

Streszczenie

Bakterie należące do rodziny *Chlamydiaceae* i rodzaju *Chlamydia*, są rozpowszechnione na całym świecie i występują zarówno u ludzi, jak również zwierząt hodowlanych oraz wolno żyjących. Zwłaszcza ptaki i gady są częstymi gospodarzami dla chlamydii, a ich powszechnie obserwowana zdolność do przełamania bariery gatunkowej powoduje, że określone gatunki mogą występować u różnych gospodarzy. Niektóre *Chlamydia* spp. wykazują potencjał zoonotyczny, stanowiąc zagrożenie dla zdrowia publicznego. Zgodnie z aktualnie obowiązującą taksonomią, do rodzaju *Chlamydia* zalicza się 15 scharakteryzowanych gatunków: *C. abortus*, *C. avium*, *C. crocodili*, *C. gallinacea*, *C. buteonis*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. poikilotherma*, *C. psittaci*, *C. serpentis*, *C. suis* i *C. trachomatis* oraz cztery taksony o statusie *Candidatus*: *Cand. C. corallus*, *Cand. C. ibidis*, *Cand. C. sanzinia*, *Cand. C. testudinis*.

Wielkość genomu *Chlamydia* spp. wynosi ~1 Mbp, a większość gatunków posiada plazmid. Pomimo dużej konserwatywności, w ich genomach występują regiony, które wykazują dużą zmienność genetyczną m.in. gen *ompA*, plasticity zone, system sekrecyjny typu III, białka błony ciała wtrętowego Inc oraz polimorficzne białka błonowe. Część genów wchodzących w skład tych regionów uważana jest za geny wirulencji.

Ciągły rozwój technologii sekwencjonowania nowej generacji oraz rosnąca liczba dostępnych genomów w publicznych bazach danych znacząco zwiększyły wiedzę na temat ewolucji, filogenezy, struktury genomu, procesów metabolicznych oraz potencjalnych czynników wirulencji *Chlamydia* spp. Podejście hybrydowe, wykorzystujące zarówno techniki sekwencjonowania II generacji (krótkie odczyty), jak również III generacji (długie odczyty), jest obecnie uważane za złoty standard w genomice.

Celem przeprowadzonych badań było poznanie struktury genomów wybranych przedstawicieli bakterii z rodzaju *Chlamydia*. W badania zostały włączone szczepy avian *C. abortus* uzyskane z materiału biologicznego pochodzącego od ptaków wolno żyjących, wymazy z kloaki pobrane od kur oraz szczep *C. gallinacea* wyizolowany od kury w Polsce.

W przeprowadzonych badaniach uzyskano pełne sekwencje genomowe dla trzech szczepów avian *C. abortus* wyizolowanych od ptaków należących do rodzin *Anatidae* i *Corvidae*. Wykazano, że wyizolowane szczepy są ze sobą blisko spokrewnione wykazując co najmniej 97,23% średniego podobieństwa nukleotydów. Stwierdzono również, że szczepy avian *C. abortus*, w przeciwieństwie do klasycznych szczepów *C. abortus* izolowanych od ssaków, posiadają plazmid wykazujący największe podobieństwo do plazmidów

występujących w szczepach *C. psittaci*. W regionie plasticity zone szczepów avian *C. abortus* wykazano obecność cytotoksyny uważanej za czynnik wirulencji, która nie występuje w klasycznych szczepach *C. abortus*, co może wskazywać na potencjał patogenny. Na podstawie analizy porównawczej sekwencji genomowych oraz aktualnie obowiązujących zasad klasyfikacji bakterii należących do rzędu Chlamydiales, dowiedziono, że szczepy avian *C. abortus*, pomimo wykazywania cech pośrednich pomiędzy *C. psittaci* a *C. abortus*, ostatecznie powinny zostać włączone do *C. abortus*. Stwierdzono również, że definicja gatunku *C. abortus*, która wskazuje, że stanowi go grupa monofiletycznych szczepów będących przyczyną ronień u ssaków, powinna zostać rozszerzona o szczepy *C. abortus* izolowane od ptaków.

Analiza porównawcza sekwencji genomowych szczepów *C. gallinacea* wyizolowanych w Polsce wykazała, że są ze sobą blisko spokrewnione i wykazują co najmniej 99,46% średniego podobieństwa nukleotydów. Ich genomy posiadają konserwatywną strukturę obejmującą: plasticity zone (tzw. strefa plastyczności), system sekrecyjny typu III, polimorficzne białka błonowe, białka błony ciała wtrętowego Inc, białka histonopodobne *hctA* i *hctB*, egzoenzym CPAF oraz plazmidy. Dowiedziono również, że niektóre loci tj. geny *ompA* i geny kodujące białka metabolizmu podstawowego wykazują duże zróżnicowanie genetyczne, co jest wystarczające, aby umożliwić genotypowanie i prowadzenie monitoringu epidemiologicznego. Wykazano również, że szczepy *C. gallinacea* krążące w populacji drobiu w Polsce posiadają geny wirulencji, w tym cytotoksynę, białka błony ciała wtrętowego Inc, polimorficzne białka błonowe, białka histonopodobne *hctA* i *hctB*, egzoenzym CPAF, T3SS oraz efekторы T3SS – SINC i TARP – zaangażowane w patogenezę.

Przeprowadzone badania przyczyniły się do wzbogacenia baz danych o nowe sekwencje genomowe avian *C. abortus* (G1, G2 i 1V) oraz *C. gallinacea*. Uzyskane wyniki mogą stać się przyczynkiem do przeprowadzenia dalszych badań wykraczających poza genomikę porównawczą w celu określenia patogennego potencjału avian *C. abortus* i *C. gallinacea* oraz ocenie ich ewentualnego znaczenia dla zdrowia publicznego i przemysłu drobiarskiego.

Summary

Bacteria belonging to the *Chlamydiaceae* family and *Chlamydia* genus are widespread worldwide and may occur in humans as well as in domestic and free-living animals. Birds and reptiles are particularly common hosts. Due to the well-known ability of chlamydiae to cross the species barrier, some species may occur in different hosts. Some *Chlamydia* spp. may have zoonotic potential, posing a threat to public health. According to the current taxonomy, the *Chlamydia* genus includes 15 characterized species as well as four taxa with *Candidatus* status. The characterized species are *C. abortus*, *C. avium*, *C. crocodili*, *C. gallinacea*, *C. buteonis*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. poikilotherma*, *C. psittaci*, *C. serpentis*, *C. suis* and *C. trachomatis*, and those with *Candidatus* status are *Cand. C. corallus*, *Cand. C. ibidis*, *Cand. C. sanzinia* and *Cand. C. testudinis*.

The size of the *Chlamydia* spp. genome is ~1 Mbp and most of the species possess a plasmid. Despite being highly conserved, their genomes have regions presenting high variability, including the *ompA* gene, the plasticity zone, the type III secretion system, inclusion membrane proteins and polymorphic membrane proteins. Some of the genes included in these regions are considered virulence factors.

Continuous development of next-generation sequencing technologies and the growing number of available genomes in public databases have significantly increased knowledge about the evolution, phylogeny, genome structure, metabolic processes and potential virulence factors of *Chlamydia* spp. A hybrid approach supplies much of this knowledge, using both second-generation sequencing techniques (short reads) and third-generation techniques (long reads), and this approach is currently considered the gold standard in genomics.

The aim of the study was to analyze the genome structure of selected representatives of the *Chlamydia* genus. The survey included avian *C. abortus* strains obtained from biological material of free-living birds, cloacal swabs taken from chickens and a *C. gallinacea* strain isolated from a chicken in Poland.

In the conducted research, the full genome sequences were obtained for the three avian *C. abortus* strains isolated from birds belonging to the *Anatidae* and *Corvidae* families. It was proved that the isolated strains are closely related, showing at least 97.23% average nucleotide identity. It was also found that the avian *C. abortus* strains, in contrast to classical *C. abortus* strains isolated from mammals, possess a plasmid that is most similar to those found in *C. psittaci* strains. In the plasticity zone of the avian *C. abortus* strains, the presence of a cytotoxin gene absent in classical *C. abortus* strains was detected, this gene being considered

a virulence factor and a possible indicator of these strains' pathogenic potential. Based on the comparative genomic analysis as well as currently established rules for the classification of bacteria belonging to the order Chlamydiales, it was proved that despite showing intermediate features between *C. psittaci* and *C. abortus*, the avian *C. abortus* strains should be assigned to *C. abortus*. Furthermore, it was concluded that the definition of the *C. abortus* species, which indicates that it is a group of monophyletic strains causing abortions in mammals, should be expanded to also include *C. abortus* strains isolated from birds.

Comparative genomic analysis of *C. gallinacea* strains isolated in Poland revealed that they are closely related, presenting at least 99.46% average nucleotide identity. Their genomes possess a conserved structure including a plasticity zone, a type III secretion system, polymorphic membrane proteins, inclusion membrane proteins, the histone-like proteins *hctA* and *hctB*, exoenzyme CPAF and plasmids. It was also proved that some loci, such as *ompA* and housekeeping genes, demonstrate high genetic diversity which is sufficient to enable high-resolution genotyping and epidemiological tracing. Moreover, it was demonstrated that *C. gallinacea* strains circulating in the population of poultry in Poland possess virulence genes, including a cytotoxin gene, inclusion membrane proteins, polymorphic membrane proteins, the histone-like proteins *hctA* and *hctB*, exoenzyme CPAF, T3SS, and the T3SS effectors SINC and TARP involved in pathogenesis.

The conducted research contributed to the enrichment of databases with new genome sequences of avian *C. abortus* (G1, G2 and 1V) and *C. gallinacea*. The obtained results may provide foundation material for further research beyond comparative genomics to clarify the pathogenic potential of avian *C. abortus* and *C. gallinacea* and determine its significance for public health and the poultry industry.