyniki otrzymane tą metodą łatwo za to interpretować w kontekście ewolucyjnym.

Zastosowanie tych metod do analizy 156 szczepów *Y. pestis* (zróżnicowanych pod względem gospodarza,

obszaru geograficznego i czasu izolacji) oraz przyjęcie do obliczeń bardziej poprawnego tempa podstawięń ($3,4 \times 10^{-9}$) pozwoliło na dokładniejsze określenie czasu wyodrębnienia się różnych biotypów *Y. pestis* [1]. Czas istnienia wspólnego przodka szczepów CO92 i KIM oceniono na ok. 6 500 lat temu, a wyodrębnienie szczepu 91 001 (biotyp *Microtus*) zaszło jeszcze dawniej (ok. 10 000 lat temu). Porównania ze szczepem IP32953 *Y. pseudotuberculosis* spowodowały uściślenie prawdopodobnego czasu specjacji *Y. pestis* do ok. 13 000 lat temu.

Podstawowe znaczenie dla analiz filogenetycznych w rodzaju *Yersinia* ma oczywiście fakt kompletnego zsekwencjonowania genomów dwóch szczepów *Y. pestis*: KIM10 i CO92, a także szczepu IP 32953 *Y. pseudotuberculosis* i 8081 *Y. enterocolitica*. Porównawcze analizy tych genomów dostarczyły ogromnej ilości danych o zmianach postępujących w nich na przestrzeni tysięcy lat, a w szczególności o roli wysp genomowych i elementów insercyjnych. Na podstawie danych dotyczących genów unikatowych dla każdego z tych patogenów można także wnioskować o ich ewolucyjnej historii po zajęciu dywergencji. W szczepie IP32953 *Y. pseudotuberculosis* wykryto 317 genów (w 36 specyficznych regionach), nie mających swoich odpowiedników w żadnym ze szczepów *Y. pestis*, z czego ok. 80 najprawdopodobniej uległo insercyjnym delecjom w toku ewolucji. Pozostała część genów (nieobecnych u pałeczki dżumy) może być efektem zachodzenia horyzontalnego transferu genów u *Y. pseudotuberculosis* już po „specjacji” *Y. pestis* [10]. Z drugiej strony, wykryto 112 genów (w 21 regionach) specyficznych dla pałeczki dżumy, z czego 14 udało się przypisać funkcje (m.in. białek błonowych, lipoprotein, esterazy i metylotransferazy), o nie potwierdzonym jeszcze wpływie na wirulencję. Poza tym, stopień homologii DNA pomiędzy *Y. pseudotuberculosis* a *Y. pestis* został określony dokładniej i oceniony na ok. 97%, niezmienną w znacznym stopniu jest także organizacja genomów obu patogenów.

8. Relacje wewnątrzgatunkowe i taksonomia *Y. pestis*

Klasyczny podział gatunku *Yersinia pestis* na trzy biotypy: Antiqua, Mediaevalis i Orientalis wciąż pozostaje w powszechnym użyciu w literaturze naukowej. Wprowadzony w 1951 roku przez De v i g n a t a, podział ten opiera się jedynie na wybranych cechach biochemicznych szczepów i nie wydaje się w żaden sposób korelować ze stopniem wirulencji szczepów względem zwierząt i człowieka [45]. Nie uwzględnia on także znacznej ilości izolowanych szczepów atypowych, które wykazują często unikalne właściwości. Brak także dowodów na bezpośrednie powiązania tych

trzech biotypów z trzema pandemiemi, co sugerował De v i g n a t a. Przyczyny długotrwałego utrzymywania się tego podziału mogą leżeć w rozmieszczeniu *foci* dżumy na Ziemi. Choć zasięg *Y. pestis* obejmuje wszystkie kontynenty, za wyjątkiem Australii, to stanowi on zaledwie 6–7% powierzchni lądowej. Co więcej, od pewnego czasu nie notowano występowania tego patogenu w Europie Centralnej i Zachodniej, Kanadzie i części Ameryki Północnej i Południowej. Pałeczkę dżumy izolowano natomiast na terenie Mongolii, Chin i krajów byłego Związku Radzieckiego. Szczepy *Y. pestis* o znacznej zmienności wewnątrzgatunkowej były tam obiektem dokładnych badań. Niestety wyniki tych prac, opublikowane w języku rosyjskim, przez wiele lat były niedostępne poza tymi krajami. Natomiast piśmiennictwo w języku angielskim dotyczyło w głównej mierze niewielkiej liczby szczepów izolowanych we wschodniej części kontynentu azjatyckiego, gdzie różnorodność wewnątrzgatunkowa pałeczki dżumy jest nieporównywalnie mniejsza (została tam wprowadzona drogą morską na początku dwudziestego wieku, a ostatnia epidemia miała miejsce w latach 1924–1925). Niewielka liczba atypowych szczepów mogła przyczynić się do utrzymania wiarygodności podziału De v i g n a t a. Tymczasem, na przestrzeni dwudziestego wieku, naukowcy z Chin, Mongolii i Związku Radzieckiego opracowali, stosując różne kryteria, kilka klasyfikacji częstokroć znacznie lepiej różnicujących szczepy *Y. pestis* o różnym stopniu wirulencji [3]. Należy zauważyć, że choć ustandaryzowany w 1985 roku (uzupełniony w 1998 r.) podział *Y. pestis* na 6 podgatunków (*Y. pestis pestis*, *Y. pestis altaica*, *Y. pestis caucasica*, *Y. pestis hissarica*, *Y. pestis ulegeica*, *Y. pestis talassica*) pozostaje w powszechnym użyciu w krajach byłego Związku Radzieckiego, to wciąż izoluje się znaczną ilość szczepów atypowych, które trudno zaklasyfikować jednoznacznie do któregoś z tych podgatunków. Jest to bardzo istotne, gdyż szczepy te niejednokrotnie charakteryzują się odmienną od typowej wirulencją. Stwierdzono także, że niektóre z cech używanych do wyznaczenia podgatunków podlegają pewnej zmienności także w ich obrębie. Dodatkowo, brak konsensusu w kwestii zdefiniowania bakteryjnego gatunku (a więc i pochodnych taksonów) także utrudnia wszelkie próby klasyfikacji.

Wprowadzenie do użytku nowych metod badawczych pozwoliło zbadać mechanizmy leżące u podstaw tak wysokiej zmienności. Użycie PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) pozwoliło stwierdzić, że szczepy izolowane w różnych *foci* mają tę samą wielkość chromosomu, ale różnią się wzorami restrykcyjnymi. Badania nad pokrewieństwem ewolucyjnym *Y. pestis* z *Y. pseudotuberculosis*, prowadzone na większej liczbie szczepów obu gatunków przy użyciu metod takich jak hybrydyzacja DNA, rybotypowanie, MLVA i in-

nych oraz dane pochodzące z projektów sekwencjonowania genomów *Y. pestis* CO92 i KIM pozwoliły stwierdzić, że mechanizmy odpowiadające za zmienność pałeczki dżumy są wciąż bardzo aktywne i leżą u podstaw znacznego zróżnicowania, obserwowanego nawet wśród izolatów z jednego foci. Za ową tzw. „metastabilność fenotypu” odpowiadają głównie: duża liczba odwracalnych rearanżacji genomowych (powodowanych udziałem IS), zmiany w liczbie tandemowych powtórzeń (wykrywane metodą MLVA), mutacje typu frameshift w genach regulatorowych (wskutek insercji IS, błędów systemów naprawy itp.) oraz niestabilna (nawet w obrębie populacji) liczba plazmidów, która stała się podstawą wyodrębnienia plazmidowarów.

Poznanie tych faktów uświadomiło potrzebę opracowania nowej taksonomii dla *Y. pestis*, oddającej prawdziwe powiązania filogenetyczne. Taksonomia taka nie może się opierać na cechach fenotypowych, gdyż w obliczu znacznej zmienności mutacyjnej takie same fenotypy mogą się pojawiać w różnych liniach ewolucyjnych. Przeprowadzone w 2004 roku badania nad grupą szczepów zaklasyfikowanych do biotypu Mediaevalis (na podstawie ich niezdolności do redukcji azotanów), ale niezdolnych także do fermentacji arabinozy i awirulentnych dla ludzi, dowiodły ich odmiennego profilu genomowego, który pozwolił wyodrębnić tę grupę w nowy biotyp: Microtus [47]. Ta sama cecha fenotypowa (niezdolność do redukcji azotanów) okazała się być efektem dwóch różnych mutacji w genie *napA* (w 205 kodonie w biotypie Mediaevalis i 341 w Microtus), co stwierdzono przy pomocy metody PCR, stosując specyficzne startery. Także za pomocą tej metody udowodniono, że glicerolo-negatywny fenotyp biotypu Orientalis jest efektem pojedynczej delekcji o wielkości 93 kb w genie *glpD* u wszystkich badanych szczepów [47].

Równoległe prowadzone badania potwierdziły gatunkową przynależność szczepów biotypu Microtus oraz szczepów zgrupowanych w biotypie *pestoides* (wcześniej ze względu na zdolność do fermentacji ramnozy i melibiozy, rozpatrywano możliwość zaklasyfikowania ich w randze podgatunku *Y. pseudotuberculosis*, a nawet wyodrębnienia jako osobnego gatunku). Analizy porównawcze prowadzone przy użyciu trzech metod (sSNP, MVLA i badanie wzorów insercji IS100), dzięki którym otrzymano dokładniejsze dane na temat ewolucyjnego dystansu dzielącego *Y. pseudotuberculosis* od wybranych szczepów *Y. pestis*, pozwoliły także na zweryfikowanie monofiletyczności klasycznych biotypów według podziału *Devignata*.

Na podstawie tych wyników zaproponowano nowy podział w oparciu o osiem populacji wydzielonych za pomocą metod grupowania molekularnego. Stwierdzono, że biotypy Antiqua i Mediaevalis są polifiletyczne, a ich cechy charakterystyczne (jak np. niezdolność do

redukcji azotanów) występują u izolatów z różnych, nawet dość filogenetycznie odległych grup (w wyniku różnych mutacji o identycznym lub podobnym efekcie fenotypowym, co jest zgodne z wynikami drugiego zespołu, opisanymi wyżej). Także biotyp *Y. pestis pestoides* zbiera drobnooustroje z różnych grup ewolucyjnych, a wspólna im zdolność do fermentacji ramnozy i melibiozy także nie ma przełożenia na bliskość filogenetyczną.

Wraz z kontrowersjami, które zaczął wzbudzać podział *Devignata*, pojawiły się też wątpliwości co do roli *Y. pestis* jako czynnika etiologicznego pandemii z szóstego i czternastego wieku, gdyż poglądy tego uczonego wspierane były głównie przez przekazy historyczne. Rozpatrywano także możliwość, że pandemie te mogły zostać wywołane przez *Bacillus anthracis* lub *Rickettsia prowazekii*. W 2000 roku użyto zmodyfikowanej metody PCR do analizy DNA otrzymanego z miazgi zębowej zwłok trzech osób z czternastowiecznego grobu we Francji. Przy użyciu starterów komplementarnych do części genu *pla* i unikatowych sekwencji *B. anthracis* i *R. prowazekii* potwierdzono, że średniowieczna epidemia była w rzeczywistości dżumą [41]. W świetle ostatnich badań pozostały jednak wątpliwości co do biotypu (bądź inaczej określonej grupy szczepów) odpowiedzialnego za tę epidemię. Dopiero zastosowanie w 2004 roku nowej metody: MST (Multi Spacer Typing) do analizy DNA pozostałości zębowych ośmiu osób zmarłych prawdopodobnie podczas I i II pandemii, pozwoliło stwierdzić, że obie zostały wywołane przez szczepy klasyfikowane dziś do biotypu Orientalis [15].

9. Zastosowanie filogenomiki porównawczej do badania ewolucji *Y. enterocolitica*

Pałeczki *Y. enterocolitica*, ze względu na różnice w patogenności, tradycyjnie zaliczane są do trzech grup, tj. niepatogenne (biotyp 1A), o niskiej patogenności (biotypy 2–5) oraz silnie patogenne (biotyp 1B). W oparciu o metodę hybrydyzacji DNA-DNA i analizę sekwencji 16S rRNA *Neubauer* i wsp. [35] zaproponowali podział *Y. enterocolitica* na dwa podgatunki, *Y. enterocolitica* podg. *enterocolitica* dla szczepów pochodzących z Ameryki i *Y. enterocolitica* podg. *palaearctica* dla szczepów europejskich.

Z kolei, w 2006 roku do rekonstrukcji filogenezy szczepów *Y. enterocolitica* wykorzystano genomikę porównawczą opartą o metodę mikromacierzy DNA-DNA oraz filogenetyczną analizę matematyczną metodą bayesowską [22]. Badaniom poddano 94 szczepy *Y. enterocolitica* izolowane od: ludzi – 35 izolatów, świń – 35 izolatów, od owiec – 15 izolatów oraz od bydła – 9 izolatów. Należały one do trzech grup, tj. grupy

izolatów niepatogennych, o niskiej patogenności i silnie patogennych. Przeprowadzona analiza potwierdziła obecność 3 odrębnych kładów różniących się stopniem zjadliwości. Ponieważ z analizy wykluczono sekwencje plazmidu pYV wydaje się, że obecność pYV nie jest głównym czynnikiem decydującym o wirulencji analizowanych szczepów. Kład o wysokiej wirulencji stanowił 8,7% analizowanych szczepów – wszystkie izolowane były od ludzi chorych i należały do biotypu 1B. Szczepy kładu o niskiej wirulencji stanowiły 51% analizowanych szczepów (biotypy 2, 3, 4) izolowanych od zwierząt hodowlanych (bydło, świnie, owce) oraz pacjentów. Jako trzeci wyodrębniono kład niepatogenny. Zawierał on 40,3% badanych szczepów, izolowanych od pacjentów i zwierząt hodowlanych. 94,6% należało do biotypu 1A. Wyniki te potwierdziły tym samym skuteczność dotychczasowego biotypowania jako metody do wyróżniania szczepów *Y. enterocolitica*.

U wszystkich wysoce patogennych szczepów zidentyfikowano 125 przypuszczalnych sekwencji kodujących (CDSs), które nie były obecne w pozostałych kładach. Wśród nich znalazło się kilkanaście CDSs wcześniej nie scharakteryzowanych, które mogą kodować czynniki wirulencji takie jak hemolizyna, metaloproteaza, czy białko efektorowe III typu sekrecji. Wśród tych 125 CDSs były elementy insercyjne oraz białka pochodzenia fagowego.

We wszystkich 47 szczepach o niskiej patogenności i w szczepie *Y. enterocolitica* 8081 zidentyfikowano 27 CDSs, które były nieobecne we wszystkich izolatach niepatogennych. Wśród nich były m.in. CDSs kodujące hipotetyczne białka, w tym jedną proteazę, trzy transpozazy dla IS 1667. Z kolei analiza sekwencji rdzeniowej genomów (geny metabolizmu podstawowego) *Y. enterocolitica* różniących się wirulencją wykazała, że tylko 894 CDSs, tj. 20,8% sekwencji rdzeniowej jest wspólna dla wszystkich szczepów, potwierdzając tym samym wysoką heterogenność tego gatunku.

Chociaż znane są genetyczne różnice pomiędzy odpowiednimi biotypami to nie wyjaśniają one całkowicie różnic w procesie patogenezy. Podobnie wciąż nie wiadomo, czy istnieje zależność między różnymi biotypami, patogennością a rodzajem gospodarza zwierzęcego.

W sensie ewolucyjnym *Y. enterocolitica* uważana jest jako gatunek mało spokrewniony z patogennymi *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis*. Dane uzyskane z analizy genomowego DNA metodą mikromacierzy wykorzystano do utworzenia drzewa filogenetycznego [22, 45]. Chociaż ustalenie ewolucyjnego porządku specjacji czy podspecjacji dla trzech kładów *Y. enterocolitica* jest niemożliwe, to przeprowadzona analiza wykazała bliskie genetyczne pokrewieństwo szczepów o niskiej patogenności z niepatogennymi, ale także dużo bliższe genetyczne pokrewieństwo niepatogennego kładu z wysokopatogennym niż z kładem niskopatogennym. We-

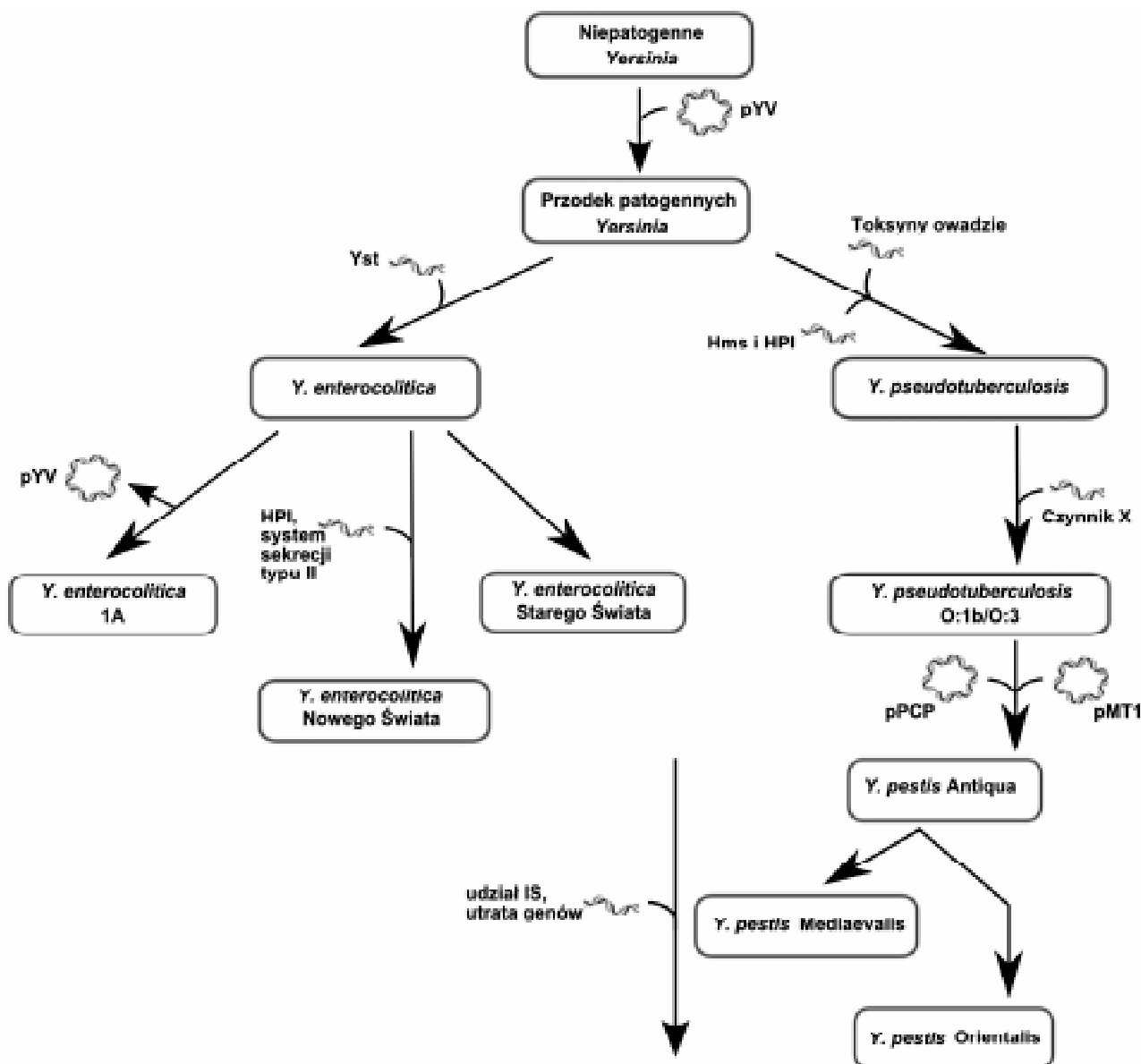
dług jednego ze scenariuszy wydaje się, że kład wysokopatogenny jest bezpośrednim potomkiem wspólnego dla wszystkich *Y. enterocolitica* przodka. Sugeruje to także, że pojawienie się niskopatogennych i niepatogennych szczepów wynikało z biogeograficznych ruchów pomiędzy Nowym Światem i Starym Światem. Możliwy jest także inny scenariusz, według którego wspólny przodek byłby bardziej zgodny ze szczepami Starego Świata (niskopatogenny kład) i byłby także przodkiem dla plazmidu wirulencji, utraconego przez przodka niepatogennego kładu. Oba te scenariusze zakładają, że przodkiem był szczep patogenny (locus *ail* pozostał w obu wysoko- i niskopatogennych kładach, a utracony podczas formowania kładu niepatogennego). Co więcej, utrata plazmidu wirulencji i wyspy patogenności doprowadziła do fenotypu niewirulentnego. Alternatywnie, wyspy patogenności mogły być nabyte niezależnie w drodze transferu horyzontalnego.

10. Proponowany model ewolucji patogennych gatunków rodzaju *Yersinia*

Zebrane w ostatnich latach dane dotyczące czynników wirulencji, filogenetycznego pokrewieństwa oraz domniemanych czasów specjacji patogennych gatunków rodzaju *Yersinia* pozwoliły na podjęcie próby uporządkowania ewolucyjnych wydarzeń, które doprowadziły do pojawienia się tak wysoce wirulentnego patogenu, jakim jest *Y. pestis*.

Zaproponowany model ewolucji genomu *Yersinia*, choć o dużym stopniu prawdopodobieństwa, nie odpowiada jednak na wszystkie pytania [45]. Daje natomiast dobre pojęcie o ogólnych tendencjach ewolucyjnych rodzaju *Yersinia* i jednocześnie podstawę do bardziej szczegółowych analiz.

Według przedstawionego przez Wren a modelu [45] pierwszym wydarzeniem, które otworzyło drogę do zmiany patogenności *Yersinia*, było nabycie plazmidu pYV przez niepatogenną, wolnożyjącą bakterię (Rys. 1). Kodowane na nim kluczowe dla infekcji jelitowych czynniki wirulencji (białka Ysc/Yop i adhezyjna YadA) pozwoliły na kolonizację ciała gospodarza ssaka i unikanie jego najistotniejszych mechanizmów obronnych. Nabycie drogą horyzontalnego transferu genów enterotoksyn Yst pozwoliło na znacznie efektywniejsze rozprzestrzenianie się drogą oralno-fekalną i na wyodrębnienie się ewolucyjnej linii *Y. enterocolitica*. Dalsze wydarzenia pozyskiwania i utraty genów doprowadziły stopniowo do wyodrębnienia się znacznie różniących się wirulencją biotypów *Y. enterocolitica*. Do najistotniejszych wydarzeń tego typu należały: utrata plazmidu pYV, która spowodowała prawie całkowity zanik wirulencji w szczepach biotypu 1A oraz nabycie wyspy patogenności HPI, która drastycznie zwiększyła przeżywalność drobnoustrojów



Rys. 1. Uproszczony model ewolucji gatunków *Yersinia* zaproponowany w oparciu o obecny stan wiedzy.

Przedstawiono najważniejsze wydarzenia prowadzące do wyodrębnienia się izolowanych dziś gatunków.

Y. enterocolitica NW – wysoce zjadliwe szczepy Nowego Świata; OW – umiarkowanie zjadliwe szczepy Starego Świata. Biotypy *Y. pestis pestoides* i *Microtus* nie zostały uwzględnione [za zgodą Wren, 2003].

w ciele gospodarza. Ten ostatni nabytek (oraz dodatkowy system sekrecji – typu II) doprowadził do powstania bardzo zjadliwego biotypu 1B (*Y. enterocolitica* Nowego Świata). Biotypy od 2 do 5, pozbawione wyspy HPI, zestawia się często w jedną grupę nazywaną *Y. enterocolitica* „Starego Świata”, o znacząco mniejszej zjadliwości niż biotyp 1B [6].

W linii ewolucyjnej, która miała doprowadzić do powstania dzisiejszej *Y. pseudotuberculosis* także doszło (niezależnie od linii *Y. enterocolitica*) do uzyskania kompletnej wyspy HPI (odnajdywanej także i u innych *Enterobacteriaceae*), z prawdopodobnie równie silnym wpływem na zjadliwość. Zdolność do tworzenia biofilmów, którym przypisuje się rolę ochronną przed nicieniami (np. *Caenorhabditis elegans*), a na-

wet udział w zwiększonej śmiertelności tych drapieżników, była efektem nabycia *locus* Hms i prawdopodobnie jeszcze innego, bliżej nie scharakteryzowanego czynnika. Wystąpiło też kilkanaście innych przypadków horyzontalnego transferu genów, czego rezultatem jest obecność wysp genomowych, odnalezionych w genomie *Y. pseudotuberculosis* IP 32953, zawierających geny m.in. adhezyn, sideroforów, transporterów oraz kompleksów toksyn owadziej. Owadobójcze właściwości pozwoliły bakteriom uzupełniać braki w substancjach odżywczych podczas przebywania poza organizmem gospodarza. Wątpliwe jest jednak, by były już wtedy zdolne do efektywnego kolonizowania jelita insektów. Stało się to możliwe po uzyskaniu (prawdopodobnie w jelicie gryzonie) plazmidu pMT1

zawierającego geny toksyny mysiej. Ze względu na podobieństwo w sekwencji genów do kryptycznego plazmidu *S. enterica* serovar Typhi, postuluje się, że donorem pMT1 mógł być ten właśnie gatunek.

Połączone efekty działania białek Hms i toksyny Ymt otworzyły bakteriom drogę do kolonizacji nowych nisz. Zdolność do przetrwania w środowisku przewodu pokarmowego pchły, a następnie blokowania go masą bakterii podlegających autoaglutynacji, które mogły przenosić się do organizmu gryzoni podczas ukąszenia przez insekta (gdzie mógł się wyrazić antygen F1, zapewniający ochronę przed fagocytozą) spowodowało ustalenie się podstaw nowego cyklu gospodarz-pchła-gospodarz. Efektywność inwazji została następnie wielokrotnie zwiększona przez uzyskanie plazmidu pPCP1. Aktywator plazminogenu umożliwił szybkie rozprzestrzenianie się patogenów w organizmie i kolonizację narządów takich jak wątroba i śledziona (przy udziale także białek Yop).

Następnie, z powodu „żyźności” nowego środowiska, prowadzącej do utraty zbędnych genów oraz akumulacji elementów IS w wyniku obniżonej presji selekcyjnej, tempo mikroewolucji gwałtownie wzrosło. Zinaktywowanych zostało wiele genów metabolizmu i czynników odpowiedzialnych za inwazję gospodarza poprzez układ pokarmowy (Tabela I).

Utrata zdolności do przetrwania poza organizmem ssaka lub pchły i ściślejsze dostosowanie do transmisji poprzez krew, spowodowały izolację od enteropatogennej populacji *Y. pseudotuberculosis* i przyspieszyły ostateczne wyodrębnienie się nowego, wysoko zjadliwego patogenu. Kolejne mutacje i insercje, akumulowane w szybkim tempie oraz powodowane obecnością coraz liczniejszych IS rekombinacje i stopniowa destabilizacja genomu doprowadziły do różnicowania się *Y. pestis* w kierunku znanych dziś biotypów. Tymczasem rozwój cywilizacyjny człowieka, objawiający się powstawaniem coraz większej liczby miast, spowodował migrację szczurów i pcheł do tych skupisk ludności. Wraz z nimi w kontakt z populacją ludzką weszła *Y. pestis* i okazała się całkowicie zdolna do infekcji organizmu człowieka i części udomowionych już zwierząt. Co więcej, możliwość rozprzestrzeniania się zakażenia drogą kropelkową spowodowała błyskawiczne postępy tej nowej dla człowieka i śmiertelnie groźnej choroby. Rezultatem była pierwsza pandemia dżumy.

Należy zauważyć, że wysoka śmiertelność, będąca efektem ciężkiej bakteremii sprawia, że strategia pałeczki dżumy jest bardzo nieproduktywna. Optymalnym rozwiązaniem dla endopasożyta jest unikanie uśmiercania żywiciela i powodowanie chronicznych infekcji, zapewniających transmisję do naturalnych środowisk. Dokładnie taka jest strategia stosowana przez *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis*, które powodują ciągłe biegunki i są zdolne do przeżywania długich okresów czasu w glebie, wodzie itd. *Y. pestis* nie może przeby-

wać poza organizmem gospodarza i jeśli zainfekowana osoba nie zostanie w dość krótkim czasie rozwoju choroby ugryziona przez pchłę, cała populacja pałeczki dżumy biorąca udział w inwazji ginie. Sytuację dodatkowo komplikuje fakt, że transmisja bakterii przez insekta pełniącego rolę wektora jest mało efektywna. Badania wykazały, że liczba bakterii w zainfekowanej krwi potrzebna do skutecznego zakażenia pchły jest nadszeregowa duża ($ID_{50} = 4,8 \times 10^3$), podczas gdy dla podatnych ssaków wynosi 10. Także zagęszczenie pcheł na jednego osobnika w podatnej populacji musi być bardzo duże do podtrzymania epizootycznej epidemii [33]. W rezultacie, w toku mikroewolucji istnieje silna presja w kierunku rozwoju bakteremii o dużym stężeniu komórek na ml krwi, by podnieść prawdopodobieństwo efektywnej transmisji. Pociąga to oczywiście za sobą zwiększenie śmiertelności wśród zakażonych osobników. Strategia taka wydaje się być bardzo ryzykowna i pokazuje jak wielkie znaczenie dla przetrwania pałeczek dżumy ma enzootypne nosicielstwo w populacjach niepodatnych na dżumę ssaków. Ma to również prawdopodobnie pierwszorzędne znaczenie dla pojawiania się nagłych wybuchów epidemii dżumy, które zależą w dużej mierze od stanu populacji pcheł, nosicieli i podatnych żywicieli na danym obszarze [20].

11. Podsumowanie

Postępujący w ostatnich latach rozwój molekularnych metod badawczych oraz narzędzi bioinformatycznych pozwolił na dokładniejszą ocenę filogenetycznego pokrewieństwa bakterii z rodzaju *Yersinia*. Zainteresowanie naukowców tymi patogenami, skupiające się dotychczas na próbach opracowania najbardziej efektywnej szczepionki przeciwko dżumie (wywołanej przez *Y. pestis*), zyskało nowy wymiar wraz z odkryciem bliskiego pokrewieństwa *Y. pestis* z enteropatogennym gatunkiem – *Y. pseudotuberculosis* i poddało w wątpliwość zasadność wyodrębnienia *Y. pestis* jako osobnego gatunku. Zgodnie z obowiązującymi zasadami taksonomicznymi *Y. pestis* mogłaby być uznana za podgatunek *Y. pseudotuberculosis*. Znaczące fenotypowe i ekologiczne różnice (obejmujące m.in. gospodarza, drogi infekcji i proces patogenezy) w konfrontacji z nowymi molekularnymi danymi, wskazującymi na bliskie filogenetyczne związki tych dwóch gatunków, budzą ogromne zainteresowanie. Ten molekularny „paradoks *Yersinia*”, bądź „enigma *Yersinia*” razem z nowymi wynikami badań pozwalającymi na ustalenie czasu wyodrębnienia się *Y. pestis* na 1 500–20 000 lat temu stały się powodem naukowych dociekań na temat gwałtownej ewolucji w obrębie *Yersinia*. Analiza wyników przeprowadzonych dotąd badań zmusza do weryfikacji tradycyjnego przekonania o roli horyzontalnego transferu genów w ewolucji *Y. pestis*. Podwa-

Tabela I

Fenotypowe różnice pomiędzy typowymi szczepami *Y. pestis* (*Y. pe*) i *Y. pseudotuberculosis* (*Y. ps*)

Determinanta	<i>Y. ps.</i>	<i>Y. pe.</i>	Zdarzenie ewolucyjne	Konsekwencje u <i>Y. pestis</i>
pPCP	–	+	Transfer lateralny	Nabycie PlaA – przyśpieszone rozprzestrzenianie w tkankach, degradacja niedostarczonych Yop Nabycie pestycyny – zapewnienie retencji pPCP
pMT1	–	+	Transfer lateralny	Nabycie antygeny F1 – ochrona przed fagocytozą Nabycie Ymt – przetrwanie w jelicie pchły, śmiertelność mysich gospodarzy
Hms ⁺	–	+	Możliwa konstytutywna ekspresja <i>hmsT</i>	Możliwość kolonizacji i blokowania jelita pchły
Obecność łańcuchów O w LPS w 26°C	+	–	Kryptyczne geny R	Konstytutywna oporność na składniki dopełniacza
YadA	+	–	Frameshift	Oslabienie interakcji z powierzchnią komórek gospodarza
Inv	+	–	Insercja IS1541	Oslabienie interakcji z powierzchnią komórek gospodarza
Ail	+	–	Insercja IS285	Oslabienie interakcji z powierzchnią komórek gospodarza
Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu	+	–	Mutacja zmiany sensu	Brak cyklu pentozofosforanowego Używanie odwrotnych funkcji transaldolazy i transketolazy lub użycie pentoz gospodarza do syntezy RNA
Aspartaza	+	–	Mutacja missense	Przemiany egzogenne L-glutaminianu w L-asparaginian, obniżenie poziomu czynnego octanu, zwiększone zapotrzebowanie na CO ₂
Biosynteza glicyny i L-treoniny	+	–(rew)	Mutacja w genie hydroksymetylotransferazy serynowej	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Biosynteza L-fenylalaniny	+	–(rew)	Znaczna delecja	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Biosynteza L-metioniny	+	–(rew)	Insercja IS	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Fermentacja ramnozy*	+	–(rew)	Niewielka delecja	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Fermentacja melibiozy*	+	–(rew)	Insercja pary nukleotydów; frameshift	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Ureaza	+	–(rew)	Insercja pary nukleotydów; frameshift	Eliminacja niepotrzebnej funkcji
Asymilacja NH ₄ ⁺ przy niskich stężeniach	+	–(rew)	Mechanizm nieznan	Utrata możliwości pobierania nisko stężonego jonu amonowego; eliminacja niepotrzebnej funkcji

(rew) – spotykane są spontaniczne rewersje do fenotypu *Y. pseudotuberculosis** – fermentacja ramnozy i melibiozy występuje u awirulentnego dla ludzi biotypu *Y. pestis pestoides*

żają one m.in. wagę procesu nabywania dodatkowych plazmidów w rozwoju dżumy i są podstawą do rozważania innych możliwości rozwiązania „paradoksu *Yersinia*”, w tym uwzględnienia, większej niż dotąd zakładano, roli elementów insercyjnych w utracie lub inaktywacji genów. Nie wykluczone, że zmieniony w wyniku mutacji metabolizm *Y. pestis* mógł wzmocnić wirulencję bakterii. Obecność dużej liczby pseudogenów (10% genomu) sugeruje ponadto, że *Y. pestis* znajduje się na wczesnym etapie redukcji genomu.

Piśmiennictwo

- Achtman M., Keim P. i wsp.: Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17837–17842 (2004)
- Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E.: *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14043–14048 (1999)
- Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B.: Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 434–464 (2004)
- Asim *Y. pseudotuberculosis* (*Yersinia*). <http://www.emedicine.com>. (2003).
- Bercovier H., Mollaret H.H., Alonso J.M.: Intra – and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr. Microbiol.* **4**, 225–229 (1980)
- Bottone E.J.: *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 257–276 (1997)
- Brubaker R.R.: The recent emergence of plague: a process of felonious evolution. *Microb. Ecol.* **47**, 293–299 (2004)
- Brzostek K.: Mechanizmy regulacji czynników wirulencji *Yersinia enterocolitica*. *Post. Mikrobiol.* **43**, 7–38 (2004)
- Carniel E.: The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int. Microbiol.* **2**, 161–167 (1999)
- Chain P.S.G., Garcia E. i wsp.: Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13826–13831 (2004)
- Cohan F.M.: What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 457–487(2002)

12. Cowan C., Jones H.A., Kaya Y.H., Perry R.D., Straley S.C.: Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: evidence for a *Y. pestis*-specific invasin. *Infect. Immun.* **68**, 4523–4530 (2000)
13. Darby S., Hsu J.W., Ghori N., Falkow S.: *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature*, **417**, 243–244 (2002)
14. Deng W., Perry R.D. i wsp.: Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J. Bacteriol.* **184**, 4601–4611 (2002)
15. Drancourt M., Roux V., Dang L.V., Tran-Hung L., Castex D., Chenal-Francisque V., Ogata H., Fournier P.E., Crubezy E., Raoult D.: Genotyping, Orientalis-like *Yersinia pestis* and plague pandemics. *Emerging Inf. Dis.* **10**, 1585–1592 (2004)
16. Dykhuizen D.E.: *Yersinia pestis*: an instant species? *Trends Microbiol.* **8**, 296–297 (2000)
17. Forman S.; Wulff C.R., Myers-Morales T., Cowan C., Perry R.D., Straley S.C.: yadBC of *Yersinia pestis*, a new virulence determinant for bubonic plague. *Infect. Immun.* **76**, 578–587 (2008)
18. Foutlier B., Cornelis G., R.: DNA sequence and analysis of the pYVa127/90 virulence plasmid of *Yersinia enterocolitica* strain A127/90. *Res Microbiol.* **154**, 553–7 (2003)
19. Fukushima H., Matsuda Y., Seki R., Tsubokura M., Takeda N., Shubin F.N., Paik I.K., Zheng X.B.: Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3541–47 (2001)
20. Girard J.M., Wagner D.M., Vogler A.J., Keys C., Allender C.J., Drickamer L.C., Keim P.: Differential plague-transmission dynamics determine *Yersinia pestis* population genetic structure on local, regional, and global scales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8408–8413 (2004)
21. Górka A., Brzostek K., Hrebenda J.: Białka Yop rodzaju *Yersinia* – mechanizm sekrecji i translokacji. *Post. Mikrobiol.* **38**, 141–162 (1999)
22. Howard S. L., Gaunt M.W., Hinds J., Witney A.A., Stabler R., Wren B.W.: Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *J. Bacteriol.* **188**, 3645–53 (2006)
23. Hinnebusch B.J., Rudolph A.E., Cherepanov P., Dixon J.E., Schwan T.G., Forsberg A.: Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science*, **296**, 733–735 (2002)
24. Hinnebusch B.J.: The evolution of flea-borne transmission in *Yersinia pestis*. *Curr Issues. Mol. Biol.* **7**, 197–212 (2005)
25. Hu P., Elliott J., McCready P., Skowronski E., Garnes J., Kobayashi A., Brubaker R.R., Garcia E.: Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **180**, 5192–5202 (1998)
26. Huang X., Lindler L.E.: The pH6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Y. pestis* independent of *Yersinia*-outer proteins and capsule antigen. *Infect. Immun.* **72**, 7212–7219 (2004)
27. Karwicka E., Raczowska A., Brzostek K.: Mechanizmy sekrecji bakterii Gram-ujemnych – System sekrecji I i III typu. *Post. Mikrobiol.* **45**, 169–182 (2006)
28. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P.L., Wong J., Keim P.: Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3179–3185 (2001)
29. Kolodziejek A.M., Sinclair D.J., Seo K.S., Schneider D.R., Deobald C.F., Rohde H.N., Viall A.K., Minnich S.S., Hovde C.J., Minnich S.A., Bohach G.A.: Phenotypic characterization of OmpX, an Ail homologue of *Yersinia pestis* KIM. *Microbiol.* **153**, 2941–2951 (2007)
30. Lawrenz M.B., Lenz J.D., Miller V.L.: A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. *Infect. Immun.* **77**, 317–26 (2009)
31. Lan R., Reeves P.R.: When does a clone deserve a name? A perspective on bacterial species based on population genetics. *Trends Microbiol.* **9**, 419–424 (2001)
32. Lerat E., Ochman H.: Recognizing pseudogenes in bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3125–3132 (2005)
33. Lorange E.A., Race B.L., Sebbane F., Hinnebusch J.B.: Poor vector competence of fleas and the evolution of hypervirulence in *Yersinia pestis*. *J. Infect. Dis.* **191**, 1907–1912 (2005)
34. Montminy SW, Khan N, McGrath S, Walkowicz MJ, Sharp F, Conlon JE, Fukase K, Kusumoto S, Sweet C, Miyake K, Akira S, Cotter RJ, Goguen JD, Lien E.: Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *Nat. Immunol.* **7**, 1066–1073 (2006)
35. Neubauer H., Aleksic S., Hensel A., Finke E.J., Meyer H.: *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**, 61–4 (2000)
36. Oyston C.F., Isherwood K.E.: *Yersinia*: an update. *Trends Microbiol.* **10**, 550–551 (2002)
37. Parkhill J., Barrell B.G. i wsp.: Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, **413**, 523–527 (2001)
38. Perry R.D., Fetherston J.D.: *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 35–66 (1997)
39. Pourcel C., André-Mazeaud F., Neubauer H., Ramière F., Vergnaud G.: Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* **4**, 22 (2004)
40. Rakin A., Schubert S., Pelludat C., Brem D., Heesemann J.: The high-pathogenicity island of *Yersinia*. W: Kaper J.B., Hacker J. (red), Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. ASM, Washington, D.C. 77–88, (1999)
41. Raoult D., Aboudharam G., Crubezy E., Larrouy G., Ludes B., Drancourt M.: Molecular identification by “suicide PCR” of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12800–12803 (2000)
42. Rudolph A.E., Stuckey J.A., Zhao Y., Matthews H.R., Patton W.A., Moss J., Dixon J.E.: Expression, characterization and mutagenesis of the *Yersinia pestis* murine toxin, a phospholipase D family member. *J. Biol. Chem.* **274**, 11824–11831 (1999)
43. Suomalainen M, Haiko J, Ramu P, Lobo L, Kukkonen M, Westerlund-Wikström B, Virkola R, Lähteenmäki K, Korhonen TK.: Using every trick in the book: the Pla surface protease of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **603**, 268–78 (2007)
44. Trebesius K., Harmsen D., Rakin A., Schmelz J., Heesemann J.: Development of rRNA-targeted PCR and *in situ* hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2557–2564 (1998)
45. Wren B.W.: The *Yersinia* – a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nature Rev. Microbiol.* **1**, 55–64 (2003)
46. Zhou D., Yang R. i wsp.: DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. *J. Bacteriol.* **186**, 5138–5146 (2004)
47. Zhou D., Yang R. i wsp.: Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, Microtus. *J. Bacteriol.* **186**, 5147–5152 (2004)