

4) Autoreferat

1. Imię i nazwisko **Katarzyna Anna Kasperkiewicz**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.
 - **Magister analityki medycznej;** Wydział Farmacji z Oddziałem Analityki Medycznej, Śląska Akademia Medyczna w Katowicach; 1997.
 - **Doktor nauk biologicznych;** Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach; 2003.
 - **Tytuł rozprawy doktorskiej:** „Właściwości ECA immunogenne mutantów szorstkich *Yersinia enterocolitica*”.
 - **Studia podyplomowe;** Chemia surowców kosmetycznych, Kosmetologia, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Śląski w Katowicach; 2010.
 - **Licencjat;** Dietetyka, specjalność: dietetyka kliniczna, Śląska Wyższa Szkoła Medyczna w Katowicach; 2018.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych (**załącznik 1**).
 - Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Nauk Przyrodniczych (wcześniej Wydział Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska), Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
 - 01.10.2000-30.09.2003 – asystent naukowo-dydaktyczny
 - 01.10.2003-30.09.2008 – adiunkt naukowo-dydaktyczny
 - 01.11.2008-14.02.2010 – asystent naukowo-dydaktyczny
 - 15.02.2010 do nadal – adiunkt badawczo-dydaktyczny; nauczyciel akademicki

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

Omówienie celu naukowego prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, uzyskanych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Badania aktywności biologicznej lipopolisacharydu *Yersinia enterocolitica* O:3.

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego stanowią cykl pięciu artykułów naukowych spójnych metodycznie i koncepcyjnie poświęconych badaniom aktywności biologicznej lipopolisacharydu *Yersinia enterocolitica* O:3 (**załącznik 2**):

1. Noszczyńska M., **Kasperkiewicz K.**, Duda K.A., Podhorodecka J., Rabsztyn K., Gwizdała K., Świerzko A.S., Radziejewska-Lebrecht J., Holst O., Skurnik M. 2015. Serological characterization of the enterobacterial common antigen substitution of the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Microbiology* 161:219–27; DOI:10.1099/mic.0.083493-0 (**załącznik 2.1**).
(IF 2,268; 30 pkt MNiSW; Cyt Web of Science: 12; Cyt Scopus: 11)
2. **Kasperkiewicz K.**, Świerzko A.S., Bartłomiejczyk M.A., Cedzyński M., Noszczyńska M., Duda K.A., Michalski M., Skurnik M. 2015. Interaction of human mannose-binding lectin (MBL) with *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide. *International Journal of Medical Microbiology* 305: 544–52; DOI:10.1016/j.ijmm.2015.07.001 (**załącznik 2.2**).
(IF 3,898; 30 pkt MNiSW; Cyt Web of Science: 15; Cyt Scopus: 14)
3. **Kasperkiewicz K.**, Świerzko A. S., Przybyła M., Szemraj J., Barski J., Skurnik M., Kałużński A., Cedzyński M. 2020. The Role of *Yersinia enterocolitica* O:3 Lipopolysaccharide in Collagen-Induced Arthritis. *Journal of Immunology Research* 1–12; DOI: 10.1155/2020/7439506 (**załącznik 2.3**).
(IF 4,818; 100 pkt MNiSW; Cyt Web of Science: 1; Cyt Scopus: 1)

4. **Kasperkiewicz K.**, Eppa Ł., Świerzko A.S., Bartłomiejczyk M.A., Żuber Z., Siniewicz-Luzeńczyk K., Mężyk E., Matsushita M., Bąk-Romaniszyn L., Zeman K., Skurnik M., Cedzyński M. 2017. Lectin pathway factors in patients suffering from juvenile idiopathic arthritis. *Immunology and Cell Biology* 95, 666-675; DOI:10.1038/icb.2017.31 (**załącznik 2.4**). (IF 3,795; 30 pkt MNiSW; Cyt Web of Science: 9; Cyt Scopus: 7)

Kasperkiewicz K., Świerzko A.S., Michalski M., Eppa Ł., Skurnik M., Żuber Z., Cedzyński M. 2022. Antibodies recognizing *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharides of various chemotypes in synovial fluids from patients with juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Immunology Research* 1-9; DOI:10.1155/2022/9627934. (**załącznik 2.5**). (IF 4,493; 100 pkt MNiSW; Cyt Web of Science: 0; Cyt Scopus: 0)

Wstęp

Odkrycie pałeczek z rodzaju *Yersinia* miało miejsce podczas epidemii dżumy w Hongkongu w 1894 roku. Mikroorganizmy te należą do rzędu Enterobacterales ord. nov., rodziny *Yersiniaceae* [Adeolu i wsp., 2016], obejmującej 20 gatunków, w tym trzy patogenne dla człowieka i zwierząt. *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* to fakultatywne wewnątrzkomórkowe patogeny, wywołujące schorzenia jelitowe zwane jersiniozami, a *Yersinia pestis* to czynnik etologiczny dżumy [Bercoveri, Mollaret, 1984].

Do zakażenia bakteriami *Yersinia* dochodzi poprzez spożycie zanieczyszczonej wody lub pożywienia, a także w wyniku kontaktu z odchodami zwierząt. Częstym źródłem infekcji ludzi są szczepy obecne w mleku pasteryzowanym, serze oraz na liściach warzyw [Janowska i wsp., 2012]. Naturalnym rezerwuarem szczepów *Y. enterocolitica* jest bydło hodowlane (zwłaszcza świnie), małe gryzonie oraz ptaki [Morka i wsp., 2018]. Inną postacią choroby jest jersinioza tzw. jatrogenna, która może wystąpić jako powikłanie po przetoczeniu biorcy krwi lub jej składników zakażonej pałeczkami *Yersinia*. W skrajnych przypadkach infekcja może doprowadzić do sepsy poprzetoczeniowej, z śmiertelnością sięgającą nawet 50% [Janowska i wsp., 2012].

Obecnie w skali globalnej następuje stopniowy wzrost występowania jersiniozy. Infekcje *Yersinia enterocolitica* diagnozowane są najczęściej w krajach wysoko rozwiniętych. Dane epidemiologiczne wskazują, iż w latach 2003-2006 zachorowania na jersiniozę w Polsce utrzymywały się na stosunkowo niskim poziomie. Pomimo, że choroba o lżejszym przebiegu

jest rzadko diagnozowana bądź ewidencjonowana, to od 2007 roku obserwuje się znaczący wzrost liczby jej przypadków w porównaniu z latami poprzednimi. Zakażenia *Yersinia enterocolitica* stają się coraz większym problemem diagnostycznym zarówno w Polsce jak i na świecie, ze względu na duże podobieństwo objawów do chorób zapalnych jelit, a w szczególności do choroby Leśniowskiego-Crohna [Janowska i wsp., 2012].

W większości przypadków klinicznych yersinioza przebiega łagodnie lub może dochodzić do jej samoograniczenia [Revell i Miller, 2001]. **Najczęściej chorują dzieci około 5 roku życia** [Bobel i Sadkowska-Todys, 2006]. Zakażenia *Yersinia enterocolitica* występują najczęściej pod postacią zapalenia jelit, które przebiega z wysoką gorączką, wymiotami i biegunką sekrecyjną lub ropno-krwistą. Patogeny te posiadają unikalną zdolność przeżycia w kwaśnym środowisku żołądka, mogą namnażać się w kępkach Peyer'a jelita cienkiego. Bakterie mogą przemieszczać się do węzłów chłonnych, a następnie migrować do układu krwionośnego wywołując posocznice [Jagielski i wsp., 2000]. Do rozwoju uogólnionego zakażenia *Yersinia* predysponują stany kliniczne związane z wysokim poziomem żelaza w organizmie tj. marskość wątroby i cukrzyca. Czasami, u pacjentów mogą rozwinąć się poinfekcyjne powikłania tj.: rumień guzowaty, zapalenie błony naczyniowej oka, zapalenie kłębuszków nerkowych czy zapalenie mięśnia sercowego [Paścik i wsp., 2006]. **Częstym powikłaniem jersiniozy jest reaktywne zapalenie stawów (zespół Reitera; ang. Reactive arthritis)** [Leirisalo-Repo, Suoranta, 1988].

Bakterie *Yersinia* dysponują bogatym arsenałem czynników wirulencji. Wszystkie patogenne gatunki *Yersinia* posiadają plazmid wirulencji (ang. plasmid of *Yersinia* virulence, pYV) o wielkości 70 kpz., który zawiera geny kodujące czynniki zjadliwości, tj. adhezynę YadA (ang. *Yersinia* **adhesion A**) i system sekrecji typu III Ysc (Ysc-T3SS). YadA bierze udział w adhezji bakterii do komórek nabłonka, fagocytów i macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagenu i fibronektyny), hemaglutynacji erytrocytów i oporność na bakteriobójcze działanie surowicy [Biedzka-Sarek i wsp., 2005]. Aparat sekrecyjny Ysc-T3SS odpowiada za translokację białek efektorowych Yop (ang. *Yersinia* **outer proteins**) do komórek gospodarza (YopH, YopM, YopO, YopT, YopP i YopE), gdzie hamują fagocytozę i odpowiedź zapalną [Brzostek, 2004]. Bakterie *Y. enterocolitica* należące do biogrupy 1B zawierają wyspę wysokiej patogenności HPI (ang. **H**igh **P**athogenicity **I**sland) kodującą m.in. yersiniobaktynę (ang. *Yersiniabactin*, Ybt) - siderofor, wiążący jony żelaza [Schubert i wsp., 2004].

Geny wirulencji *Y. enterocolitica* zlokalizowane są także na chromosomie. Do kodowanych chromosomowo czynników zjadliwości należą białka ważne na wczesnych

etapach infekcji tj.: ureaza która umożliwia przetrwanie *Y. enterocolitica* w kwaśnym środowisku żołądka oraz inwazyjna błony zewnętrznej (ang. **Invasin**, Inv), która bierze udział w translokacji bakterii przez nabłonek jelitowy [Pepe i Miller, 1993]. Ważnymi czynnikami wirulencji są także enterotoksyna Yst (ang. **Yersinia heat stable toxin**) i białko Ail (ang. **Attachement and invasion locus**). Yst aktywuje cyklazę guanylową odpowiedzialną za wzrost stężenia cyklicznego GMP w komórkach jelit oraz indukcję utraty płynów komórkowych i wystąpienie biegunki [Delor i Cornelis, 1992]. Białko Ail bierze udział w kolonizacji nabłonka, a także chroni *Yersinia* przed bakteriobójczym działaniem surowicy [Biedzka-Sarek i wsp., 2005].

W patogenezie zakażeń *Y. enterocolitica* ważną rolę odgrywa **lipopolisacharyd (LPS; endotoksyna)**, który zawiera trzy różniące się pod względem budowy chemicznej, biosyntezy i jej kontroli genetycznej oraz funkcji biologicznej regiony: lipid A, rdzeń i część O-swoistą. Proksymalny, hydrofobowy lipid A kotwiczy LPS w warstwie błony zewnętrznej. Poprzez część rdzeniową połączony jest z dystalnym, hydrofilowym łańcuchem O-swoistym (O-polisacharyd, OPS), który umożliwia komórce bakteryjnej kontakt i rozpoznanie środowiska zewnętrznego. LPS, zawierający w/w trzy regiony, wytwarzają formy gładkie (ang. Smooth, S) bakterii. Formy szorstkie bakterii (ang. Rough, R) syntetyzują lipopolisacharyd pozbawiony części O-swoistej. Natomiast formy SR bakterii wytwarzają LPS składający się z lipidu A, rdzenia i jednej podjednostki O-swoistej [Seltman, Holst, 2002]. Część O-polisacharydowa LPS (OPS; tzw. łańcuch O-swoisty) *Y. enterocolitica* O:3 bierze udział w wirulencji i jest niezbędna do efektywnej kolonizacji tkanek gospodarza, zwłaszcza na początkowym etapie infekcji [Al-Hendy i wsp., 1992; Skurnik i wsp., 1999]. Polisacharyd ten wiąże m.in apolipoproteinę A-I (apoA-I), należącą do grupy lipoprotein o dużej gęstości (HDL), powodującą lizę bakterii [Biedzka-Sarek i wsp., 2011]. Rdzeń zewnętrzny LPS (ang. Outer Core, OC) *Yersinia enterocolitica* O:3 na początkowym etapie infekcji chroni bakterie przed działaniem bójczym makrofagów i wielojądrzastych granulocytów. Skurnik i wsp. [1999] wykazali także, że nie tylko formy dzikie S *Yersinia enterocolitica* O:3 są patogenne, ale również mutanty R, których LPS nie posiada OPS. Za wirulencje tych szczepów odpowiadał głównie zewnętrzny region rdzeniowy LPS. Dowiedziono, że mutant chemotypu Ra (YeO3-R1) efektywnie zabijał myszy. Natomiast mutanty defektywne w biosyntezie tego regionu LPS (YeO3-c-trs11-R, YeO3-c-trs22-R) były niechorobotwórcze i wykazywały 10^4 razy mniejszą wirulentność po podaniu dożylnym myszom niż szczep dziki YeO3 i mutanty chemotypu Ra [Skurnik, 1999].

Interesującą cechą *Yersinia enterocolitica* jest zależna od temperatury wzrostu ekspresja wielu czynników wirulencji, w tym LPS (tabela 1).

Tabela 1. Czynniki wirulencji *Yersinia enterocolitica* regulowane temperaturą wzrostu [Bottone, 1997]. Objasnienia: * Tylko w serogrupach O:4, O:4,32, O:8 i O:21.

Pochodzenie genetyczne	Czynnik wirulencji	Ekspresja w:	
		25°C	37°C
Chromosom	Chemotyp LPS	Gładki	Szorstki
	Adhezja do fagocytów	Silna	Słaba
	Obecność rzęsek	Tak	Nie
	Inv	Wysoka	Słaba
	Ail	Słaba	Wysoka
	Produkcja enterotoksyny	Tak	Nie
	Ybt	Nie	Tak*
Pazmid	YadA	Nie	Tak
	Hydrofobowość powierzchni	Nie	Tak
	Oporność na bakteriobójcze działanie surowicy	Nie	Tak
	Autoaglutynacja	Nie	Tak
	Oporność na fagocytozę	Nie	Tak
	Oporność na wewnątrzkomórkowe zabijanie przez makrofagi	Słaba	Dobra
	Yop	Nie	Tak

Szczepy dzikie namnażane w temperaturze <30°C posiadają gładki LPS syntetyzują O-polisacharyd (OPS), podczas gdy LPS bakterii hodowanych w 37°C, ulega skróceniu (brak syntezy OPS) i prezentuje typ szorstki (ang. Rough, R) [Kawaoka i wsp., 1983; Wartenberg i wsp., 1983; Al-Hendy i wsp., 1991; Skurnik i Toivanen 1993; Muszyński i wsp., 2013]. Dodatkowo, faza wzrostu bakterii, niskie pH, stężenie żelaza, ciśnienie tlenu i siła jonowa podłoża mogą modulować ekspresję OPS [Skurnik i Bengoechea, 2003]. Badania wykazały, że temperatura wzrostu *Yersinia enterocolitica* O:3 wpływa również na biosyntezę regionu rdzeniowego LPS. Składniki rdzenia zewnętrznego są efektywniej syntetyzowane w 22°C, podczas gdy cukry rdzenia wewnętrznego w 37°C [Al-Hendy i wsp., 1991; Muszyński i wsp., 2013]. Wykazano również, że lipid A *Y. enterocolitica* w niższej temperaturze jest

heksaacylowany i może być podstawiony L-Arap4N lub palmitynianem, natomiast w wyższej jest tetraacylowany, co skutkuje obniżeniem jego toksyczności [Reinés i wsp., 2012].

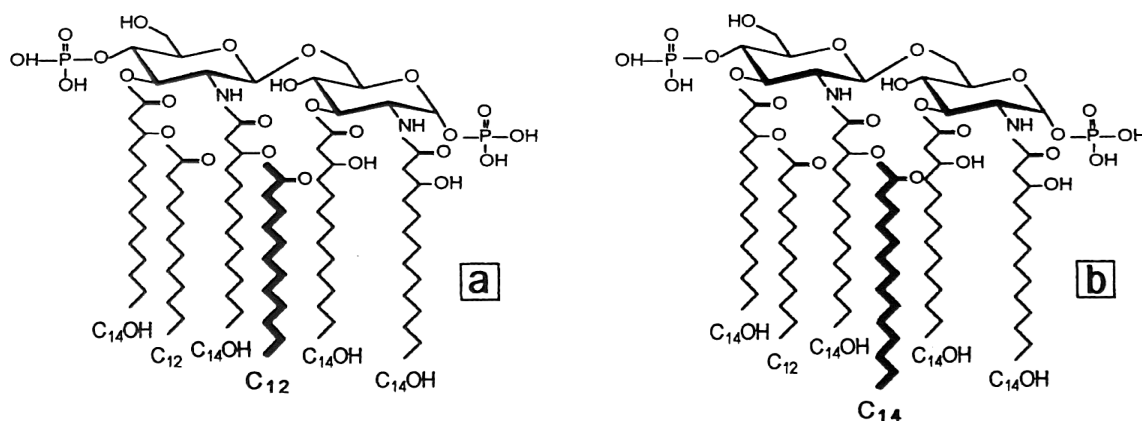
Unikalna budowa LPS *Yersinia enterocolitica* O:3

Lipopolisacharydy patogennych serotypów *Yersinia enterocolitica* charakteryzują się znacznym zróżnicowaniem składu chemicznego O-polisacharydu (OPS). Na podstawie ich budowy chemicznej pałeczki *Yersinia enterocolitica* podzielono na ponad 70 serotypów. Do głównych serotypów występujących w Europie należą O:3 i O:9 [Bottone, 1999; Carniel i wsp., 2006].

Pionierskie badania struktury chemicznej łańcucha O-swoistego LPS *Yersinia enterocolitica* O:3 prowadzone były na izolacie od pacjenta - szczepie dzikim Ye 128. Wykazano, że jest on homopolimerem zbudowanym z powtarzających się jednostek 6-deoksy-L-altrozy połączonych wiązaniem ($\beta 1 \rightarrow 2$) [Hoffmann i wsp., 1980]. Natomiast badania mające na celu określenie struktury rdzenia lipopolisacharydu *Yersinia enterocolitica* O:3 prowadzone były na mutantach defektywnych w budowie tego polimeru. Wykazano, że rdzeń spontanicznego mutantu Ye 75R (typ Rc) jest oktasacharydem i zawiera oprócz składników charakterystycznych, dodatkowo resztę D,D-Hep i dwie reszty Glc w porównaniu z rdzeniami LPS *E. coli* i *Salmonella* [Radziejewska-Lebrecht i wsp., 1994]. Natomiast, analizy LPS mutantu o chemotypie Ra YeO3-c-R1 wykazały, że cukrem na końcu redukującym (proksymalnym) rdzenia zewnętrznego jest 2-acetamido-2,6-dideoksy-D-ksylo-hekso-4-ulopiranoza (Sugp) [Pinta i wsp., 2009].

Warto podkreślić, iż skład i struktura chemiczna LPS mutantów Ra-Rc *Yersinia enterocolitica* jest odmienna niż LPS *Salmonella* tego samego chemotypu. Unikalny LPS *Yersinia* w części zewnętrznej rdzenia posiada oprócz glukozy i galaktozy inne heksozaminy (GalNAc, D-FucNAc).

Lipid A *Yersinia enterocolitica* serotypu O:3 i O:9 jest fosfoglikolipidem połączonym wiązaniem α -ketozydowym (kwasolabilnym) z resztą Kdo oligocukru rdzeniowego LPS. Posiada hydrofilowy szkielet dwucukrowy złożony z dwóch heksozamin w konfiguracji D-gluko (D-GlcN) połączonych wiązaniem ($\beta 1 \rightarrow 6$), który jest podstawiony dwoma grupami fosforanowymi i acylowany czterema cząsteczkami kwasów tłuszczowych C14:0(3OH) oraz po jednej C14:0 i C12:0. Lipid A *Yersinia* charakteryzuje się zmiennością w zakresie drugorzędowej acylacji w pozycji C2', do której w zależności od temperatury wzrostu mogą być przyłączone kwasy tłuszczowe: 12:0, 14:0 (ryc.1) [Aussel i wsp., 2000].



Ryc 1. Budowa lipidu A LPS: **a-** *Y. enterocolitica* O:11,23 i O:11,24; *Y. ruckeri* O:1 i O:2; **b-** *Y. enterocolitica* O:3 i O:9 [Aussel i wsp., 2000].

Regulacja genetyczna biosyntezy LPS *Yersinia enterocolitica* O:3

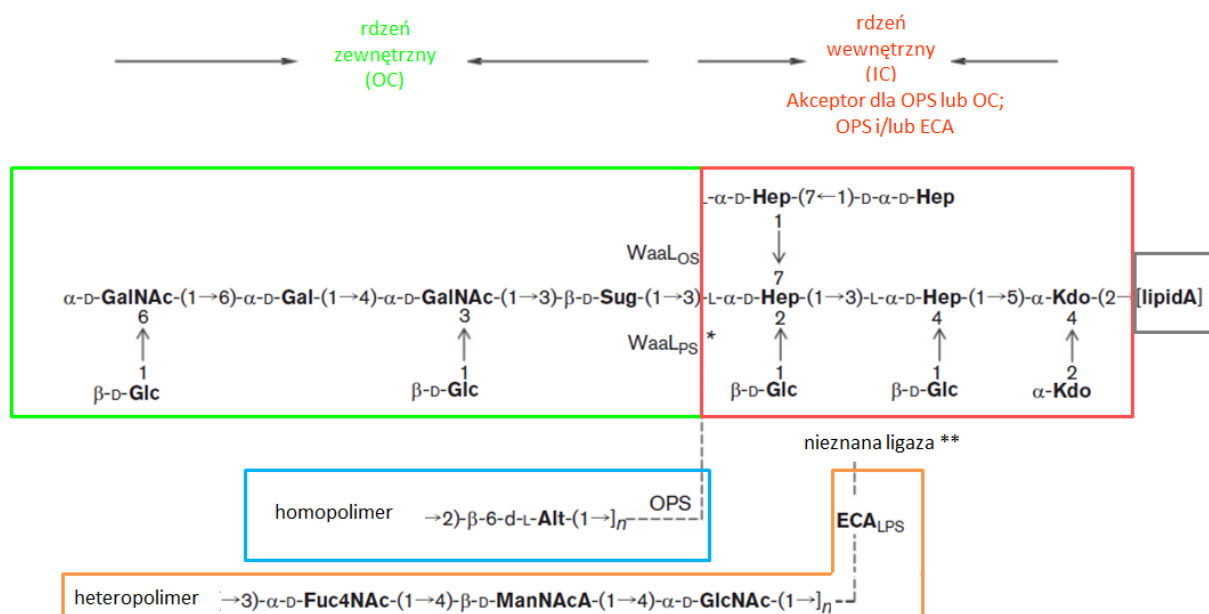
Geny odpowiedzialne za biosyntezę rdzenia zewnętrznego zorganizowane są w klastery, przedstawiony na ryc.2.



Ryc. 2. Klastery genów rdzenia zewnętrznego *Y. enterocolitica* O:3 [Skurnik i wsp., 1999].

Klastery genów zaangażowanych w syntezę rdzenia zewnętrznego *Y. enterocolitica* O:3 zlokalizowany jest pomiędzy genami *hemH* a *gsk*. Zidentyfikowano 12 genów, z których 9 zaangażowanych jest w biosyntezę tej części LPS. Gen *wx* koduje flipazę, odpowiedzialną za przenoszenie na peryplazmatyczną stronę błony wewnętrznej oligosacharydów, natomiast geny *wbcK*, *wbcL*, *wbcM*, *wbcN*, *wbcO* i *wbcQ* kodują glikozylotransferazy [Skurnik i wsp., 1999]. Produkty genów *gne* i *wbcP* odpowiadają za biosyntezę NDP-cukrów, prekursorów odpowiednio UDP-GalpNAc i UDP-Sugp [Pitna i wsp., 2009]. Badania molekularne wykazały, że rdzeń zewnętrzny *Y. enterocolitica* O:3 jest w rzeczywistości reliktem klastra genów kodującego O-polisacharyd (OPS), z którego tylko jedna powtarzająca się jednostka ulega obecnie ekspresji, a jego funkcja została częściowo przejęta przez homopolimer 6-deoksy-L-altrozy [Skurnik i wsp., 1995]. Operon rdzenia zewnętrznego *Y. enterocolitica* O:3

posiada wiele odpowiedników w operonie OPS innych *Enterobacteriaceae*. Serotyp O:3 *Yersinia*, w przeciwieństwie do innych serotypów *Y. enterocolitica* (za wyjątkiem O:9) i *Y. pseudotuberculosis* nie posiada pomiędzy genami *gne* i *gsk* genu *wzy* kodującego polimerazę OPS. **Homopolimeryczny OPS przyłączony jest bezpośrednio do rdzenia wewnętrznego** [Skurnik, 1999]. **Unikalna budowa LPS *Yersinia enterocolitica* wynika także z faktu, iż do rdzenia wewnętrznego YeO3 mogą być przyłączone: rdzeń zewnętrzny i/lub OPS bądź ECA**, co zostało potwierdzone analizami immunochemicznymi LPS szczepu dzikiego Ye75S, mutantu Rc Ye75R i mutantów szorstkich defektywnych w biosyntezie rdzenia zewnętrznego YeO3, a także unikalnych mutantów S (posiadających skrócony rdzeń zewnętrzny i pełny OPS) [Skurnik i wsp., 1995; Radziejewska-Lebrecht i wsp., 1998; Kasperkiewicz, 2002, praca doktorska; Radziejewska-Lebrecht i wsp., 2003; Pinta i wsp., 2009; Pinta i wsp., 2012; Muszyński i wsp., 2013]. Budowę lipopolisacharydu *Yersinia enterocolitica* O:3 przedstawiono na ryc. 3.



Ryc.3. Heterogenna struktura LPS *Y. enterocolitica* O:3 [Pinta i wsp., 2012; Muszyński i wsp., 2013; Noszczyńska i wsp., 2015]. Pojedyncza gwiazdka (*) wskazuje przypuszczalne miejsce przyłączenia OPS do IC. Podwójna gwiazdka (**) wskazuje kowalencyjne wiązanie ECA_{LPS} do nieznanego cukru IC. Waa_{LOS}, ligaza specyficzna dla OC; Waa_{LPS}, ligaza specyficzna dla OPS; ligaza specyficzna dla ECA nie jest znana.

Koncepcja badań

Badania Radziejewskiej-Lebrecht i wsp. [1998] wykazały, że mutant Ye75R, syntetyzujący LPS zbudowany jedynie z lipidu A i rdzenia wewnętrznego był ECA-immunogeny, tzn. stymulował wytwarzanie przeciwciał anty-ECA w surowicach immunizowanych zwierząt (królików). Sugerowało to, iż ECA u YeO3 jest przyłączony do LPS (ECA_{LPS}). Podjęto więc badania mutantów Rc i potwierdzono ich ECA-immunogenność podtrzymując tezę, iż rdzeń wewnętrzny LPS YeO3 jest miejscem wiązania ECA [Kasperkiewicz, 2002, praca doktorska; Radziejewska-Lebrecht i wsp., 2003; Muszyński i wsp., 2013].

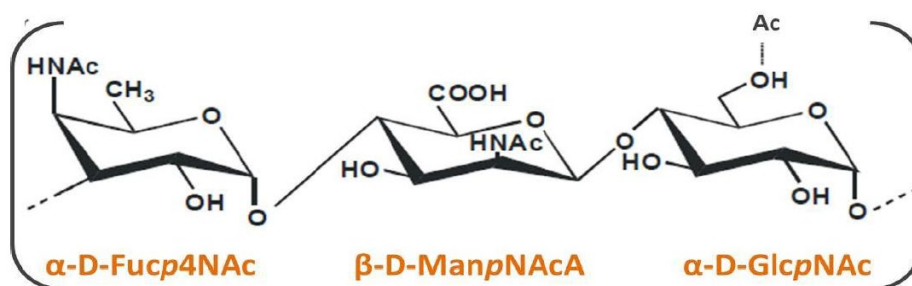
W celu identyfikacji reszty cukrowej rdzenia wewnętrznego LPS, odpowiedzialnej za przyłączenie ECA zaproponowałam konstrukcję mutantów defektywnych w biosyntezie kolejnych cukrów tego regionu, które zostały przygotowane w laboratorium biologii molekularnej pod kierunkiem profesora Mikaela Skurnika z Uniwersytetu w Helsinkach. Otrzymane mutanty *Yersinia* były następnie przedmiotem badań immunochemicznych i biologicznych (publikacja z cyklu osiągnięcia naukowego, Noszczyńska i wsp., 2015). Szczepy te zostały również wykorzystane w badaniach aktywności biologicznej LPS *Yersinia enterocolitica* O:3 – w szczególności – zdolności do aktywacji układu dopełniacza oraz oceny adiuwantowego działania LPS *Yersinia enterocolitica* O:3 na zwierzęcym modelu zapalenia stawów indukowanym kolagenem (publikacje z cyklu osiągnięcia naukowego: Kasperkiewicz i wsp., 2015 oraz Kasperkiewicz i wsp., 2020), a także udziału lipopolisacharydu *Yersinia enterocolitica* O:3 w patogenezie i przebiegu młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów (publikacje z cyklu osiągnięcia naukowego Kasperkiewicz i wsp., 2017, Kasperkiewicz i wsp., 2022).

Omówienie wyników publikacji:

Noszczyńska M., **Kasperkiewicz K.**, Duda K.A., Podhorodecka J., Rabsztyń K., Gwizdała K., Świerzek A.S., Radziejewska-Lebrecht J., Holst O., Skurnik M. 2015. Serological characterization of the enterobacterial common antigen substitution of the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Microbiology* 161:219–27; DOI:10.1099/mic.0.083493-0 (**załącznik 2.1**).

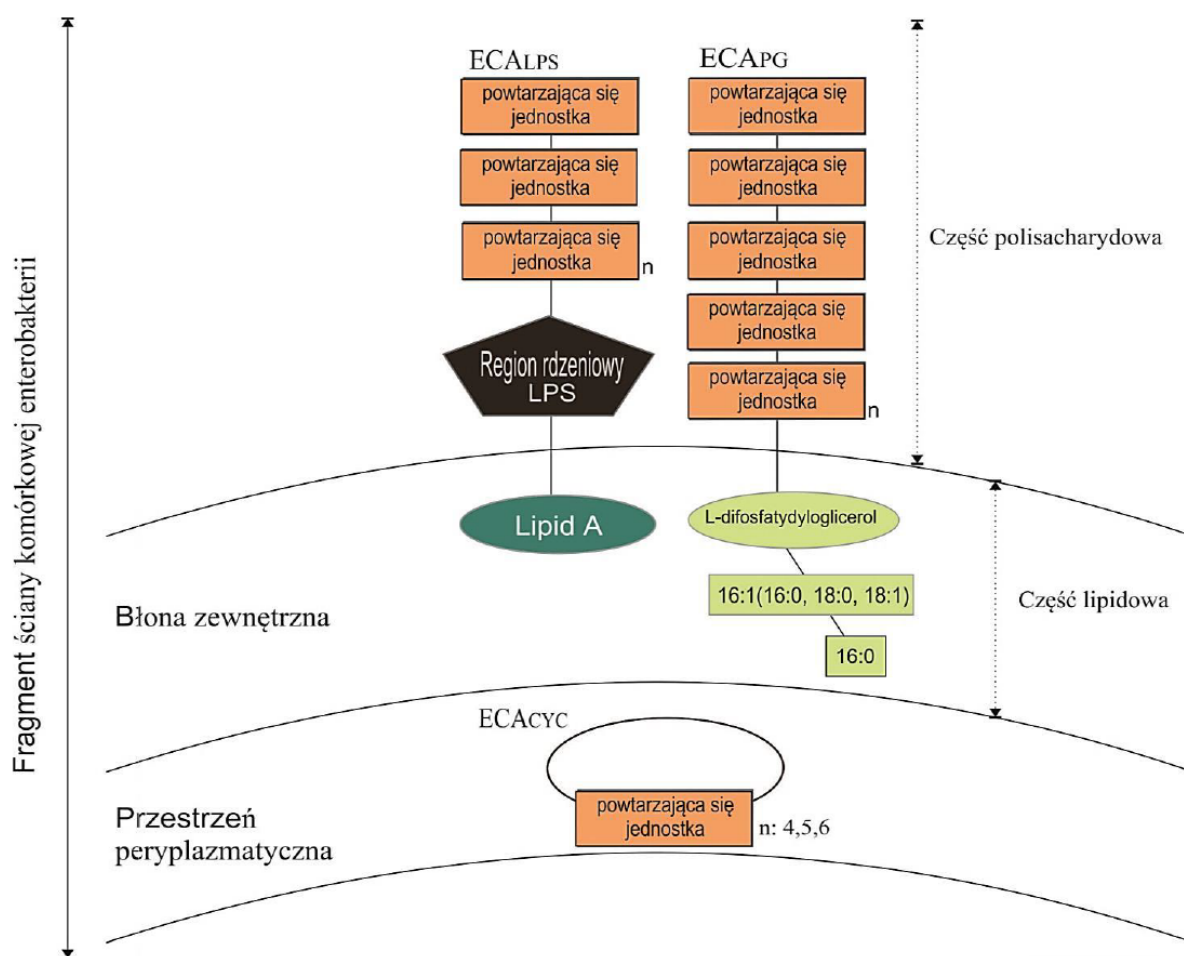
Wprowadzenie

Enterobakteryjny antygen wspólny (ECA) to polisacharyd występujący w błonie zewnętrznej ściany komórkowej bakterii rzędu Enterobacterales ord. nov. Zbudowany jest z powtarzających się trójczukrowych podjednostek, składających się z reszt α -D-Fuc4NAc, β -D-ManNAcA i α -D-GlcNAc i nośnika lipidowego (ryc.4).



Ryc. 4. Budowa trisacharydowej jednostki ECA [Kuhn i wsp., 1988; Danese i wsp., 1998].

Znane są jego dwie formy powierzchniowe: ECA_{PG} (zakotwiczona w błonie zewnętrznej za pomocą L-difosfatydyloglicerolu) oraz ECA_{LPS} (związana przez region rdzeniowy z lipidem A LPS). Trzecia forma: ECA_{CYC} występuje w przestrzeni peryplazmatycznej, zlokalizowanej między błoną wewnętrzną i zewnętrzną ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych i nie posiada nośnika lipidowego (ECA_{CYC}) (ryc.5).



Ryc.5. Formy ECA i ich lokalizacja u *E. coli* [Kasperkiewicz i wsp., 2015; Noszczyńska i wsp., 2015].
 Objaśnienia: Powtarzająca się jednostka: $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Fucp4NAc-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-ManpNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow]$.

Dotychczas, pomimo szczegółowych badań genetycznych i strukturalnych wiedza na temat znaczenia biologicznego ECA jest ograniczona. W nielicznych badaniach potwierdzono wpływ tego antygeny na wirulencje bakterii tj. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis [Kuhn i wsp., 1988; Gilbreath i wsp., 2012]. Wykazano m.in., iż ECA może przyczyniać się do oporności *E. coli* O157:H7 na kwasy organiczne [Barua i wsp., 2002]. Polisacharyd ten bierze udział w wiązaniu jonów wapniowych oraz w niewielkim stopniu jonów magnezowych, co może mieć wpływ na komórkowy bilans wapnia. Ujemnie naładowane cząsteczki ECA utrzymują stabilności błony zewnętrznej [Kuhn i wsp., 1988]. Dowiedziono, że obecność ECA jest wymagana do utrzymania odpowiedniego kształtu komórki *E. coli* [Jorgenson i wsp., 2016]. Kuhn i wsp. [1988] zaobserwowali, iż przeciwciała anty-ECA powstałe w surowicy skierowanej przeciwko *E. coli* reagowały krzyżowo

z preparatami LPS izolatów *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Shigella*. Jednak, tego typu przeciwciała wykryto tylko w surowicach skierowanych przeciwko nielicznym szczepom, określanym jako „ECA-immunogenne”. Rezultaty kolejnych badań sugerowały, że do ujawnienia się immunogenności ECA, konieczna była ekspresja LPS bez OPS [Mäkelä i Mayer, 1976]. Ekstrakcja metodą Galanosa [Galanos i wsp., 1969] (fenol/chloroform/eter naftowy; ang. Phenol/Chloroform/Petroleum; PCP) endotoksyny mutantów R potwierdziła to przypuszczenie. W jej wyniku otrzymano dwie frakcje, zawierające: ECA_{PG} oraz LPS i ECA_{LPS} (antygen ECA przyłączony do rdzenia LPS) [Kuhn i wsp., 1988]. ECA_{PG} wykazywało immunogenność, ale tylko i wyłącznie wtedy, kiedy było podane zwierzętom bez LPS [Kuhn i wsp., 1988]. Wykazano również, że **immunogenność ECA jest zależna od typu rdzenia LPS**. U mutantów *Salmonella* ECA-immunogenne były szczepy, które posiadały pełny region rdzeniowy typu Ra, lecz nie szczepy posiadające rdzeń LPS chemotypu Rb [Mäkelä i Mayer, 1976]. Podobnie wśród bakterii *E. coli* immunogenne były tylko te szczepy, które syntetyzowały LPS chemotypu Ra (rdzeń LPS typu coli R1, R4 oraz K-12 [Kuhn i wsp., 1988]. **Odmianą sytuację zaobserwowano w przypadku *Yersinia enterocolitica* O:3. Wykazano, że mutanty YeO3 syntetyzujące skrócony rdzeń zewnętrzny lub całkowicie go pozbawione również indukowały wytwarzanie przeciwciał anti-ECA u zwierząt doświadczalnych, co mogło wskazywać na obecność w komórce tych bakterii formy ECA_{LPS} [Radziejewska-Lebrecht i wsp., 1998; Radziejewska-Lebrecht i wsp., 2003; Kasperkiewicz, 2002, praca doktorska]. Dlatego celem badań opisanych w omawianej publikacji było potwierdzenie tezy, że lipopolisacharyd *Yersinia enterocolitica* O:3 jest akceptorem ECA (występuje forma ECA_{LPS}). Jednocześnie podjęto próbę określenia miejsca wiązania ECA w LPS tych mutantów, a także dokonano ich charakterystyki pod kątem zdolności do indukcji u zwierząt doświadczalnych przeciwciał anti-ECA i LPS.**

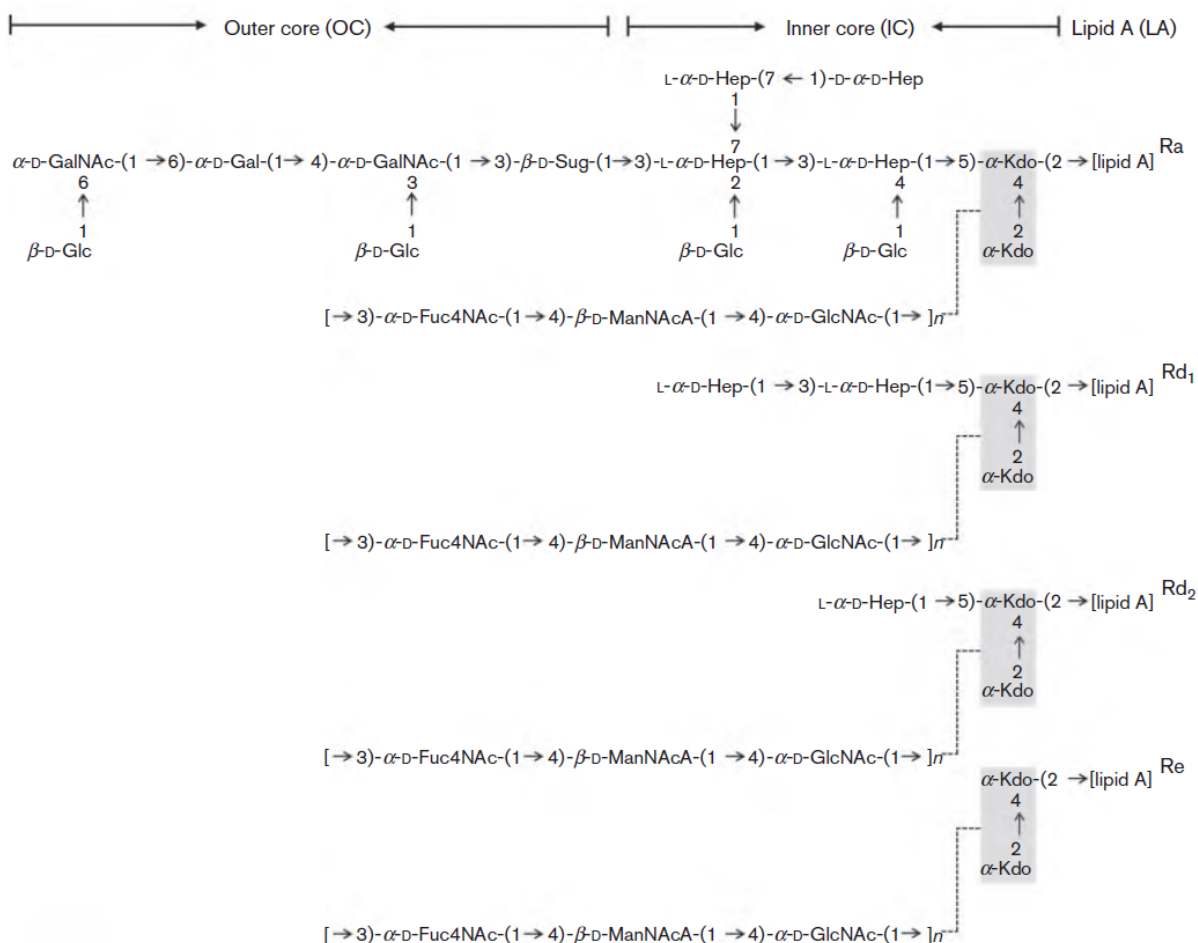
Jako model badawczy zastosowano trzy mutanty R *Yersinia enterocolitica* O:3 **defektywne w biosyntezie rdzenia wewnętrznego**: YeO3-c-R1-M196 YeO3-c-R1-M164, YeO3-c-R1-M205. Szczepy te zostały skonstruowane poprzez insercję transpozonu Cat-Mu do chromosomu YeO3-c-R1 [Pinta i wsp., 2009]. Mutant YeO3-c-R1-M196 posiadał mutację w genie *galU*, kodującym urydylotransferazę glukozo-1-fosforanu (pirofosforylazę UDP-glukozy), biorącą udział w biosyntezie UDP-glukozy [Gronow i wsp., 2000]. Mutant YeO3-c-R1-M164 zawierał mutację w genie *waaF*, kodującym heptozylotransferazę odpowiedzialną za dołączenie heptozy II do oligocukru rdzenia [Raetz i Whitfield, 2002; Pinta i wsp., 2012]. Z kolei w szczepie YeO3-c-R1-M205 zidentyfikowano mutację w genie *hldE*, kodującym HldE

(kinazę i ADP-transferazę zaangażowaną w biosyntezę ADP-D-*glicero*-D-*manno*-heptozy) [McArthur i wsp., 2005].

W celu ustalenia składu chemicznego LPS otrzymanych mutantów transpozonowych określono zawartość aminocukrów, cukrów neutralnych (jako alditoli) i kwasów tłuszczowych (jako estrów metylowych) za pomocą techniki chromatografii gazowej (GC) i analizy spektroskopii mas (ang. Electrospray Fourier-transformed ion cyclotron resonance mass spectrometry). Zawartość Kdo oznaczono przy użyciu metody kolorymetrycznej [Brade i wsp., 1983].

Analiza składu chemicznego wykazała we wszystkich preparatach LPS/PCP badanych mutantów obecność reszt: Kdo, glukozaminy (GlcN), a także L,D-Hep. Przeprowadzone analizy ilościowe potwierdziły wyższą zawartość L,D-Hep w preparatach LPS mutantu M196, niż LPS M164. W przypadku LPS mutantu M205, wykazano obecność tylko śladowych ilości tego cukru. W preparatach wykazano obecność kwasów tj.: 3-hydroksymirystynowego (14:0(3-OH)), mirystynowego (14:0), laurylowego (12:0) i śladowych ilości kwasu palmitynowego (16:0).

Wykonane analizy (profil elektroforetyczny, analiza GC/MS) pozwoliły przypisać chemotyp Rd₁ (2 L,D-Hep:2, Kdo-lipid A) mutantowi M196, chemotyp Rd₂ (L,D-Hep:2 Kdo-lipid A) mutantowi M164 i chemotyp Re (2 Kdo-lipid A) mutantowi M205 (ryc.6).



Ryc. 6. Struktury LPS mutantów głęboko szorstkich: Rd₁ (M196); Rd₂ (M164); Re (M205), i LPS szczepu YeO3-c-R1, mutant Ra [Pinta i in., 2012]. Linia przerywana wskazuje prawdopodobne, niestechiometryczne podstawienie przez ECA jednej z dwóch reszt Kdo (zaciemzony prostokąt). L,D-Hepp, L-glicero-D-manno-heptopiranoza; D,D Hepp, D-glicero- α -manno-heptopiranoza; Kdo, kwas 3-deoksy- α -D-manno-okt-2-ulozonowy; D-GlcpNAc, 2-acetamido-2-deoksy-D-glukopiranoza, D-Glcp, D-glukopiranoza; D-GalpNAc, 2-acetamido-2-deoksy-D-galaktopiranoza; D-Galp, α -D-galaktopiranoza; D-Sugp, 2-acetamido-2,6-dideoksy-D-ksylo-heks-4-ulopiranoza; D-Fucp4NAc, 4-acetamido-4,6-dideoksy-D-galaktopiranoza; D-ManpNAcA, kwas 2-acetamido-2-deoksy-mannopiranosouronowy.

W celu izolacji antygeny ECA przyłączonego do LPS (ECA_{LPS}) zastosowano protokół składający się z dwóch połączonych metod. Pierwszym etapem była izolacja antygenów LPS i obu form ECA (ECA_{LPS} , ECA_{PG}) z komórek bakteryjnych metodą fenol/woda (ang. Hot Phenol/ Water methods, Ph/W) [Westphal i Jann, 1965]. Następnie, preparaty LPS Ph/W poddano ekstrakcji metodą fenol/chloroform/eter naftowy (PCP) [Galanos i wsp., 1969], aby usunąć formę ECA_{PG} [Männel i Mayer, 1978]. **Aby wykazać obecność ECA_{LPS}**

w preparatach LPS_{PCP} wykonano czuły test Western blot z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych swoistych dla ECA (Mab898). Badane preparaty dały silną, pozytywną reakcję, w postaci charakterystycznego wzoru prążkowego w obszarze migracji wysokocząsteczkowych molekuł, co jednoznacznie dowiodło obecności tej formy ECA w preparatach LPS badanych mutantów.

Do badań nad ECA-immunogennością *Yersinia enterocolitica* O:3 otrzymano zestaw króliczych surowic odpornościowych. Do immunizacji zwierząt doświadczalnych użyto zawiesin komórek bakterii inaktywowanych termicznie (2,5 h, 100°C). Konsekwencją zastosowania takiego immunogenu, było powstanie mieszaniny przeciwciał przeciwko różnym ciepłostabilnym antygenom powierzchniowym, w tym LPS i ECA. Należy podkreślić, iż wcześniejsze badania mutantów R *Y. enterocolitica* O:3 wykazały że w tak otrzymywanych surowicach odpornościowych dominują przeciwciała anty-LPS, utrudniające wykrycie przeciwciał reagujących z ECA_{LPS} [Kasperkiewicz, 2002, praca doktorska; Radziejewska-Lebrecht i wsp., 2003]. Związane jest to z faktem, że nie każda cząsteczka LPS podstawiona jest przez ECA [Kuhn i wsp., 1988; Goździewicz i wsp., 2014]. Oddziaływania te mogą być również hamowane lub osłabiane przez białka surowicze. Dlatego, aby uzyskać wyraźniejsze reakcje przeciwciał anty-ECA z testowanymi antygenami, badane surowice poliwalentne poddano dodatkowemu protokołowi usunięcia niespecyficznych białek z użyciem kwasu kaprylowego. Zastosowano również absorpcję badanych surowic komórkami wariantu *Y. enterocolitica* O:3 o LPS zredukowanym do regionu rdzenia wewnętrznego i z zablokowaną syntezą ECA (mutant YeO3-c-OCR-ECA, ECA-ujemny) [Rabsztyn i wsp., 2011]. Niestety, oczyszczanie surowic z zastosowaniem kwasu kaprylowego znacząco obniżyło poziom przeciwciał swoistych dla tej formy antygeny. W surowicach dominowały przeciwciała reagujące z preparatami LPS badanych szczepów. Interesujące, iż immunoglobuliny reagowały zarówno z frakcjami wysokocząsteczkowymi, jak i niskocząsteczkowymi antygenów (LPS_{PCP} i ECA_{PG}) zastosowanych w teście Western blot. **Ponieważ LPS_{PCP} użyte jako antygeny nie zawierały O-polisacharydu można wnioskować, że widoczny wzór drabinkowy pochodził od reakcji z antygenem ECA, który jest związany z lipopolisacharydem (forma ECA_{LPS}).** Największym zaskoczeniem dla badaczy był fakt wykrycia w surowicy anty-M205 przeciwciał, które reagowały pozytywnie z antygenem kontrolnym ECA_{PG}. Ponieważ LPS mutantu M205 posiada chemotyp Re (zbudowany jest tylko z regionu Kdo-lipid A) otrzymany wynik może pośrednio wskazywać, iż region Kdo LPS jest akceptorem ECA, co stanowi *novum* w badaniach endotoksyn. Wnioskowanie to jest również zasadne z tego względu, że

przeciwciała anty-ECA obecne w tej surowicy nie reagowały w testach immunologicznych z wolnym lipidem A tego mutantu.

Podsumowując, po raz pierwszy, stosując metody immunochemiczne, wykazano występowanie formy ECA_{LPS} u *Yersinia enterocolitica* oraz udowodniono, iż nie tylko pełny rdzeń LPS typu coli R1, R4 i K12 jak dotąd opisywano w literaturze tematu może być akceptorem polisacharydu ECA, ale również rdzeń LPS typu Rd₁, Rd₂, a nawet Re. Można również wnioskować, że region Kdo-lipid A LPS *Yersinia enterocolitica* O:3 jest miejscem przyłączenia ECA. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia w badaniach strukturalnych LPS *Yersinia enterocolitica* O:3, które są obecnie prowadzone we współpracy z profesorem Jolantą Łukasiewicz z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Warto podkreślić, iż prezentowane wyniki stanowią również nowe spojrzenie na zjawisko immunogenności pałeczek *Yersinia enterocolitica* O:3. Odkrycie LPS z przyłączonym ECA (ECA_{LPS}) w komórkach tych bakterii może mieć bardzo istotne znaczenie w opracowaniu nowych metod diagnostycznych lub terapeutycznych zakażeń tymi mikroorganizmami. Ze względu na wielopostaciowość jersiniozy oraz wspólne objawy z wieloma chorobami o innej etiologii, rozpoznanie tej jednostki powinno opierać się nie tylko o obraz kliniczny, ale również diagnostykę mikrobiologiczną i serologiczną. **Otrzymane wyniki badań mogą stanowić podstawę do poszerzenia procedur diagnostycznych o oznaczenie poziomu przeciwciał anty-LPS i anty-ECA u pacjentów diagnozowanych w kierunku zakażeń *Yersinia enterocolitica* O:3.** W literaturze tematu opisywane są również próby zastosowania przeciwciał anty-oligosacharyd rdzenia LPS w leczeniu posocznicy [Cross, 2014]. Być może połączenie w terapii przeciwciał anty-LPS i anty-ECA w zwalczaniu enterobakteryjnych zakażeń byłoby bardziej efektywne. **Wyniki prezentowane w omawianej publikacji wydają się być również znaczącym uzupełnieniem wiedzy dotyczącej roli biologicznej LPS (nośnik antygeny ECA).**

Omówienie wyników publikacji:

Kasperkiewicz K., Świerzek A.S., Bartłomiejczyk M.A., Cedzyński M., Noszczyńska M., Duda K. A., Michalski M., Skurnik M. 2015. Interaction of human mannose-binding lectin (MBL) with *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide. International Journal of Medical Microbiology 305: 544–52; DOI:10.1016/j.ijmm.2015.07.001 (załącznik 2.2).

Wprowadzenie

Układ dopełniacza jest ważnym mechanizmem wrodzonej odpowiedzi odpornościowej. Obejmuje kaskadowo aktywowane czynniki C3, C4 i C5, błonowe białka regulatorowe (CD46, CD55 i CD59) i fazy płynnej (np. inhibitor C1, czynnik I, czynnik H) oraz receptory (np. C3aR, C5aR czy CD11b/CD18) [Ehrnthaller i wsp. 2011]. Pełni główną rolę w rozpoznawaniu i eliminacji patogenów oraz uszkodzonych komórek gospodarza, ułatwia fagocytozę drobnoustrojów lub powoduje ich lizę [Zhang i wsp. 2013]. Układ ten może być aktywowany na drodze tzw. klasycznej, alternatywnej oraz lektynowej. Szlaki te łączą się w miejscu tworzenia konwertazy C3 i C5, co prowadzi do powstania opsonin (C3b i C4b), anafilatoksyn o aktywności chemotaktycznej (C3a, C5a) oraz kompleksu atakującego błonę (C5b-9, ang. **Membrane Attack Complex, MAC**) [Melis i wsp. 2015].

Czynnikami rozpoznania swoistymi dla szlaku lektynowego są kolektyny, w tym **lektyna wiążąca mannozę (mannose-binding lectin, MBL)** oraz fikoliny: fikolina-1 (M), **fikolina-2 (L)** i fikolina-3 (H, antygen Hakata). Białka te występują w surowicy jako kompleksy z proteazami serynowymi MASP (MBL-Associated Serine Proteases), wykazując zdolność do rozpoznawania bogatych w cukry struktur na powierzchni drobnoustrojów. MBL oraz fikoliny są oligomerami. Struktury te posiadają region o budowie zbliżonej do kolagenu (ang. collagen-like domain), dzięki któremu tworzą kompleksy z proteazami serynowymi MASP [Fujita 2002, Ballegaard i wsp. 2014]. Lektyna wiążąca mannozę zawiera charakterystyczną domenę lektynową (ang. **Carbohydrate Recognition Domain, CRD**), która odpowiada za rozpoznawanie reszt cukrowych na powierzchni drobnoustrojów. W cząsteczkach fikolin rolę tę pełni domena fibrynogenopodobna (ang. fibrinogen-like domain, FBG). Lektyna wiążąca mannozę posiada stosunkowo szeroką swoistość. MBL wykazuje silne powinowactwo w stosunku do D-mannozy (Man), N-acetylo-D-glukozaminy (GlcNAc), N-acetylo-D-mannozaminy (ManNAc) i L-fukozy (wiązaną z grupami -OH przy C2 i C3). Cukry te powszechnie występują na powierzchni drobnoustrojów, tworzą konserwatywne wzorce związane z patogenami (ang. **Pathogen-Associated Molecular Patterns; PAMP**) [Thiel 2007, Endo i wsp. 2011, Mason i Tarr 2015]. Miejscem wiązania lektyny na powierzchni mikroorganizmów, wirusów oraz robaków pasożytniczych mogą być również wielocukry i glikokoniugaty tj. glikoproteiny, **lipopolisacharydy**, lipooligosacharydy, kwasy lipotejchojowe, lipoarabinomannany. MBL może działać jak opsonina ułatwiając pochłanianie i zabijanie drobnoustrojów patogennych przez fagocyty. Aktywność opsonizacyjna przyczynia się do usuwania komórek apoptotycznych, nekrotycznych, nowotworowych, a także

kompleksów immunologicznych, chroniąc organizm przed przewlekłymi stanami zapalnymi, autoimmunizacją i rozwojem nowotworów [Cedzyński i wsp., 2019].

Jak wspomniano wcześniej, jedną z najważniejszych funkcji biologicznych lektyny wiążącej mannozę (MBL) jest aktywacja układu dopełniacza na drodze lektynowej. Po przyłączeniu się kompleksu MBL-MASP do struktur docelowych, w cząsteczce lektyny dochodzi do zmian konformacyjnych prowadzących do aktywacji proteaz (MASP-1, MASP-2) i następuje ekspozycja miejsca wiązania składnika C4 oraz centrum katalitycznego. Zaktywowany enzym rozkłada C4 na fragmenty C4a i C4b. Następnie trawieniu ulega składnik C2, uwalniając fragmenty C2a, które wiążą się do C4b oraz C2b. Powstała konwertaza C4b2a aktywuje składnik C3, w wyniku czego powstają cząsteczki C3a (anafilatoksyna) i C3b, która wiąże się za pomocą grup tioestrowych z grupami hydroksylowymi lub aminowymi struktur powierzchniowych mikroorganizmów. Aktywna konwertaza C4b2a3b aktywuje składnik C5, który uwalnia cząsteczkę C5a (silna anafilatoksyna), natomiast cząsteczka C5b może przyłączyć składowe C6-C9, w konsekwencji czego powstaje kompleks atakujący błonę C5b-9 (MAC) i dochodzi do lizy komórki docelowej [Matsushita i wsp. 2013].

Celem badań w omawianej publikacji, była ocena interakcji lektyny wiążącej mannozę z komórkami *Y. enterocolitica* O:3 oraz próba określenia regionu LPS *Y. enterocolitica* rozpoznawanego przez ludzką MBL (surowiczą i rekombinowaną). Stosując metody cytometrii przepływowej oraz Western blot badano oddziaływanie MBL z inaktywowanymi komórkami *Y. enterocolitica* O:3 (6471/76, szczep dziki) oraz mutantów o zahamowanej na różnych etapach syntezy LPS, aby rozpoznać region endotoksyny odpowiedzialny za jej wiązanie. Kolekcję szczepów użytą w badaniach otrzymano dzięki uprzejmości profesora Mikaela Skurnika (Uniwersytet w Helsinkach). Szczepy te stanowiły także model badawczy zastosowany do oceny oddziaływania MBL z wspólnym antygenem enterobakteryjnym (ECA).

Otrzymane wyniki badań cytometrycznych sugerują, że obecność oligosacharydu rdzenia zewnętrznego LPS (OC) lub jednoczesna ekspresja wielocukru O-swoistego (OPS) i ECA w cząsteczce endotoksyny uniemożliwiają przyłączanie lektyny do powierzchni bakterii. Najsilniejsze interakcje zanotowano w przypadku szczepów o chemotypach Rc i Rd₁, syntezujących LPS zawierający kompletny (Rc) lub niepełny (Rd₁) oligosacharyd rdzenia wewnętrznego (IC) oraz pozbawiony regionów OPS i OC (niezależnie od obecności ECA). Zablockowanie syntezy IC na wcześniejszym etapie (chemotyp Rd₂, Re) uniemożliwiało jednak wiązanie MBL. Ponadto, wykazano, że lipopolisacharyd o chemotypie Rc otrzymany ze

szczepów syntezujących ECA wiąże MBL znacznie silniej niż LPS o tym samym chemotypie, pochodzący z komórek mutanta pozbawionego zdolności syntezy ECA (ECA-ujemnego). **Może to sugerować, że przy nieobecności OC i OPS, wspólny antygen enterobakteryjny (ECA) modyfikuje wiązanie lektyny.**

Na podstawie uzyskanych wyników, można wnioskować, że **miejscem wiązania dla badanej lektyny w LPS *Y. enterocolitica* są reszty heptozowe, zlokalizowane w oligosacharydzie rdzenia wewnętrznego.** Wykazano, że MBL rozpoznaje LPS typu Rd₂, co sugeruje, że nawet jedna reszta heptozy wchodząca w skład defektywnego IC może stanowić ligand dla tej cząsteczki. Wiązanie było najsilniejsze w przypadku LPS chemotypu typu Rc (cztery reszty heptozowe w kompletnym IC), natomiast nie występowało w przypadku LPS chemotypu Re (pozbawiony reszt heptozowych).

Ekspresja niektórych cech wirulencji *Yersinia enterocolitica* O:3 jest regulowane temperaturą wzrostu tego mikroorganizmu. Dla tego w prowadzonych badaniach oceniano metodami immunologicznym (ELISA i Western blot) wiązanie MBL z lipopolisacharydami wybranych szczepów, hodowanych w różnych temperaturach (22°C i 37°C). **Zaobserwowano wpływ temperatury wzrostu bakterii na badane oddziaływanie, widoczne było silniejsze wiązanie MBL do LPS otrzymanego z drobnoustrojów hodowanych w niższej temperaturze, czyli 22°C (szczególnie dla LPS o chemotypie Rc).**

Postanowiono również zbadać, czy wiązanie MBL z bakteriami *Y. enterocolitica* poprzez ich LPS może inicjować aktywację układu dopełniacza na drodze lektynowej. W tym celu wykonano badania depozycji produktów aktywacji składnika C4 metodą Western blot. Zgodnie z oczekiwaniami tylko mutant typu Re (LPS nie zawiera heptoz, tylko region Kdo-lipid A) nie aktywował układu dopełniacza na szlaku lektynowym, podczas gdy pozostałe szczepy deponowały produkty aktywacji C4. **Jednoznacznie udowodniono, że interakcja MBL (jako kompleks z proteazami MASP) z regionem rdzenia wewnętrznego LPS *Yersinia* może prowadzić do aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej.** Przedstawione wyniki sugerują, że MBL po związaniu się z LPS *Y. enterocolitica* O:3 jest silnym aktywatorem tego układu, co w konsekwencji może przełożyć się na nasilenie reakcji zapalnej w procesach chorobowych, a także przyczynić się do skutecznej eliminacji patogenu.

Omówienie wyników publikacji:

Kasperkiewicz K., Świerzek A. S., Przybyła M., Szemraj J., Barski J., Skurnik M., Kałużyński A., Cedzyński M. 2020. The Role of *Yersinia enterocolitica* O:3 Lipopolysaccharide in Collagen-Induced Arthritis. *Journal of Immunology Research* 1–12; DOI: 10.1155/2020/7439506 (**załącznik 2.3**).

Wprowadzenie

Reaktywne zapalenie stawów (ang. **Reactive Arthritis, ReA**) jest nieropnym zapaleniem stawów rozwijającym się po przebyciu zakażeniu przewodu pokarmowego, układu moczowo-płciowego lub oddechowego. Należy do grupy tzw. seronegatywnych spondyloartropatii. W etiopatogenezie ReA istotną rolę odgrywa czynnik infekcyjny. Czynnikiem etiologicznym tzw. reaktywnego zapalenia stawów w następstwie zakażeń jelitowych (ang. post enteric reactive arthritis) są najczęściej pałeczki jelitowe takie, jak: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* serotypów O:3, O:8, O:9, *Campylobacter jejuni* oraz *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* i *Clostridium difficile* [Macaubas i wsp., 2009]. Silny potencjał artrytogeny *Y. enterocolitica* O:8 LPS wykazali Di Genaro i wsp. [2000] na modelu zwierzęcym. Granfors i wsp. [1998] wykryli LPS w leukocytach pacjentów chorujących na ReA wywołanym przez *Y. enterocolitica* O:3 ponad cztery lata po zakażeniu. Bakterie te mogą trafić do krążenia, a następnie zostać przeniesione do stawów. Zaobserwowano, że po wyeliminowaniu mikroorganizmów ich składniki komórkowe (w tym lipopolisacharyd) mogą nadal utrzymywać się w stawach i przyczyniać się do patologicznych zmian. Wuorela i wsp. [1993] wykazali, że w wyniku przetwarzania wewnątrzkomórkowego większość cząsteczek LPS prezentowanych na powierzchni np. monocytów jest pozbawiona regionu O-polisacharydowego (OPS).

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS, ang. Rheumatoid arthritis) jest przewlekłą, zapalną układową chorobą tkanki łącznej o podłożu immunologicznym. Etiologia RZS nie została wystarczająco poznana, a w patogenezie tego schorzenia odgrywają rolę czynniki genetyczne i środowiskowe. W rozwoju tego schorzenia sugeruje się silny udział autoimmunizacji wobec kolagenu. W badaniach naukowych **reumatoidalne zapalenie stawów** najczęściej wywołuje się u zwierząt doświadczalnych stosując kompletny adiuwant Freund. Uważa się, że substancja ta aktywuje nadmierną stymulację odpowiedzi immunologicznej, prowadząc do ogólnoustrojowej reakcji zapalnej i przyczyniając się do wzmożonej aktywacji odporności humoralnej i komórkowej, w tym produkcji przeciwciał specyficznych dla kolagenu typu II (CII) [Billiau, Matthys, 2011]. **Podobną aktywność wykazano dla bakteryjnych**

lipopolisacharydów. Terato i in. [2009] wykazali, że jednoczesne podawanie doustne LPS *E. coli* i kolagenu typu II (CII) zwiększało produkcję przeciwciał i odpowiedź komórek T. Badania przeprowadzono na zwierzęcym modelu zapalenia stawów wywołanym kolagenem (ang. Collagen-Induced Arthritis, CIA), który przypomina ludzkie reumatoidalne zapalenie stawów (RZS).

Oprócz działania toksycznego LPS bakteryjny posiada silne właściwości immunomodulujące. Endotoksyna zaliczana jest do tzw. antygenów T-niezależnych typu I, (immunogennych zarówno dla myszy normalnych, jak i tych pozbawionych grasicy (myszy nu/nu), stymulujących syntezę przeciwciał wszystkich klas, w tym głównie IgG2a). Aktywność adiuwantowa LPS związana jest głównie z regionem lipidu A. Stosując syntetyczne analogi tego regionu wykazano, iż działanie to w dużym stopniu uwarunkowane jest rodzajem i liczbą kwasów tłuszczowych [Chiller i wsp., 1973]. Wynika ono ze zdolności stymulowania makrofagów do wydzielania szeregu cytokin modulujących reakcje odpornościowe, a także taksji komórek prezentujących antygen (ang. Antygen Presenting Cell, APC). W badaniach wykazano również, że adiuwantowo może działać nie tylko lipid A, ale również O-polisacharyd (OPS). Kido i wsp. [1985] opisali bardzo silne działanie adiuwantowe dla LPS *Klebsiella pneumoniae* O:3 (KO3), którego wielocukier O-swoisty (OPS) jest homopolimem mannozy. Obserwowano również zdolność LPS KO3 do nasilenia wytwarzania przeciwciał przeciwko komórkom tarczycy i jąder [Yokochi i wsp., 1992; Peang i wsp., 1999]. Co ciekawe, Takahashi i wsp. [1999] wykazali, że immunizacja zwierząt doświadczalnych mieszaniną świńskiego kolagenu typu II (CII) i LPS KO3 powodowała zniszczenie stawów, rozrost błony maziowej wraz z proliferacją komórek oraz naciek komórek zapalnych.

Rozwój odporności nabytej prowadzącej do powstawania przeciwciał może być związany z aktywacją układu dopełniacza. Dempsey i wsp. [1996] wykazali, że przyłączenie produktu aktywacji C3 dopełniacza (C3d) do lizozymu jaja kurzego znacznie zwiększa jego immunogenność. W przypadku LPS KO3 silne działanie adiuwantowe można przypisać jego oddziaływaniu z lektyną wiążącą mannozę (MBL), a co za tym idzie aktywacji dopełniacza poprzez szlak lektynowy. Man-Kupisińska i wsp. [2018] udowodnili, że MBL wiąże się z O-polisacharydem oraz rdzeniem zewnętrznym (OC) i wewnętrznym (IC) LPS wielu szczepów bakterii z rodziny Enterobacteriaceae.

Liczne badania naukowe wykazały, że układ dopełniacza odgrywa znaczącą rolę w przebiegu zapalenia stawów. Stwierdzono, że hamowanie jego aktywności wiąże się z łagodniejszą postacią choroby, a u myszy z niedoborem składników tego układu zapalenie

stawów nie występowało [Hietala i wsp., 2002]. Banda i wsp. [2002] wykazali u zwierząt doświadczalnych, iż aktywacja alternatywnej drogi aktywacji dopełniacza pełni kluczową rolę w indukcji zapalenia stawów związanego z przeciwciałami antykolagenowymi. W mysim modelu zapalenia stawów badacze zaproponowali mechanizm związany z udziałem MASP-3 (niezwiązany lub związany z fikoliną-B, ale nie z MBL-A lub MBL-C) w rozszczepieniu czynnika pro-D. Zaobserwowali, że myszy z niedoborem MASP-1/3 były chronione przed rozwojem zapaleniem stawów [Banda i wsp., 2011; Banda i wsp., 2010], natomiast u zwierząt MASP-2^{-/-}/sMAP^{-/-} aktywność choroby była znacznie mniejsza [Banda i wsp., 2017].

Wielu badaczy sugerowało, iż klasyczna i lektynowa droga aktywacji dopełniacza nie jest istotna w patogenezie zapalenia stawów, jednak badania dotyczące aktywacji drogi lektynowej przez LPS artrytogennych pałeczek *Yersinia* rzucają nowe spojrzenie na tę kwestię [Kasperkiewicz i wsp. 2015], **dlatego celem badań omawianej pracy było zbadanie na modelu zwierzęcym, czy LPS *Yersinia enterocolitica* O:3 przyczynia się do progresji zapalenia stawów poprzez działanie adiuwantowe (tj. poprzez aktywację dopełniacza na drodze lektynowej).**

Aby ocenić możliwy udział LPS *Yersinia enterocolitica* O:3 w rozwoju zapalenia stawów wywołanego kolagenem, myszy BALB/c immunizowano kolagenem kurzym typu II (CII) zmieszany z: LPS ze szczepu 6471/76-c lub z LPS z kompletnym zewnętrznym rdzeniem (YeO3-c-R1, chemotyp Ra) lub LPS zbudowanym z lipidu A i rdzenia wewnętrznego (YeO3-c-R1-M181, chemotyp Rd₁). Jako kontrolę pozytywną użyto mieszaninę CII z LPS *K. pneumoniae* O:3 (KO3). Otrzymane wyniki porównano z wynikami uzyskanymi dla myszy traktowanymi wyłącznie CII lub roztworem chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS). Zwierzęta szczepiono w okolicach tylnej pachwiny, sześciokrotnie, w odstępach trzydziestodniowych.

Dwadzieścia dni po ostatniej immunizacji, oceniono parametry chodu swobodnie poruszających się myszy za pomocą systemu analizy chodu CatWalk. Analiza parametru tzw. bazy wsparcia (ang. Base of Support, BOS) i maksymalnego kontaktu przednich i tylnych łap z podłożem wykazały, że wstrzyknięcie CII wywołało różnice w analizowanych parametrach. Iniekcja CII doprowadziła do wzrostu parametru BOS tylnej łapy i zmniejszenia maksymalnego kontaktu łapy myszy z podłożem. Ko-iniekcja LPS doprowadziła do wzrostu parametru BOS kończyn tylnych. Chociaż nie zaobserwowano istotnych różnic klinicznych w zależności od chemotypu endotoksyny *Yersinia*, LPS KO3 powodował najwyższy wzrost badanych parametrów. Podobną reakcję zwierząt na podane immunogeny zaobserwowano również dla

przednich łap. Traktowanie myszy CII zmieszonym z LPS KO3 powodowało ponadto rumień prawych tylnych łap. Zbliżony efekt zaobserwowano w przypadku myszy, którym wstrzyknięto CII i LPS *Yersinia* chemotypu Rd₁.

Uzyskane wyniki wykazały, że wielokrotne podanie kolagenu typu II lub jego ko-iniekcje z LPS dowolnego chemotypu indukowały patologiczne zmiany w tylnych łapach wyrażone zaburzeniami chodu zwierząt. Chociaż nie wykazano widocznego obrzęku, łapy niektórych zwierząt były zaczerwienione i bardzo wrażliwe na dotyk. Jednocześnie silne działanie adiuwantowe zaobserwowano wyraźnie tylko w przypadku LPS KO3 podanego w celu wzmocnienia efektu wywołanego przez CII.

Aby ocenić możliwy wpływ aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej na właściwości adiuwantowe LPS *Yersinia enterocolitica* zbadano w teście ELISA interakcję lektyn (MBL-A i MBL-C), występujących w surowicy myszy z różnymi pod względem chemotypu lipopolisacharydami. Jako kontrolę pozytywną zastosowano LPS *K. pneumoniae* O:3. Uzyskane wyniki wskazywały na różnice w oddziaływaniu MBL z badanymi endotoksynami. MBL-C wykazywał najsilniejsze powinowactwo do LPS KO3 i LPS YeO3 Rd₁, podczas gdy interakcja MBL-A z tymi antygenami była dużo słabsza. Reaktywność MBL-A i MBL-C z LPS YeO3 chemotypu Ra była podobna. Należy wspomnieć, że poziom surowiczego MBL-C u myszy jest kilka razy wyższy w porównaniu ze stężeniem MBL-A. Żadna z mysich form MBL nie oddziaływała z LPS szczepu 6471/76-c (chemotyp S). **Uzyskane wyniki wskazują, że u gryzoni lektyny: MBL-A i MBL-C (podobnie jak ludzka MBL) rozpoznają heptozy w rdzeniu wewnętrznym LPS *Y. enterocolitica* O:3.**

W omawianej pracy zbadano również, czy wiązanie MBL z testowanymi LPS prowadzi do powstania kompleksu MBL-MASP-1, co wiąże się z aktywacją dopełniacza na szlaku lektynowym. Zaobserwowano, że LPS chemotypu Rd₁ aktywuje związaną z MBL proteazę serynową 1 (MASP-1) silniej niż LPS chemotypu S i Ra, porównywalnie z LPS *Klebsiella pneumoniae* O:3. Uzasadnione jest więc wnioskowanie, że LPS o chemotypie Rd₁ (zawierający 2 reszty heptozowe w rdzeniu wewnętrznym oraz region Kdo-LipidA) ma podobną zdolność do aktywacji kompleksu MBL-MASP-1 jak bogaty w mannozę LPS KO3.

Immunizacja zwierząt mieszaniną CII i LPS doprowadziła do powstawania zarówno przeciwciał anty-kolagenowych, jak i anty-LPS. Takich immunoglobulin nie wykryto w surowicach myszy traktowanych wyłącznie PBS. Spośród badanych endotoksyn jedynie LPS KO3 posiadał aktywność adiuwantową, wzmacniając syntezę przeciwciał anty-CII.

Przeciwnie działanie zaobserwowano dla LPS *Yersinia*, który raczej obniżał (choć nieznacznie) poziom wytworzonych przeciwciał swoistych dla kolagenu typu II.

Długotrwałe podawanie zwierzętom CII lub CII z LPS nie wpłynęło istotnie na ich masę ciała. Jednak wstrzyknięcie CII i LPS *Yersinia*, niezależnie od jego chemotypu, spowodowało znaczne obniżenie masy wątroby w porównaniu z osobnikami z grupy kontrolnej, traktowanymi PBS. U zwierząt szczepionych LPS chemotypu Rd₁ masa tego narządu była mniejsza niż w przypadku myszy, którym podawano tylko CII. Nie zaobserwowano również hepatotoksyczności LPS KO3. Interesujące, iż immunizacja mieszaniną CII i LPS (niezależnie od jego chemotypu) była związana z istotnym powiększeniem pachwinowych węzłów chłonnych.

Podjęto również badania (metodą PCR w czasie rzeczywistym; ang. Real-time PCR) wpływu immunizacji LPS *Yersinia* na ekspresję MBL-A i MBL-C w wątrobie myszy. Obserwowano, znacząco niższą ekspresję MBL-C po traktowaniu zwierząt CII w stosunku do kontroli negatywnej (PBS). W przypadku podania CII lub jego mieszaniny z badanymi LPS *Yersinia* obserwowano znaczące obniżenie poziomu MBL-C w surowicy. Tendencję do obniżenia stężenia MBL-A w surowicy obserwowano po zastosowaniu samego CII lub po zastosowaniu CII razem z LPS chemotypu Ra i Rd₁ *Yersinia*.

Podsumowując, wykazano, że mysia forma MBL-C rozpoznaje heptozy rdzenia wewnętrznego LPS chemotypu Rd₁ *Yersinia*. Ponadto ten chemotyp LPS silniej aktywuje kompleks MBL z proteazą serynową MASP-1 niż chemotyp S i Ra LPS *Yersinia*. Silne działanie adiuwantowe wykazano dla LPS KO3, natomiast LPS *Yersinia* chemotypu Rd₁ nie wykazywał takiego działania, nie nasilał też patologicznych zmian w łapach myszy. W tym przypadku nie obserwowano również upośledzenia w poruszaniu się zwierząt. Z drugiej strony LPS *Yersinia* chemotypu Rd₁ wydaje się być bardziej hepatotoksyczny w porównaniu z innymi testowanymi endotoksynami. Warto podkreślić, że powiększenie węzłów chłonnych pachwinowych oraz spadek ekspresji MBL-C w wątrobie (na poziomie mRNA) były niezależne od chemotypu LPS.

Uzyskane wyniki wskazują na brak aktywności adiuwantowej (ocenianej poprzez wpływ na poziom produkowanych przeciwciał swoistych dla kolagenu) badanych lipopolisacharydów *Yersinia*, niezależnie od ich chemotypu czy reaktywności z MBL. Z drugiej strony, **można sugerować udział LPS *Yersinia* w rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów u zwierząt doświadczalnych. Na taką aktywność endotoksyny mogą wskazywać obserwowane zmiany stężeń lektyny wiążącej mannozę, poziomu ekspresji**

genów kodujących czynniki aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej, zmiany morfologiczne obserwowane u zwierząt czy też zmiany ich zachowania (monitorowane za pomocą CatWalk XT 9.1.). Na szczególną uwagę zasługuje obniżenie ekspresji genu *mbl-c* i jednocześnie, stężenia jego produktu (MBL-C) w surowicy myszy. Można przypuszczać, że LPS *Yersinia* sprzyja rozwojowi lub nasileniu miejscowej reakcji zapalnej przyczyniając się do zależnej od lektyny wiążącej mannozę aktywacji dopełniacza i/lub modulując aktywność komórek zapalnych.

Omówienie wyników publikacji:

Kasperkiewicz K., Eppa Ł., Świerzko A.S., Bartłomiejczyk M. A., Żuber Z. M., Siniewicz-Luzeńczyk K., Mężyk E., Matsushita M., Bąk-Romaniszyn L., Zeman K., Skurnik M., Cedzyński M. 2017. Lectin pathway factors in patients suffering from juvenile idiopathic arthritis. *Immunology and Cell Biology* 95, 666-675; DOI:10.1038/icb.2017.31 (załącznik 2.4).

Wprowadzenie

W wieku rozwojowym najczęstszą formą artropatii jest młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS; ang. Juvenile idiopathic arthritis, JIA). Terminem tym określa się grupę chorób występujących u ludzi przed ukończeniem szesnastego roku życia, związanych z utrzymującym się dłużej niż sześć tygodni stanem zapalnym stawów [Brunner i wsp., 2012]. Do charakterystycznych objawów MIZS można zaliczyć: gorączkę z towarzyszącą jej wysypką, powiększenie węzłów chłonnych [DeWitt i wsp., 2012]. Pomimo postępu w rozwoju metod diagnostycznych i różnych strategii leczenia, ryzyko wystąpienia powikłań u pacjentów z MIZS jest znaczące. Obok upośledzenia wzrostu obserwuje się także dysfunkcje ruchu, zaburzenia depresyjne oraz niepożądane skutki podawania leków immunosupresyjnych [Kimura i wsp. 2013, Smolewska i Żuber, 2015].

W krajach europejskich młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) dotyczy od 16 do 150 pacjentów na 100 000 dzieci i mimo intensywnych badań naukowych patogeneza tego schorzenia wciąż pozostaje nieznana [Rochette i wsp., 2015]. Uważa się, iż jest to choroba autoimmunizacyjna, w rozwoju której znaczącą rolę odgrywają zaburzenia w działaniu mechanizmów odporności wrodzonej oraz nabytej [Macaubas i wsp., 2009, Brunner i wsp., 2012]. **Szczególnie ważne wydają się być nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu dopełniacza** [Wouters i wsp., 2002]. Dane literaturowe sugerują, iż zarówno jego

nadaktywność jak i niedobory czynników aktywacji odgrywają istotną rolę w artropatii towarzyszącej między innymi reumatoidalnemu zapaleniu stawów (RZS, chorobie o zbliżonej patogenezie do MIZS) [Piccoli i wsp., 2011, Goeldner i wsp., 2014].

Niedobór lektyny wiążącej mannozę (MBL) jest uważany za powszechne zaburzenia odporności u człowieka. Związany jest on z mutacjami punktowymi zlokalizowanymi w pierwszym eksonie genu *MBL2*. Mutacje określane jako D, B i C (lub wspólnie jako O) powodują zmianę struktury białka, co prowadzi do zaburzeń oligomeryzacji cząsteczki, uniemożliwia tworzenie kompleksów z proteazami MASP oraz powoduje wzrost wrażliwości na metaloproteazy osoczowe. W konsekwencji obniża się aktywność opsonizacyjna i stężenie MBL w surowicy. Na poziom ekspresji genu *MBL2*, a co za tym idzie stężenia kodowanych białek wpływają polimorfizmy pojedynczych nukleotydów regionu promotorowego (oznaczone jako H/L i Y/X). Za genotypy związane z występowaniem niedoborów uważa się warianty O/O i LXA/O. Dowiedziono, iż u niektórych homozygot A/A stężenia aktywnej lektyny są również bardzo niskie [Mason i Tarr 2015]. Lektyna wiążąca mannozę jest białkiem osoczym, jednak może przenikać do miejsc, w których toczą się procesy zapalne. Nieliczne badania wskazują na obecność MBL, fikolin (m.in. fikoliny-3) i proteazy serynowej (MASP-2) w płynach stawowych (ang. Synovial Fluid; SF) pacjentów cierpiących na RZS i chorobę zwyrodnieniową stawów. Ponadto wykazano, że MBL może wiązać się z agalaktozylo-IgG (izofорма G0), surowiczą immunoglobuliną występującą w reumatoidalnym zapaleniu stawów [Goeldner i wsp. 2014].

Znaczenie MBL w młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów nie było dotychczas intensywnie badane. W pojedynczych doniesieniach sugeruje się, że niedobór tej lektyny może być związany z ryzykiem zachorowania w młodszym wieku lub rozwojem postaci wielostawowej.

W niektórych przypadkach młodzieńcze artropatie mogą być również związane z infekcjami bakteryjnymi. W etiologii młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów (MIZS), jednym z rozważanych czynników infekcyjnych są pałeczki *Yersinia enterocolitica*. Bakterie te są zdolne do przeżycia w komórkach błony maziowej w stawach nawet 6 tygodni w warunkach *in vitro*, po eksperymentalnej infekcji. W płynie stawowym pacjentów wykrywano obecność agregatów antygenowych zawierających lipopolisacharyd (w literaturze struktura nazywana „duchem”; ang. ghost), ale bez fragmentów komórkowych i DNA. Kompleksy te mogą przyczynić się do długotrwałych, przewlekłych procesów zapalnych

w stawach. Sugeruje się, że zakażenie dostawowe może być łącznikiem między zakażeniem jelitowym a zapaleniem błony maziowej w reaktywnym zapaleniu stawów.

Ze względu na niewielką ilość doniesień naukowych dotyczących roli MBL w patogenezie idiopatycznych chorób reumatycznych **podjęto badania, których celem była ocena aktywności drogi lektynowej dopełniacza oraz stężenia MBL w surowicach i płynach stawowych pacjentów z rozpoznaniem MIZS, z lub bez infekcji *Yersinia enterocolitica* w wywiadzie klinicznym.** Badano także polimorfizmy genów tj. *MBL2* (dla MBL), *FCN2* (dla fikoliny-2), *FCN3* (dla fikoliny-3) oraz *MASP2* (dla MASP-2) wpływające na stężenie i/lub aktywność biologiczną czynników aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej.

Badaniami objęto łącznie 144 pacjentów, w wieku 1-18 lat, z różną postacią MIZS (skąpostawową lub wielostawową). U 79 pacjentów choroba była aktywna w momencie rekrutacji do badań. W surowicy chorych nie wykryto czynnika reumatoidalnego. W surowicach 133 pacjentów sprawdzono obecność przeciwciał anti-*Yersinia* komercyjnym testem recomWell *Yersinia* IgG/IgA/IgM. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 98 zdrowych dzieci zgłaszających się do szpitala z przyczyn incydentalnych (np. opóźnione szczepienia). Materiał badawczy stanowiła krew pełna pobrana do próbek z antykoagulantem, surowice oraz próby płynu stawowego. Do oznaczania stężenia fikoliny-2 i proteazy serynowej MASP-2 w surowicy i płynie stawowym zastosowano metodę TRIFMA typu sandwich z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych [Świerko i wsp., 2014], natomiast w celu oznaczania stężenia fikoliny-3 w surowicach i płynach stawowych stosowano test funkcjonalny opisany przez Michalskiego i wsp. (2012), wykorzystując LPS *Hafnia alvei* 1200 jako ligand. Do wykrywania polimorfizmów/mutacji badanych genów stosowano metody opracowane przez Michalskiego i wsp. (2012), Szala i wsp. (2013), Metzger i wsp. (2015), Ramasawmy i wsp. (2008).

U pacjentów i przedstawicieli grupy kontrolnej oznaczano również polimorfizmy zlokalizowane w regionie promotorowym genu *MBL2* (w pozycjach -550, oznaczany jako H/L oraz -221, Y/X) i jego eksonie 1 (w pozycjach 52 (A/D), 54 (A/B) i 57 (A/C); wszystkie z nich oznaczane są także jako A/O). Analizowano również częstość występowania wybranych polimorfizmów genu *FCN2* i *FCN3* wpływających na stężenie fikoliny-2 i fikoliny-3 oraz genu *MASP2* wpływających stężenie proteazy serynowej MASP-2.

Obserwowano, iż częstość występowania genotypów związanych z niskim stężeniem MBL w surowicy była znacząco wyższa u pacjentów z potwierdzonym zakażeniem *Yersinia*

(obecność swoistych przeciwciał anty-*Yersinia* w surowicy krwi) niż w grupie kontrolnej. Osoby z MIZS o genotypie AA miały znacząco wyższe stężenie MBL i aktywność kompleksów MBL-MASP-2 niż dzieci z grupy kontrolnej o tym samym genotypie. U pacjentów, u których wykryto przeciwciała swoiste dla *Yersinia* oraz u tych z aktywną postacią choroby zaobserwowano znacząco wyższą częstość niskich stężeń MBL (<150ng/ml). Ponadto, u chorych na MIZS wykazano znacząco niższe stężenia fikoliny-2. Nie zaobserwowano natomiast różnic stężeń fikoliny-1, fikoliny-3 oraz proteazy MASP-2 między pacjentami z MIZS i grupą kontrolną.

W przypadku genu *FCN2* analizowano cztery polimorfizmy regionu promotorowego, w pozycjach: -986 (A>G); -602 (G>A), -64 (A>C) oraz -4 (A>G). Polimorfizmy te wpływają na stężenie fikoliny-2 w surowicy. Analiza statystyczna wykazała, iż allel C w pozycji -64 (związany z niskim stężeniem fikoliny-2) występował znacząco rzadziej wśród pacjentów z chorobą niezwiązaną z zakażeniem *Yersinia* i grupie chorych traktowanej jako całość niż w grupie kontrolnej. Różnicy takiej nie stwierdzono w przypadku osób z zakażeniami *Yersinia*. Nie zaobserwowano natomiast znaczących różnic częstości występowania allelu A w pozycji -602 oraz allelu G w pozycji -4.

Badając gen odpowiedzialny za kodowanie fikoliny-3, oceniano występowanie mutacji w pozycji +1637 (C>delC). W jej konsekwencji nie dochodzi do syntezy aktywnej fikoliny-3, tak więc u homozygot delC/delC występuje całkowity niedobór tego czynnika. Tego rzadkiego niedoboru nie stwierdzono u żadnego z badanych pacjentów ani przedstawicieli grupy kontrolnej.

Mutacja w pozycji +359 (A>G) genu *MASP2* przyczynia się do całkowitego niedoboru proteazy MASP-2 u homozygot, co skutkuje brakiem zdolności aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej. Podobnie jak w przypadku fikoliny-3, takiego niedoboru nie stwierdzono u żadnej z badanych osób. Częstość występowania genotypu A/G nie różniła się znacząco pomiędzy grupami. Trend w kierunku wyższej częstości zanotowano wśród pacjentów, u których potwierdzono zakażenia *Yersinia*, w porównaniu z grupą kontrolną. Nie obserwowano różnic w występowaniu badanych mutacji u pacjentów z MIZS wielostawowym lub skąpostawowym. Opisane wyniki wskazują, że **polimorfizmy eksonu 1 genu *MBL2* (zwłaszcza występowanie allelu B w kodonie 54) mogą wpływać na ryzyko rozwoju młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów, związanego z zakażeniem *Yersinia*.** Niższa częstość występowania allelu C w pozycji -64 genu *FCN2* u chorych i jednocześnie znacznie niższe stężenia fikoliny-2 mogą natomiast sugerować zaburzenia syntezy tego białka

u pacjentów (niezwiązane z badanymi polimorfizmami) lub konsumpcję aktywnego czynnika w procesach patofizjologicznych.

Badane czynniki lektynowej drogi aktywacji dopełniacza wykryto również w pobranych płynach stawowych. W badanym materiale klinicznym oceniano depozycję produktów aktywacji składnika C4, zależną od kompleksów MBL-MASP-2 (w warunkach wykluczających aktywność drogi klasycznej). **Co ciekawe, kompleksy MBL-MASP-2 wykryte w płynach stawowych były zdolne do aktywacji dopełniacza na szlaku lektynowym poprzez trawienie składnika C4.**

Zaobserwowano znaczącą korelację stężeń MBL, badanych fikolin i proteazy MASP-2 w próbach płynu stawowego i surowic, choć ich poziomy w płynach były niższe niż w odpowiadających im surowicach.

Podsumowując, obserwowano różnice stężeń fikoliny-2 u pacjentów z MIZS (niezależnie od infekcji *Yersinia* oraz liczby zaatakowanych stawów) w odniesieniu do osób z grupy kontrolnej. **Zasadnym wydaje się więc wniosek, że fikolina-2 może stanowić potencjalny biomarker młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów u dzieci.** Warto podkreślić iż, przedstawione badania są pierwszymi w literaturze, w których porównano grupę chorych i zdrowych osobników oraz oceniono stężenia fikoliny-2 w surowicy i próbkach płynu stawowego wraz z analizą polimorfizmów genu *FCN2*.

W badaniach wykazano również, iż aktywność kompleksów MBL-MASP-2 była znacząco wyższa w grupie pacjentów z MIZS (zwłaszcza z wielostawową formą choroby) w odniesieniu do grupy kontrolnej, co może świadczyć o aktywacji układu dopełniacza na drodze lektynowej u tych pacjentów. Wykazano również obecność czynników zdolnych do aktywacji tego szlaku w płynach stawowych, co może wskazywać na ich potencjalną rolę w indukcji stanu zapalnego i powstaniu artropatii.

Omówienie wyników publikacji:

Kasperkiewicz K., Świerzko A.S., Michalski M., Eppa Ł., Skurnik M., Żuber Z., Cedzyński M. 2022. Antibodies recognizing *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharides of various chemotypes in synovial fluids from patients with juvenile idiopathic arthritis. Journal of Immunology Research 1-9; DOI:10.1155/2022/9627934 (załącznik 2.5).

Wprowadzenie

Młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (MIZS) jest chorobą o podłożu autoimmunologicznym. Zazwyczaj z materiału klinicznego pobranego od pacjentów z MIZS nie izoluje się patogennych mikroorganizmów. W badaniach serologicznych stwierdza się często występowanie przeciwciał anti-*Yersinia* klasy IgM i IgG. Odmienne, w badaniach płynu stawowego wykrywa się często przeciwciała skierowane przeciwko antygenom bakteryjnym tj. LPS i/lub ECA. Często stężenie tych przeciwciał jest niższe niż w surowicy. Fotis i in. [2017] sugerowali, że podwyższone stężenie przeciwciał skierowanych przeciwko regionowi rdzeniowemu LPS *E. coli* (typu R3) u chorych na MIZS wiąże się ze zwiększoną translokacją bakterii z jelit do krwioobiegu, a co za tym idzie wyższym stężeniem LPS, który krąży w organizmie. Aoki i in. [1996] wykazali obecność przeciwciał rozpoznających LPS z podstawionym ECA (ECA_{LPS}) w surowicach i płynach stawowych dorosłych pacjentów chorujących na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Rastawicki [2007] wykazał obecność przeciwciał anti-ECA w surowicach pacjentów z podejrzeniem jersiniozy (zwłaszcza wśród leczonych z powodu reaktywnego zapalenia stawów), a także zaproponował ich przydatność w diagnostyce zakażeń bakteriami *Yersinia*.

Podjęto więc badania mające na celu detekcję i charakterystykę przeciwciał swoistych dla LPS *Yersinia* w surowicach i płynach stawowych pacjentów cierpiących na MIZS, w tym pacjentów z potwierdzonym zakażeniem *Yersinia*.

Materiał kliniczny pobrano w aktywnej fazie choroby (stan zapalny 3 lub więcej stawów) od chorych płci męskiej.

Analiza Western blot wykazała obecność przeciwciał reagujących z LPS *Yersinia enterocolitica* i wspólnym antygenem enterobakteryjnym (ECA) w analizowanych próbkach płynu stawowego. Immunoglobuliny te rozpoznawały LPS YeO3-c-6471/76 (LPS o chemotypie S), a także lipopolisacharydy chemotypu Ra (YeO3-c-R1), Rc (YeO3-c-RfbR7) i Re (YeO3-c-M205). Co ciekawe, wykryte przeciwciała w surowicy pacjentów reagowały z szybko migrującą frakcją LPS odpowiadającą fragmentom lipid-A-wewnętrzny rdzeń LPS. Obserwowany wzór przypominający drabinkę w obszarze migracji materiału wysokocząsteczkowego dla LPS YeO-c-R1 LPS, sugerował obecność w tym preparacie polimeru innego niż O-polisacharyd. Wynik ten może wskazywać na immunodetekcję w tym obszarze ECA przyłączonego do LPS (ECA_{LPS}). W badaniach jako wzorzec zastosowano ECA *S. Montevideo* SH94 i otrzymano podobny profil drabinkowy. Przeciwciała obecne

w płynie stawowym badanych pacjentów również rozpoznawały antygeny LPS i ECA, uzyskane profile były identyczne jak te obserwowane, kiedy badano surowice.

Dzięki zastosowaniu unikalnej kolekcji LPS mutantów *Yersinia* o różnych chemotypach (S, Ra, Rc, Re) w badaniach metodą immunoenzymatyczną (ELISA) płynów stawowych wykryto immunoglobuliny rozpoznające epitopy zlokalizowane w OPS, OC i/lub IC, a także regionie Kdo- lipid A lipopolisacharydu. Interesujące, iż w większości badanych płynach stawowych obserwowano wysokie miano przeciwciał swoistych dla regionu Kdo-lipid A, który jest wspólny dla wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych. Natomiast tylko w kilku badanych próbach wykryto przeciwciała rozpoznające polisacharydy O-swoiste *Yersinia*. W teście ELISA, podobnie jak w analizie Western blot, w badanych próbach płynu stawowego wykazano także obecność immunoglobulin reagujących ze wspólnym antygenem enterobakteryjnym (ECA).

W literaturze tematu opisywano wielokrotnie próby ustalenia pochodzenia LPS w płynie stawowym. Przypuszczano, że endotoksyna może być uwalniana w trakcie rozpadu komórek bakteryjnych, ale w większości badanych przypadków nie udało się wykazać obecności żywych ani też martwych komórek *Yersinia enterocolitica* [Worela i wsp., 1993]. Jednak, jak wspomniano wcześniej, w płynach często wykrywano lipopolisacharyd [Granfors i wsp., 1989]. Uważano, że może być on transportowany do stawów przez komórki zapalne. Zostało to udowodnione przez Granfors i wsp. [1989], którzy wykryli u pacjentów w płynach stawowych LPS *Yersinia* nawet kilka lat po epizodzie jersinozy. Co ciekawe, Wuorela i wsp. [1993] wykazali, że wewnątrz makrofagów LPS może ulegać przetworzeniu, a jego forma ze zredukowanym rdzeniem może być ekspozowana na powierzchni fagocytów.

Potwierdziły to również nasze badania [Kasperkiewicz i wsp., 2020]. **W warunkach *in vitro* wykazano, iż w wyniku fagocytozy bakterii *Yersinia* (inaktywowanych termicznie) o chemotypie S i Ra LPS, po pięciu dniach ekspozycji – na powierzchni makrofagów pojawiają się struktury rozpoznawane przez ludzką MBL, co sugeruje, że prawdopodobnie wewnątrz tych komórek dochodzi do reorganizacji struktury LPS.** Potwierdza to wcześniejsze obserwacje oddziaływania MBL z cukrami (heptozami) rdzenia wewnętrznego LPS *Yersinia*. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują również, że w przestrzeni okołostawowej dochodzi do związania się kompleksu MBL-MASP z LPS ekspozowanym na powierzchni fagocytów. Fakt ten może doprowadzić do aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej, a co za tym idzie – miejscowego nasilenia reakcji zapalnej.

Podsumowując: wykazano obecność przeciwciał rozpoznających LPS *Yersinia enterocolitica* O:3 we wszystkich analizowanych płynach stawowych uzyskanych od pacjentów cierpiących na MIZS z potwierdzoną infekcją *Yersinia* oraz u chorych z MIZS u których nie stwierdza się w surowicy immunoglobulin anty-*Yersinia*. Większość przeciwciał była skierowana przeciwko regionowi Kdo-lipid A LPS, przeciwciała rozpoznające OPS wykryto tylko w nielicznych próbach płynu stawowego. **Uzyskane wyniki mogą sugerować lepszą przydatność preparatów LPS mutantów szorstkich *Yersinia* LPS (pozbawionych OPS) w opracowywaniu nowych testów diagnostycznych w celu wykrycia przewlekłych infekcji.** Wniosek ten znajduje potwierdzenie w przeprowadzonych eksperymentach, gdzie wykazano reorganizację LPS przez fagocyty i ekspozycję regionu rdzenia wewnętrznego na ich powierzchni. Wydaje się, że **obecność ECA związanego z LPS u *Yersinia enterocolitica* O:3 wiąże się z silniejszą antygenowością endotoksyny.**

Podsumowanie wyników badań

- Lipopolisacharyd *Yersinia enterocolitica* O:3 chemotypu Ra, Rc i Re może być akceptorem enterobakteryjnego antygeny wspólnego (ECA).
- Lektyna wiążąca mannozę (MBL) rozpoznaje heptozy w oligosacharydzie rdzenia wewnętrznego LPS *Yersinia enterocolitica* O:3
- Oligosacharyd rdzenia zewnętrznego LPS YeO3 hamuje wiązanie MBL, ale LPS o chemotypie S/Ra (a więc zawierający zarówno oligosacharyd rdzenia zewnętrznego jak i wielocukier O-swoisty), po przetworzeniu przez makrofagi, może być rozpoznawany przez MBL.
- LPS *Yersinia* (zwłaszcza LPS o chemotypie Rd₁) może przyczyniać się do rozwoju zapalenia stawów u myszy, ale fakt ten nie jest związany z działaniem adiuwantowym LPS.
- Allel B (kodon 54 eksonu 1 genu *MBL2*) częściej występuje u chorych na MIZS powiązanych z zakażeniem *Yersinia*. Obecność tego wariantu w tym kodonie prowadzi do znaczącego obniżenia stężenia MBL w surowicy.

- Surowicze stężenie fikoliny-2 było znacząco niższe u osób chorych na młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów (niezależnie od występowania zakażeń *Yersinia*) niż u osób z grupy kontrolnej.
- W próbach płynów stawowych u chorych na MIZS obecne były czynniki aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej tj: MBL, fikolina-1, fikolina-2, fikolina-3 oraz MASP-2. Kompleksy MBL-MASP-2 w płynie stawowym tych chorych aktywowały układ dopełniacza.
- W płynach stawowych uzyskanych od pacjentów cierpiących na MIZS obecne były przeciwciała rozpoznające LPS *Yersinia enterocolitica* O:3 oraz antygen ECA.

Badania opisane w publikacjach: Kasperkiewicz i wsp., 2015; Kasperkiewicz i wsp., 2017; Kasperkiewicz i wsp., 2020; Kasperkiewicz i wsp., 2022 (wchodzących w skład osiągnięcia naukowego) stanowiły zadania badawcze grantu OPUS 1 2011/01/B/NZ6/00264 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Badania znaczenia **lektyny wiążącej mannan*** w młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów związanym z zakażeniami *Yersinia*”, którym kierowałam w latach 2011-2015 (**załącznik 2**).

**Wyjaśnienie: W okresie składania wniosku grantowego oraz jego realizacji w literaturze tematu obowiązywała nazwa: „lektyna wiążąca mannan”, obecnie obowiązującą jest: „lektyna wiążąca mannozę”, dlatego taką nazwę stosowano w publikacjach oraz autoreferacie.*

Piśmiennictwo

1. **Adeolu M.**, Alnajar S., Naushad S., Gupta R.S. **2016**. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 66, 5575-5599.
2. **Al-Hendy A.**, Toivanen P., Skurnik M. **1991**. The effect of growth temperature on the biosynthesis of *Yersinia enterocolitica* O:3 lipopolysaccharide: temperature regulates the transcription of the rfb but not of the rfa region. Microb. Pathog. 10, 81-86.
3. **Aoki S.**, Yoshikawa K., Yokoyama T. et al. **1996**. Role of enteric bacteria in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: evidence for antibodies to enterobacterial common antigens in rheumatoid sera and synovial fluids. Ann Rheum Dis. 55 (6), 363-369.
4. **Aussel L.**, Therisod H., Karibian D., Perry M. B., Bruneteau M., Caroff M., **2000**, Novel variation of lipid A structures in strains of different *Yersinia* species. FEBS Letters. 465, 87-92.

5. **Ballegaard V.**, Haugaard A.K., Garred P., Nielsen S.D., Munthe-Fog L. **2014**. The lectin pathway of complement: advantage or disadvantage in HIV pathogenesis? *Clin Immunol.* 154 (1), 13-25.
6. **Banda N. K.**, Kraus D., Vondracek A. **2002**. Mechanisms of effects of complement inhibition in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 46 (11), 3065-3075.
7. **Banda N. K.**, Acharya S., Scheinman R. I. **2017**. Deconstructing the lectin pathway in the pathogenesis of experimental inflammatory arthritis: essential role of the lectin ficolin B and mannose-binding protein-associated serine protease 2. *J. Immunol.* 199 (5), 1835-1845.
8. **Banda N. K.**, Takahashi M., Levitt B. **2010**. Essential role of complement mannose-binding lectin-associated serine proteases-1/3 in the murine collagen antibody-induced model of inflammatory arthritis. *J. Immunol.* 185 (9), 5598-5606.
9. **Banda N. K.**, Takahashi M., Takahashi K. **2011**. Mechanisms of mannose-binding lectin-associated serine proteases-1/3 activation of the alternative pathway of complement. *Mol Immunol.* 49 (1-2) 281–289.
10. **Barua S.**, Yamashino T., Hasegawa T., Yokoyama K., Torii K., Ohta M. **2002**. Involvement of surface polysaccharides in the organic acid resistance of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 43, 629-640.
11. **Bercovier H.**, Mollaret H. H., **1984**, genus XIV. *Yersinia*; in *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg N. R. and Holt J. G. eds) pp. 498-506. Williams and Wilkins, Baltimore, London.
12. **Biedzka-Sarek M.**, Vento R., Skurnik M. **2005**. Role of yad A, ail, and lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect. Immun.* 73, 2232-2244.
13. **Biedzka-Sarek M.**, Metso J., Kateifides A., Meri T., Jokiranta T. S., Muszyński A., Radziejewska-Lebrecht J., Zannis V., Skurnik M., Jauhiainen M. **2011**. Apolipoprotein A-I Exerts Bactericidal Activity against *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *J. Biol. Chem.* 286, 38211-38219.
14. **Billiau A. and Matthys P.** **2011**. Collagen-induced arthritis and related animal models: how much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory?. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22 (5-6), 339-344.
15. **Bobel D.**, Sadkowska-Todys M. **2008**. Jersinioza w Polsce w 2006 roku. *Prz Epidemiol.* 62, 287-293.
16. **Bottone E. J.** **1999**. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microb. Infect.* 1, 323-333.
17. **Brade H.**, Galanos C., Lüderitz O. **1983**. Differential determination of the 3-deoxy-D-mannooctulosonic acid residues in lipopolysaccharides of *Salmonella minnesota* rough mutants. *Eur. J. Biochem.* 131, 195-200.
18. **Brunner J.**, Prelog M., Riedl M., Giner T., Hofer J., Würzner R., Zimmerhackl L. **2012**. Analysis of the classical, alternative, and mannose binding lectin pathway of the complement system in the pathogenesis of oligoarticular juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Int.* 32 (6), 1815-1818.
19. **Brzostek K.** Mechanizmy regulacji czynników wirulencji *Yersinia enterocolitica*. *Post Mikrobiol.* **2004**; 43(1), 8-10.
20. **Carniel E.**, Autenrieth I., Cornelis G., Fukushima H., Guinet F., Isberg R., Pham J., Prentice M., Simonet M., Skurnik M., Wauters G. **2006**. *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. *Prokaryotes.* 6, 270-398.

21. **Cedzyński M.**, Thielens N. M, Mollnes T. Eirik., Vorup-Jensen T. **2019**. Editorial: The Role of Complement in Health and Disease. *Front Immunol.* 7(10), 1869.
22. **Chiller J. M.**, Skidmore B. J., Morrison D. C., Weigle W. O. **1973**. Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharides to its function in mitogenesis and adjuvanticity. *Proc Natl Acad of Sci USA* 70 (7), 2129-2133.
23. **Cross A. S.**, Karremna H. J., Zhang L., Rosenberg Z., Opal S. M., Lees A. **2014**. Immunization of cows with novel core glycolipid vaccine induces anti-endotoxin antibodies in bovine colostrum. *Vaccine*, 6107-6114.
24. **Danese P. N.**, Oliver G. R., Barr K., Rick G. D., Silhavy T. J., **1998**, Accumulation of the enterobacterial common antigen lipid II. Biosynthetic intermediate stimulates *degP* transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 5875-5884.
25. **Dempsey P. W.**, Allison M. E. D., Akkaraju S., Goodnow C. C., Fearon D. T. **1996**. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science.* 271 (5247), 348–350.
26. **Delor I.**, Cornelis G. R. **1992**. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. *Infect. Immun.* 60, 4269-4277.
27. **DeWitt E.M.**, Kimura Y., Beukelman T., Nigrovic P.A., Onel K., Prahalad S. **2012** Consensus treatment plans for new-onset systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Care Res.* 64(7), 1001 - 1010.
28. **Di Genaro M. S.**, Munoz E., Aguilera C., de Guzman A. M. **2000**. *Yersinia enterocolitica* O:8 and O:5 lipopolysaccharide arthritogenicity in hamsters. *Rheumatology.* 39 (1), 73-78.
29. **Ehrnthaller C.**, Ignatius A., Gebhard F., Huber-Lang M. **2011**. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med.* 17 (3-4), 317-329.
30. **Endo Y.**, Matsushita M., Fujita T. **2015**. New Insights into the Role of Ficolins in the Lectin Pathway of Innate Immunity. *Int Rev Cell Mol Biol* 316, 49-110.
31. **Fotis L.**, Shaikh N., Baszis K. W. **2017**. Serologic evidence of gut-driven systemic inflammation in juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.* 44 (11), 1624-1631.
32. **Fredriksson-Ahomaa M.**, Hallanvuol S., Korte T., Siitonen A., Korkeala H. **2001**. Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strains from human and porcine sources. *H Epidemiol Infect.* 127, 37-47.
33. **Fujita T.** **2002**. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2 (5), 346-353.
34. **Galanos C.**, Lüderitz O., Westphal O. **1969**. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 9, 245-249.
35. **Gilbreath J. J.**, Dodds J. C., Rick P. D., Soloski M. J., Merrell D. S., Metcalf E. S. **2012**. Enterobacterial Common Antigen Mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium establish a persistent infection and provide protection against subsequent lethal challenges. *Infect. Immun.* 80, 441-450.
36. **Goeldner I.**, Skare T., Boldt A.B.W., Nass F.R., Messias-Reason I.J., Utiyama S.R. **2014**. Association of MASP-2 levels and MASP2 gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in patients and their relatives. *PLoS ONE* 9 (3), s: e90979.

37. **Goeldner I.**, Skare T.L., Utiyama S.R., Nisihara R.M., Van Tong H., Messias-Reason I.J. T., Velavan T.P. **2014**. Mannose binding lectin and susceptibility to rheumatoid arthritis in Brazilian patients and their relatives. PLoS ONE 9 (4), s: e95519.
38. **Goździewicz, T. K.**, Lugowski C., Lukaszewicz J. **2014**. First evidence for a linkage between Enterobacterial Common Antigen and lipopolysaccharide in *Shigella sonnei* phase II ECA_{LPS}. J. Biol. Chem. 289, 2745-2754.
39. **Granfors K.**, Merilahti-Palo R., Luukkainen R. **1998**. Persistence of *Yersinia* antigens in peripheral blood cells from patients with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection with or without reactive arthritis. Arthritis Rheum. 41 (5), 855-862.
40. **Granfors K.**, Jalkanen S., von Essen R. **1989**. *Yersinia* antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis. N Engl J Med, 320 (4), 216-221.
41. **Gronow S.**, Brabetz W., Brade H. **2000**. Comparative functional characterization in vitro of heptosyltransferase I (WaaC) and II (WaaF) from *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 267, 6602-6611.
42. **Hietala M. A.**, Jonsson I. M., Tarkowski A., Kleinau, M. Pekna M. **2002**. Complement deficiency ameliorates collagen induced arthritis in mice. J. Immunol. 169 (1), 454-459.
43. **Hoffmann J.**, Lindberg B., Brubaker R. R. **1980**. Structural studies of the O-specific side chains of the lipopolysaccharide from *Yersinia* Ye 128. Carbohydr. Res. 78, 212-214.
44. **Jagielski M.**, Raclawicki W., Kałużewski S. **2000**. Jersinioza – niedoceniana choroba zakaźna. Prz Epidemiol. 56, 57-64.
45. **Janowska M.**, Jędrzejewska B., Janowska J. **2012**. Jersinioza – nowe wyzwanie współczesnej medycyny; Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu. 18, (3), 257-260.
46. **Jorgenson M. A.**, Kannan S., Laubacher M. E., Young K. D. **2016**. Dead-end intermediates in the enterobacterial common antigen pathway induce morphological defects in *Escherichia coli* by competing for undecaprenyl phosphate. Mol. Microbiol. 100, 1-14.
47. **Kasperkiewicz K.** **2002**. Właściwości ECA immunogenne mutantów szorstkich *Yersinia enterocolitica*. Praca doktorska. Uniwersytet Śląski, Katowice, Polska.
48. **Kasperkiewicz K.**, Swierzko A. St., Bartłomiejczyk M. A., Cedzynski M., Noszczyńska M., Duda K. A., Michalski M., Skurnik M. **2015**. Interaction of human mannose-binding lectin (MBL) with *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide. Int. J. Meds. Microbiol. 305, 544-552.
49. **Kawaoka Y.**, Otsuki K., Tsubokura M. **1983**. Serological evidence that *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide produced during growth in vivo resembles that produced during growth in vitro at 25 degrees C. J. Gen. Microbiol. 129, 2749-2751.
50. **Kido N.**, Ohta M., Ito H. **1985**. Potent adjuvant action of lipopolysaccharides possessing the O-specific polysaccharide moieties consisting of mannans in antibody response against protein antigen. Cell Immunol. 91 (1) 52-59.
51. **Kimura Y.**, Weiss J.E., Haroldson K.L., Lee T., Punaro M., Oliveira S. **2013**. Pulmonary Hypertension and Other Potentially Fatal Pulmonary Complications in Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. Arthritis Care Res 65 (5), 745-752.
52. **Kuhn H-M.**, Meier-Dieter U., Meyer H. **1988**. ECA- the enterobacterial common antigen. Microbiol. Rev. 54, 195-222.

53. **Leirisalo-Repo M.**, Suoranta H. 1988. Ten-year follow up study of patients with *Yersinia* arthritis. *Arthritis Rheum.* 31(4), 533-7.
54. **McArthur F.**, Andersson C. E., Loutet S., Mowbray S. L., Miguel A. Valvano M. A. **2005**. Functional analysis of the glycerol-manno-heptose 7-phosphate kinase domain from the bifunctional HldE protein, which is involved in ADP-L-glycerol-D-manno-heptose biosynthesis. *J. Bacteriol.* 187, 5292-5300.
55. **Macaubas C.**, Nguyen K., Milojevic D., Park J.L., Mellins E.D. **2009**. Oligoarticular and polyarticular JIA: epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* 5 (11), 616-626.
56. Man-Kupisinska A. Anna S Swierzko A.S., Maciejewska A., Hoc M., Rozalski A., Siwinska M. Lugowski C., Cedzynski M., Lukaszewicz J. **2018**. Interaction of mannose-binding lectin with lipopolysaccharide outer core region and its biological consequences. *Front Immunol.* 29, 9:1498.
57. **Mason C.P., Tarr A.W.** **2015**. Human lectins and their roles in viral infections. *Molecules* 20 (2), 2229–2271.
58. **Mäkelä P. H., Mayer H.** **1976**. Enterobacterial common antigen *Bacteriol. Rev.* 40, 591-632.
59. **Männel D., Mayer H.** **1978**. Isolation and chemical characterization of the enterobacterial common antigen. *Eur. J. Biochem.* 86, 361-370.
60. **Matsushita M.**, Endo Y., Fujita T. **2013**. Structural and functional overview of the lectin complement pathway: its molecular basis and physiological implication. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 61 (4), 273-283.
61. **Melis J. P. M.**, Strumane K., Ruuls S. R., Beurskens F. J., Schuurman J., Parren P. W. H. I. **2015**. Complement in therapy and disease: Regulating the complement system with antibody-based therapeutics. *Molecular Immunology.* 67(2A), 117-130.
62. **Metzger M.L.**, Michelfelder I., Goldacker S., Melkaoui K., Litzman J., Guzman D. **2015**. Low ficolin-2 levels in common variable immunodeficiency patients with bronchiectasis. *Clin Exp Immunol.* 179 (2), 256-264.
63. **Michalski M.**, Szala A., Świerzek A., Lukaszewicz J., Maciejewska A., Kilpatrick D.C. **2012**. H-ficolin (ficolin-3) concentrations and FCN3 gene polymorphism in neonates. *Immunobiology.* 217 (7), 730-737.
64. **Morka K.**, Cieniuch G., Bugla-Płoskońska G. **2018**. Epidemiologia *Yersinia enterocolitica* ze szczególnym uwzględnieniem rezerwuaru zwierzęcego. *Postepy Hig Med Dosw (online).* 72: 594-605.
65. **Muszyński A.**, Rabsztyń K., Knapska K., Duda K. A., Duda-Grychtoł K. T., Kasperkiewicz K., Radziejewska-Lebrecht J., Holst O., Skurnik M. **2013**. Enterobacterial common antigen and O-specific polysaccharide coexist in the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Microbiology.* 159, 1782-1793.
66. **Noszczyńska M.**, Kasperkiewicz K., Duda K. A., Podhorodecka J., Rabsztyń K., Gwizdała K., Świerzek A. St., Radziejewska-Lebrecht J., Holst O., Skurnik M. **2015**. Serological characterization of the enterobacterial common antigen substitution of the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Microbiology.* 161, 219-227.
67. **Paeng N.**, Morikawa A., Kato Y. **1999**. Experimental murine model for autoimmune enterocolitis using *Klebsiella pneumoniae* O3 lipopolysaccharide as a potent immunological adjuvant. *Microbiol Immunol.* 43 (1), 45-52.

68. **Pepe J. C., Miller V. L. 1993.** *Yersinia enterocolitica* invasins: A primary role in the initiation of infection. PNAS. 90, 6473-6477.
69. **Piaścik M., Pawlik M., Rydzewska G. 2006.** Infekcyjne zapalenia jelit a choroba Leśniowskiego-Crohna – problemy diagnostyczne i terapeutyczne. Prz Gastroenterol. 1(2), 88-91.
70. **Piccoli A.K., Alegretti A.P., Schneider L., Lora P.S., Xavier R.M. 2011.** Expression of complement regulatory proteins CD55, CD59, CD35, and CD46 in rheumatoid arthritis. Rev Bras Reumatol. 51 (5), 503-510.
71. **Pinta E., Li Z., Batzilla J., Pajunen M., Kasanen T., Rabsztyń K., Rakin A., Skurnik M. 2012.** Identification of three oligo-/polysaccharide-specific ligases in *Yersinia enterocolitica*. Mol. Microbiol. 83, 125-136.
72. **Pinta E., Duda K. A., Hanuszkiewicz A., Kaczyński Z., Lindner B., Miller W. L., Hyytiäinen H., Vogel C., Borowski S., Kasperkiewicz K., Lam J. S., Radziejewska-Lebrecht J., Skurnik M., Holst O. 2009.** Identification and Role of a 6-Deoxy-4-Keto-Hexosamine in the Lipopolysaccharide Outer Core of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. Chemistry. 15, 9747- 9754.
73. **Rabsztyń K., Kasperkiewicz K., Duda K. A., Li C., Łukasik M., Radziejewska-Lebrecht J., Skurnik M. 2011.** Characterization of Anti-ECA Antibodies in Rabbit Antiserum Against Rough *Yersinia enterocolitica* O:3. Biochemistry (Moscow). 76, 1016-1025.
74. **Radziejewska-Lebrecht J., Kasperkiewicz K., Skurnik M., Brade L., Steinmetz I., Świerzko A. S., Muszyński A. 2003.** ECA-antibodies in antisera against R mutants of *Yersinia enterocolitica* O:3. Adv. Exp. Meds. Biol. 529, 15-18.
75. **Radziejewska-Lebrecht J., Shashkov A. S., Stroobant V., Wartenberg K., Warth Ch., Mayer H. 1994.** The inner core of *Yersinia enterocolitica* Ye75R (O:3) lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 227, 343-351.
76. **Radziejewska-Lebrecht J., Skurnik M., Shashkov A. S., Brade L., Różalski A., Bartodziejska B, Mayer H. 1998.** Immunochemical studies on R mutants of *Yersinia enterocolitica* O:3. ABP. 45, 1011-1019.
77. **Raetz C. R., Whitfield C. 2002.** Lipopolysaccharide endotoxins. Annu. Rev. Biochem. 71, 635-70.
78. **Ramasawmy R., Spina G.S., Fae K.C., Pereira A.C., Nisihara R., Messias R.I.J. 2008.** Association of mannose-binding lectin gene polymorphism but not of mannose-binding serine protease 2 with chronic severe aortic regurgitation of rheumatic etiology. Clin Vaccine Immunol. 15 (6), 932-936.
79. **Rastawicki W. 2007.** Humoral response to selected antigens of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in the course of yersiniosis in humans. I. Occurrence of antibodies to enterobacterial common antigen (ECA). Med Dosw Mikrobiol. 59 (2), 93 -102.
80. **Reinés M., Llobet E., Dahlström K. M., Pérez-Gutiérrez C., Llompарт C. M., Torrecabota N., Salminen T. A., Bengoechea J. A. 2012.** Deciphering the Acylation Pattern of *Yersinia enterocolitica* Lipid A. PLOS Pathog. 8, e1002978.
81. **Revell P. A., Miller V. L. 2001.** *Yersinia* virulence: more than a plasmid. FEMS Microbiol Lett. 205(2), 159-64.
82. **Rochette E., Duché P., Merlin E. 2015.** Juvenile idiopathic arthritis and physical activity: Possible inflammatory and immune modulation and tracks for interventions in young populations. Autoimmunity Reviews. 14 (8), 726-734.
83. **Schubert S., Rakin A., Heesemann J. 2004.** The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. Int. J. Meds. Microbiol. 294, 83-94.

84. **Seltmann G., Holst O. 2002.** Lipopolysaccharides. In: The bacterial cell wall, pp. 31-66. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
85. **Skurnik M., Bengoechea J. A. 2003.** The biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersiniae*. Carbohydr. Res. 338, 2521-2529.
86. **Skurnik M., Toivanen P. 1993.** *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide: genetics and virulence. Trends Microbiol. 1, 148-152.
87. **Skurnik M., Venho R., Bengoechea J. A., Moriyón I. 1999.** The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. Mol. Microbiol. 31, 1443-1462.
88. **Skurnik M., Venho R., Toivanen P., Al-Hendy A. 1995.** A novel locus of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 involved in lipopolysaccharide outer core biosynthesis. Mol. Microbiol. 17, 575-594.
89. **Smolewska E., Żuber Z. 2016.** Aktualne cele, możliwości i perspektywy leczenia młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów w Polsce i na świecie. Forum Reumatologiczne, 2 (1), 2450-3088.
90. **Szala A., Sawicki S., Świerzek A., Szemraj J., Śniadecki M., Michalski M., Kaluzynski A., Lukaszewicz J., Maciejewska A., Wydra D., Kilpatrick D.C., Matsushita M., Cedzyński M. 2013.** Ficolin-2 and ficolin-3 in women with malignant and benign ovarian tumours. Cancer Immunol. Immunother. 62 (8), 1411-1419.
91. **Świerzek A., Szala A., Sawicki S., Szemraj J., Śniadecki M., Sokołowska A., Kaluzynski A., Wydra D., Cedzyński M. 2014.** Mannose-Binding Lectin (MBL) and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2) in women with malignant and benign ovarian tumours. Cancer Immunol. Immunother. 63 (11), 1129-1140.
92. **Takahashi K., Kato Y., Sugiyama T. 1999.** Production of murine collagen-induced arthritis using *Klebsiella pneumoniae* O3 lipopolysaccharide as a potent immunological adjuvant. Microbiol Immunol. 43, (8), 795-801.
93. **Terato K., Harper D. S., Griffiths M. M. 2009.** Collagen-induced arthritis in mice: synergistic effect of *E. coli* lipopolysaccharide bypasses epitope specificity in the induction of arthritis with monoclonal antibodies to type II collagen. Autoimmunity. 22, (3), 137-147.
94. **Therisod H., Kariban D., Perry M. B., Caroff M. 2002.** Structural analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 29833 lipid A. Int. J. Mass Spectrom. 219, 549-557.
95. **Thiel S. 2007.** Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. Mol Immunol. 44 (16), 3875-3888.
96. **Wartenberg K., Knapp W., Ahamed N. M., Widemann C., Mayer H. 1983.** Temperature dependent changes in the sugar and fatty acid composition of lipopolysaccharides from *Yersinia enterocolitica* strains. Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. 253, 523-530.
97. **Westphal O., Jann K. 1965.** Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol-water and further application of procedure. Met. Carbohydr. Chem. 5, 83-91.
98. **Wouters C.H., Ceuppens J.L., Stevens E.A. 2002.** Different circulating lymphocyte profiles in patients with different subtypes of juvenile idiopathic arthritis. Clin Exp Rheumatol 20 (2), 239-248.
99. **Wuorela M., Jalkanen S., Toivanen P., Granfors K. 1993.** *Yersinia* lipopolysaccharide is modified by human monocytes. Infect Immun. 61 (12), 5261-5270.

100. **Yokochi T.**, Fukada M., Kawai M., Zhang Y. H., Jiang G. Z., Takahashi K. **1992**. Novel adjuvant action of lipopolysaccharides that possess mannose homopolysaccharides as O-specific polysaccharides on immune responses to nonimmunogenic autoantigens in mice. *Infect Immun.* 60 (11), 4953-4956.
101. **Zhang D.**, Huang X., Wang D., Li Y., Yao Y. **2013**. Genetic variants of complement genes ficolin-2, mannose-binding lectin and complement factor H are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Hum Genet.* 132 (6), 629-640.

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych stanowiących znaczny wkład w rozwój dyscypliny

Charakterystyka antygenów powierzchniowych (LPS, ECA) pałeczek *Yersinia enterocolitica* O:3

Po ukończeniu studiów magisterskich na Wydziale Analityki Medycznej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach otrzymałam zaproszenie do uczestnictwa w międzynarodowych badaniach dotyczących wirulencji pałeczek *Yersinia enterocolitica* O:3 (YeO3) pod kierownictwem profesora Mikaela Skurnika z Uniwersytetu w Helsinkach (**załącznik 3**). Dlatego też w mojej pracy doktorskiej, której promotorem była Pani profesor Joanna Radziejewska-Lebrecht podjęłam temat ECA-immunogenności pałeczek *Yersinia enterocolitica* O:3. W roku 1998 ukazała się publikacja naukowa autorstwa profesor Radziejewskiej – Lebrecht i wsp., w której wykazano, iż szorstki mutant *Yersinia enterocolitica* O:3 - Ye75R z niepełnym regionem rdzeniowym LPS chemotypu Rc (czyli posiadający tylko rdzeń wewnętrzny), generuje powstanie przeciwciał anti-ECA u królików immunizowanych zabitymi komórkami *Yersinia*. Autorzy sugerowali, iż w przypadku tego mutantu, odmiennie niż u mutantów *E. coli* niepełny region rdzeniowy jest akceptorem ECA. Stąd postawiono hipotezę, której weryfikacja stanowiła cel moich badań w pracy doktorskiej, że inne mutanty R *Yersinia enterocolitica* O:3 mogą być również ECA-immunogenne.

Przeprowadzone badania potwierdziły, iż mutanty R z pełnym rdzeniem, bądź defektywnym lub pozbawione rdzenia zewnętrznego w ich lipopolisachrydach stymulowały zwierzęta doświadczalne do wytworzenia przeciwciał anti-ECA. Implikacja, że ECA jest przyłączony do rdzenia wewnętrznego LPS badanych mutantów R *Yersinia* wynikał również z faktu uzyskania metodami izolacji chemicznej lipopolisacharydów pozbawionych ECA_{PG}, a jednocześnie zawierających ECA. Wyniki uzyskane podczas realizacji badań do pracy doktorskiej zostały opublikowane jako artykuł naukowy pt.: „*ECA-antibodies in antisera*

against R mutants of *Yersinia enterocolitica* O:3". 2003; *Advances in Experimental Medicine and Biology - Book series 529*, 215-218 (**załącznik 4.1**) oraz prezentowane były na licznych konferencjach naukowych (krajowych i międzynarodowych).

Wspólnie z naukowcami z Finlandii oraz Niemiec brałam również udział w badaniach strukturalnych rdzenia zewnętrznego *Yersinia enterocolitica* O:3. Po raz pierwszy określenie struktury rdzenia LPS *Y. enterocolitica* O:3, było możliwe dzięki analizom chemicznym LPS mutantów szorstkich (R). W roku 2005 rozpoczęliśmy badania strukturalne LPS mutantu chemotypu Ra YeO3-c-R1. Badania wykazały, że cukrem na końcu redukującym (proksymalnym) rdzenia zewnętrznego była 2-acetamido-2,6-dideoksy-D-ksylo-hekso-4-ulopiranoza (Sugp). **Wynik ten stanowił ważne odkrycie, ponieważ po raz pierwszy zidentyfikowano go u *Yersinia* jako jeden z komponentów budujących lipopolisacharyd.** Powyższe wyniki zostały opublikowane jako artykuł naukowy, którego jestem współautorem pt: „*Identification and Role of a 6-Deoxy-4-Keto-Hexosamine in the Lipopolysaccharide Outer Core of Yersinia enterocolitica Serotype O:3*”; 2009; *Chemistry-A European Journal* 15(38), 9747-9754 (**załącznik 4.2**).

Prowadzone przez nas badania dotyczyły również wpływu temperatury hodowli *Yersinia* na ekspresję czynników wirulencji, w tym LPS. Wykazaliśmy, że ekspresja regionu zewnętrznego LPS, jest zależna od temperatury hodowli *Yersinia* i była obniżona w 37°C. Badania immunologiczne i genetyczne przeprowadzone na mutantach S (posiadających skrócony rdzeń zewnętrzny i pełny OPS) oraz R YeO3 defektywnych w biosyntezie rdzenia zewnętrznego wykazały, że biosynteza ECA zachodziła efektywniej w 22°C. W ramach tego projektu prowadziłam również badania zmierzających do pełnej charakterystyki przeciwciał anti-ECA, które pojawiały się w surowicach zwierząt (królików) immunizowanych różnymi mutantami *Yersinia*. Dodatkowo, wykazaliśmy metodą immunoblotingu, z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych specyficznych dla O-PS *Yersinia* (TomA6) i ECA (Mab 989), koegzystencję tych dwóch antygenów w cząsteczkach LPS *Yersinia enterocolitica* O:3. Molekuły posiadały przyłączony O-PS i/lub ECA do rdzenia wewnętrznego LPS. Wyniki uzyskane podczas realizacji badań zostały opublikowane jako artykuły naukowe pt: „*Characterization of anti-ECA antibodies in rabbit antiserum against rough Yersinia enterocolitica O:3*”; 2011; *Biochemistry (Moscow)* 76(7):832-9 (**załącznik 4.3**) oraz „*Enterobacterial common antigen and O-specific polysaccharide coexist in the lipopolysaccharide of Yersinia enterocolitica serotype O:3*”; 2013; *Microbiology*. 159(8):1782-93 (**załącznik 4.4**). **Były to pierwsze tego typu doniesienia w literaturze tematu. Badania te potwierdziły także ECA-immunogenność różnych mutantów R**

***Yersinia enterocolitica* O:3, znacznie poszerzając wiedzę na temat oddziaływania tego patogenu z układem odpornościowym ssaków.**

Oddziaływanie gospodarz-patogen: bakteryjne pęcherzyki błony zewnętrznej jako tarcza dla układu dopełniacza

Ze względu na unikalne cechy morfologiczne i fizjologiczne pałeczek *Yersinia enterocolitica* w kręgu moich zainteresowań naukowych nadal pozostaje oddziaływanie tych patogenów z układem odpornościowym ludzi i zwierząt. Wyniki badań dotyczące roli biologicznej lipopolisacharydu *Yersinia enterocolitica* O:3 zainspirowały mnie do dalszych poszukiwań mechanizmów oddziaływania LPS *Yersinia enterocolitica* O:3 z organizmem gospodarza. Dowiedziono, iż, lipopolisacharyd jest elementem tzw. **pęcherzyków błony zewnętrznej (outer membrane vesicles, OMV)** produkowanych przez większość mikroorganizmów patogennych. Struktury te mogą wpływać na odpowiedź organizmu na zakażenie, nawet gdy wywołujące je drobnoustroje zostały wyeliminowane. Wyjątkowa heterogenność struktury cząsteczek LPS *Y. enterocolitica* O:3 oraz ich nierównomierne rozłożenie na powierzchni komórki może ułatwiać uwalnianie OMV o odmiennej budowie błony niż ta występująca w komórce bakteryjnej. Pęcherzyki błony zewnętrznej mogą wchodzić w interakcje z elementami pierwszej linii obrony gospodarza, np. składnikami dopełniacza. Zależna od LPS eksponowanego na powierzchni OMV aktywacja dopełniacza może przyczyniać się do rozwoju ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (SIRS) jak również do obniżenia aktywności bakteriobójczej surowicy, ułatwiając w ten sposób szerzenie się zakażenia. Dlatego też wspólnie z naukowcami z Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi oraz Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu realizujemy projekt naukowy, którego głównym celem jest ocena interakcji LPS obecnego w OMV z układem dopełniacza i wpływ tych oddziaływań na systemową odpowiedź zapalną. Nasze badania obejmują m.in. analizę wpływu temperatury wzrostu bakterii na proces uwalniania pęcherzyków (ich ilość i rozmiary, skład ilościowy i jakościowy) przez komórki szczepu dzikiego *Y. enterocolitica* O:3. Oceniamy także wpływ zmian strukturalnych powierzchni OMV na ich aktywność biologiczną (aktywację dopełniacza, wpływ na aktywność bójczą surowicy, wiązanie bakteriofagów) oraz znaczenie aktywacji dopełniacza przez OMV *Y. enterocolitica* O:3 w rozwoju SIRS (porównanie toksyczności letalnej dla myszy z wyłączoną syntezą składnika C3 dopełniacza i myszy typu dzikiego). Jednocześnie prowadzimy badania wpływu: chemotypu LPS na kinetykę dystrybucji OMV *in vivo* i zaburzeń syntezy poszczególnych regionów LPS i/lub innych

czynników wirulencji na proces uwalniania pęcherzyków błonowych i aktywacji przez nie układu dopełniacza. Należy podkreślić, że wiedza na temat OMV jako formy aktywującej dopełniacz jest bardzo ograniczona, dlatego prowadzone przez nas badania mają charakter nowatorski. Wyjaśnienie podstaw molekularnych oddziaływań OMV z elementami złożonego mechanizmu odpowiedzi odpornościowej na różnych etapach zakażenia oraz ich biologicznych konsekwencji może w perspektywie być kluczowe dla opracowania nowych strategii diagnostyki i leczenia SIRS, a także wykorzystania OMV jako szczepionek nowej generacji. Zastosowanie wyjątkowego modelu jakim jest *Y. enterocolitica* O:3 (i unikalnej kolekcji mutantów) umożliwi wyjaśnienie roli poszczególnych regionów LPS w toksyczności OMV. Badania są w trakcie realizacji. Projekt pt. „Oddziaływanie gospodarz-patogen: bakteryjne pęcherzyki błony zewnętrznej jako tarcza dla układu dopełniacza” otrzymał finansowanie Narodowego Centrum Nauki w konkursie OPUS 16 (2018/31/B/NZ6/03514). **Pełnię rolę kierownika projektu ze strony Uniwersytetu Śląskiego (konsorcjant) (załącznik 6).**

Badania aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej u chorych na nowotwory hematologiczne.

W swojej pracy badawczej brałam także udział w realizacji projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki OPUS 6 (2013/11/B/NZ6/01739), pt: "Badanie znaczenia czynników specyficznych dla aktywacji dopełniacza na drodze lektynowej u osób chorych na nowotwory hematologiczne poddawanych autologicznym przeszczepom macierzystych komórek krwiotwórczych" pod kierunkiem profesora Macieja Cedzyńskiego. Do moich zadań w tym projekcie należała logistyka materiału klinicznego (szczepy bakteryjne wyizolowane od chorych) oraz badania aktywności bójczej normalnej surowicy ludzkiej wobec mikroorganizmów izolowanych od pacjentów. Wyniki badań zostały opublikowane jako artykuł naukowy pt: „*The role of complement activating collectins and associated serine proteases in patients with hematological malignancies, receiving high-dose chemotherapy, and autologous hematopoietic stem cell transplantations (Auto-HSCT). 2018; Frontiers in Immunology 9, 2153: 1-15.* Potwierdzenie mojego udziału wraz z zadaniami badawczymi, które realizowałam w tym projekcie znajduje się w **załączniku 5.**

Charakterystyka molekularna pęcherzyków błony zewnętrznej endofitycznych bakterii oraz ocena ich roli w stymulowaniu indukowanej odpowiedzi systemicznej u roślin

Większość obecnie prowadzonych badań naukowych skupia się na charakterystyce pęcherzyków produkowanych głównie przez patogenne bakterie Gram-ujemne i ich oddziaływaniu na organizm gospodarza. Niewiele wiadomo jak dotąd na temat roli, jaką pełnią OMV produkowane przez inne mikroorganizmy, w tym endofityczne bakterie promujące wzrost roślin. Dowiedziono również, że mikroorganizmy te mogą aktywować u roślin mechanizmy odpornościowe. Bazując na doświadczeniu badawczym zdobytym w trakcie realizacji projektu dotyczącego charakterystyki OMV produkowanych przez *Yersinia*, wspólnie z Panią profesorką Zofią Piotrowską-Seget oraz członkami zespołu Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska postanowiliśmy zbadać, czy OMV wydzielane przez endofity stymulują odporność systemiczną u roślin (*Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*), a także czy mają wpływ na mechanizmy fizjologiczne odpowiedzialne za ich rozwój i wzrost. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod molekularnych, a także analizy chemicznej oceniamy cargo pęcherzyków pod kątem obecności materiału genetycznego, białek (analiza proteomiczna). Opracowujemy również system śledzenia wędrówki i losów pęcherzyków w roślinie (OMV znakowane białkiem zielonej fluorescencji, GFP), dzięki któremu planujemy znaleźć odpowiedź na pytanie, czy roślina reaguje na obecność tych struktur oraz w jaki sposób. Oczekujemy, iż wyniki realizowanego projektu przyczynią się do lepszego zrozumienia funkcji bakteryjnych OMV i ich wpływu na fizjologię roślin oraz aktywację mechanizmów odpornościowych. Otrzymane rezultaty będą pomocne w opracowaniu nowoczesnych strategii wspomagania wzrostu roślin oraz ich ochrony biologicznej przed patogenami. W ramach analiz składu błony zewnętrznej OMV badanych endofitów zaplanowanych w powyższym projekcie, z wspólnie z zespołem pod kierownictwem Pana profesora Adama Chomy z UMCS w Lublinie (konsorcjant w projekcie) dokonaliśmy analizy strukturalnej O-polisacharydu endofitycznej bakterii z rodzaju *Serratia* sp. oraz *Pseudomonas* sp. Wyniki zostały opublikowane jako dwa artykuły naukowe pt: „*Structure of the lipopolysaccharide O-antigen of Serratia spp. strains 10.1WK and 1XS plant endophytes isolated from O. biennis and L. corniculatus*”; 2023; *Carbohydrate Research* 524, 108760 oraz „*Structure of the lipopolysaccharide O-antigen of endophytic Pseudomonas sp. strain L1*”. 2023; *Carbohydrate Research* 525, 10877.

Powyższe badania realizujemy w ramach projektu OPUS 19 (2020/37/B/NZ8/0855) finansowanego przez Narodowego Centrum Nauki pt. „Charakterystyka molekularna pęcherzyków błony zewnętrznej endofitycznych bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i *Rhizobium*

oraz ocena ich roli w stymulowaniu indukowanej odpowiedzi systemicznej u roślin”. Pełnię w nim rolę wykonawcy. Potwierdzenie mojego udziału wraz z zadaniami badawczymi, które realizuję w tym projekcie znajduje się w **załączniku 7**.

Badania odpowiedzi immunologicznej pająków *Steatoda grossa* (Theridiidae) na stres środowiskowy

Swoje zainteresowania immunologią bezkręgowców rozwijam również w ramach współpracy międzyzespołowej na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego. Jestem uczestnikiem badań naukowych pod kierunkiem z dr hab. Grażyny Wilczek, prof. UŚ. Wspólnie z Panią profesorem oraz członkami zespołu Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii analizowaliśmy odpowiedź immunologiczną pająków (eksponowanych na metale ciężkie tj. m.in. kadm) po stymulacji mitogenem (PMA) oraz zawiesinami bakteryjnymi. Wyniki zostały opublikowane jako artykuł naukowy pt. „*The effect of selected immunostimulants on hemocytes of the false black widow *Steatoda grossa* (Theridiidae) spiders under chronic exposition to cadmium. 2022; Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology. 252:109221.*

Obecnie uczestniczę w realizacji projektu OPUS 19 (2020/37/B/NZ8/00584) pt. „W poszukiwaniu strategii adaptacyjnej u obligatoryjnych drapieżników. Immunologiczne mechanizmy u modelowego pająka *Steatoda grossa* (Theridiidae) w warunkach krótkoterminowej i chronicznej ekspozycji na metale”, finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki, pod kierownictwem Pani profesor Wilczek. Do moich zadań badawczych należy opracowanie wyników sekwencjonowania analizy jakościowej (struktury gatunkowej) mikrobiomu jelita pająka po ekspozycji na kadm i miedź (**załącznik 8**). Pierwsze wyniki projektu zostały już opublikowane jako artykuł naukowy pt. „*Effects of chronic exposure to cadmium and copper on the proteome profile of hemolymph in false widow spider *Steatoda grossa* (Theridiidae). 2023; Ecotoxicology and Environmental Safety 249, 1-11, 114448.*

Charakterystyka właściwości antydrobnoustrojowych nośników leków na bazie nanocząstek złota i krzemionki.

Innym obszarem moich zainteresowań naukowych jest biotechnologia medyczna, a w szczególności poszukiwanie i opracowanie nowoczesnych technologii związanych z wytwarzaniem nowatorskich nośników leków.

W kwietniu 2022 roku nawiązałam współpracę z dr Radosławem Balwierzem z Uniwersytetu Opolskiego z Katedry i Zakładu Farmacji i Chemii Ekologicznej. W ramach wspólnych badań oznaczałam aktywność antybakteryjną żeli na bazie nanocząstek złota i krzemionki opłaszczonych chloramfenikolem. Przeprowadzone analizy obejmowały ocenę wielkości stref zahamowania wzrostu bakterii oraz kinetykę wzrostu drobnoustrojów poddanych działaniu żeli. Badania te zaowocowały publikacją pt: „*Nanoparticles coated by chloramphenicol in hydrogels as a useful tool to increase the potential of release API and antibacterial activity in dermal drug delivery*”. 2023; *Pharmacological Reports*.

Dodatkowo w ramach projektu realizowanego przez firmę Biotts SA i Uniwersytet Opolski realizowałam zadanie badawcze mające na celu zbadanie bakteriobójczych i bakteriostatycznych właściwości nośników transdermalnych oraz oleju czulmugorowego wobec *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* (załącznik 9).

Oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych materiałów o potencjalnym zastosowaniu w medycynie rekonstrukcyjnej.

W celu rozwoju moich zainteresowań z obszaru inżynierii biomateriałowej mam przyjemność współpracować z zespołem badawczo- naukowym pod kierunkiem dr hab. inż. Romana Majora zatrudnionym w Instytucie Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

Wspólnie z zespołem badaczy pod kierunkiem Pana profesora prowadziłam interesujące badania, których celem było opracowanie materiałów dedykowanych implantom stosowanym w chirurgii kręgosłupa, które minimalizują ryzyko infekcji bakteryjnych wynikających m.in. z długiego czasu trwania operacji. Mikroorganizmy mogą tworzyć na powierzchni implantu biofilm, powodując jego obluzowanie, ból i ostry stan zapalny w miejscu wszczepienia, co w konsekwencji może prowadzić do rozległej infekcji u biorcy. Nasza strategia badawcza skupiała się na poprawie właściwości antybakteryjnych i zapobieganiu przylegania bakterii do badanych stopów tytanu z dodatkiem nanocząstek srebra (Ti/Ti_xN+Ag). Jednocześnie badaliśmy cienkie, wielowarstwowych powłoki złożone z mikrostruktur nanokrystalicznych wytworzone z badanych stopów, które wykazywały wysoką odporności na zużycie i korozję. Tego typu warstwy mogą mieć zastosowanie jako pokrycie narzędzi chirurgicznych. Wyniki przeprowadzonych badań mikrostrukturalnych i wytrzymałościowych jednoznacznie potwierdziły możliwość wykorzystania badanych powłok do wyżej wymienionych zastosowań.

Co ciekawe, proponowana technologia umożliwiła zmniejszenie rozmiarów narzędzi o około 35 %, co jest niezwykle istotne dla tych wykorzystywanych w operacjach neurochirurgicznych. Jednocześnie badania cytotoksyczności bezpośredniej (w tym pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej) testowanych materiałów nie wykazały toksycznego działania na komórki kostne (badania przeprowadzono na komórkach linii SAOS-2 -kostniakomięsaka kości *Homo sapiens*). Badania mikrobiologiczne (m.in. testy kontaktowe zgodne z normą ISO 22196) wykazały, że wszczepienie nanocząstek Ag do powłok Ti/TiN hamuje rozwój komórek *E. coli* i *S. aureus* oraz zmniejsza ich adhezję do powierzchni materiału. Odkrycia te sugerują, że nanocząsteczki Ag jako składnik powłok implantów mogą potencjalnie minimalizować ryzyko infekcji i stanu zapalnego, a w dalszej konsekwencji zapobiegać reimplantacji u pacjenta. Wyniki badań zostały opublikowane jako artykuł naukowy: **Kasperkiewicz K., Major R., Sypien A., Kot M., Dynier M., Major Ł., Byrski A., Kopernik M., Juergen M. Lackner J.M. Antibacterial Optimization of Highly Deformed Titanium Alloys for Spinal Implants**. 2021; *Molecule (Basel)*, 11, 3145, 1-17.

Wspólne badania naukowe z zespołem pod kierunkiem dr hab. inż. Romana Majora zaowocowały moim udziałem w dwóch międzynarodowych, finansowanych przez NCBIr projektach badawczych: „Patient-specific bioactive, anti-microbial PLA-PGA/titanium implants for large jawbone defects after tumour resection” (jawIMPLANT.M-ERA.NET-2016/232/2017) oraz “Patient-specific, anti-microbial bioactive finger implants for durable functional reconstruction after amputation” (fingerIMPLANT.M-ERA.NET2/2019/7/2020). W ramach tych projektów realizuję badania oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych biomateriałów dedykowanych do implantów twarzoczaszki oraz palca. Analizy te obejmują ocenę *in vitro* formowania biofilmu na różnego typu materiałach tytanowych przez bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne oraz grzyby mikroskopowe, obrazowanie biofilmu bakteryjnego metodą FISH, depozycję endotoksyny bakteryjnej (LPS) na biomateriałach implantowanych do zwierząt doświadczalnych. Potwierdzenie mojego udziału wraz z wykonywanymi zadaniami zostały przedstawione w **załączniku 10**.

Dotychczasowe wyniki wspólnych badań zostały opublikowane jako 4 artykuły naukowe pt.: „Patient specific implants for jawbone reconstruction after tumor resection”. 2020; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 193, 111056, “Hemocompatible Thin Films Assessed under Blood Flow Shear Forces”; 2022; *Molecules*. 27(17):5696, “Antimicrobial materials with improved efficacy dedicated to large craniofacial bone defects after tumor resection”; 2022; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 220, “Characterization of

biomaterials with reference to biocompatibility dedicated for patient-specific finger implants”; 2023; *Acta Bioeng. Biomech.* 25, (1).

Badania właściwości antydrobnoustrojowych powłok nowej generacji na bazie miedzi.

W 2020 roku podjęłam również współpracę naukowo-badawczą z dr. hab Joanną Wojewoda-Budka prof. Instytutu, zatrudnioną w Instytucie Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie w projekcie naukowym zatytułowanym „Powłoki nowej generacji na bazie miedzi o podwyższonej odporności na patogeny” o akronimie AntyPathCoat (M-ERA.NET2/2020/AntiPathCoat/4/2021), który jest w trakcie realizacji. Projekt jest finansowany przez Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Zakres badań, które prowadzę obejmuje ocenę adhezji mikroorganizmów i formowania biofilmu bakteryjnego na badanych powierzchniach za pomocą metod mikrobiologicznych oraz skaningowej mikroskopii elektronowej i mikroskopii konfokalnej. Dodatkowo mikroorganizmy obecne w biofilmie są identyfikowane metodą analizy fluorescencyjnej in-situ (FISH). W projekcie prowadzę również analizy, istotne z punktu widzenia klinicznego, mające na celu określenie stężenia endotoksyny (LPS) na badanych powłokach po ich kontakcie z pałeczkami gram-ujemnymi. Zaproponowana w projekcie koncepcja badań mikrobiologicznych mojego autorstwa pozwoli określić zależności pomiędzy parametrami technologii osadzania powłok miedzianych (Cu-TiO₂) oraz kompozytowych Ti-ZnO, a adhezją i żywotnością różnych patogenów. Potwierdzenie mojego udziału oraz wykonywane zadania zawarto w **załączniku 11**.

Badania mikrobiologiczne biodegradowalnych stopów cynku z magnezem.

Kolejnym tematem badawczym, który realizuję we współpracy z Panią dr. hab Magdaleną Bieda-Niemiec, zatrudnioną w Instytucie Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, jest ocena mikrobiologiczna biodegradowalnych stopów cynku z magnezem, wapniem i strontem pod kątem zastosowań tego typu biomateriałów na implanty kostne. Badania te są realizowane w ramach projektu pt. „New generation material for application in bioabsorbable orthopedic implants” o akronimie: BioAbsMat (NOR/SGS/BioAbsMat/0096/2020-00). Zadania projektowe są w trakcie realizacji. Potwierdzenie mojego udziału oraz wykonywane zadania zawarto w **załączniku 12**.

Plany badawczo-naukowe

W najbliższej perspektywie czasowej będę kontynuować badania dotyczące charakterystyki czynników wirulencji pałeczek *Yersinia enterocolitica* O:3. m.in. białka Ail i Yad oraz ich oddziaływania z organizmem gospodarza. Dzięki uprzejmości i wieloletniej współpracy naukowej z prof. Mikaelem Skurnikiem badania te będą prowadzone z wykorzystaniem genetycznie skonstruowanych mutantów *Yersinia* z pełną lub defektywną ekspresją tych czynników w komórkach. W celu pozyskania środków finansowych na wspomniane badania wezmę udział w konkursie OPUS, który ogłoszony będzie przez Narodowego Centrum Nauki w Krakowie w grudniu 2023 roku.

Rozwijam także swoje umiejętności oraz poszerzam wiedzę w obszarze badań biologicznych biomateriałów stosowanych w medycynie rekonstrukcyjnej (bioprotezy tkankowe, personalizowane implanty dla ortopedii i traumatologii). Obecnie pracuję nad standaryzacją metod mikrobiologicznych oraz molekularnych obejmujących określenie wpływu modyfikacji powierzchni na poziom adhezji, wzrost oraz formowanie biofilmu przez komórki mikroorganizmów (bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne, a także grzyby mikroskopowe) na powierzchni biomateriałów. Opracowuję obecnie protokół badawczy oceny adhezji oraz stężenia endotoksyny bakteryjnej (LPS) na powierzchni biomateriałów po ich deplantacji u zwierząt doświadczalnych. Protokoły te będą cennym narzędziem badawczym oceny biomateriałów dedykowanych dla robotyki i instrumentarium w nowoczesnej chirurgii. Doskonale również umiejętności obrazowania mikroorganizmów oraz struktury biofilmu na powierzchni materiałów przy pomocy techniki mikroskopii fluorescencyjnej (ang. *fluorescent in situ hybridization*), którą wykorzystuję do oceny materiałów stosowanych w projektowaniu urządzeń wspomagających pracę serca (we współpracy z *Fundacją Rozwoju Kardiologii* im. prof. Zbigniewa Religi w Zabrze). Prowadzę również zaawansowane rozmowy z partnerami z Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. Aleksandra Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie w Krakowie i Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w kwestii stworzenia Międzyuczelnianego Centrum Analiz Biomateriałów z wykorzystaniem technik: obrazowania (mikroskopia konfokalna, elektronowa), spektrofotometrycznych, cytometrii przepływowej oraz oceny cytotoksycznych, genotoksycznych i antydrobnoustrojowych właściwości nowo projektowanych biomateriałów.

We współpracy z dr Radosławem Balwierzem planuję prowadzić badania nad stworzeniem bioadhezyjnego żelu do stosowania w jamie ustnej, którego nadrzędnym celem zwalczanie bakterii odpowiedzialnych za próchnicę. W ramach podjętej współpracy moim

zadaniem będzie oznaczenie aktywności przeciw drobnoustrojowej wobec szczepów wzorcowych *Streptococcus mutans* i *Streptococcus salivarius*. Na chwilę obecną eksperymenty są na etapie planowania.

W niedalekiej przyszłości (2023 rok) mam również w planach ukończenie cyklu profesjonalnych szkoleń z zakresu analizy danych bioinformatycznych.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej w szczególności zagranicznej.

W trakcie realizacji pracy doktorskiej podjęłam współpracę naukową z prof. dr hab. Anna Świerzko oraz prof. dr hab. Maciejem Cedzyńskim z Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Dzięki **comiesięcznym** pobytom w tamtejszym laboratorium miałam możliwość nauki nowoczesnych technik stosowanych w analizie immunochemicznej polisacharydów bakteryjnych (tj. immunobloting, ELISA, cytometria przepływowa) oraz wykonywania badań naukowych dotyczących m.in. oddziaływanie endotoksyny *Yersinia enterocolitica* O:3 ze składnikami układu dopełniacza. Wyniki tych badań zostały opublikowane jako cykl prac naukowych i szczegółowo zostały opisane w pierwszej części Autoreferatu. Rezultaty wspólnych badań był również prezentowane na licznych konferencjach krajowych i zagranicznych.

Współpraca z zespołem Immunobiologii zakażeń zaowocowała również powołaniem konsorcjum naukowego i otrzymaniem finansowania projektu pt. „Oddziaływanie gospodarz-patogen: bakteryjne pęcherzyki błony zewnętrznej jako tarcza dla układu dopełniacza”. OPUS 16 (2018/31/B/NZ6/03514), który jest w trakcie realizacji (**załącznik 13**).

Od 1998 roku nieprzerwanie współpracuję z profesorem Mikaelem Skurnikiem prowadząc badania dotyczące charakterystyki czynników wirulencji pałeczek *Yersinia enterocolitica* O:3 (**załącznik 14**). Miałam przyjemność i zaszczyt pracować w laboratorium kierowanym przez Pana Profesora (Uniwersytet w Helsinkach, Finlandia) w trakcie dwóch pobytów szkoleniowo-naukowych w okresie 16.09.2010 - 23.09.2010 (1 tydzień) oraz 8.06.2012 – 9.07.2012 (4 tygodnie), gdzie doskonaliłam techniki hodowli bakterii w bioreaktorach oraz produkcji przeciwciał, a także brałam udział w konstrukcji i charakterystyce mutantów głęboko szorstkich *Yersinia enterocolitica* O:3 (**załącznik 14 i 15**). Poznałam również szczegółowo zasady organizacji laboratorium przystosowanego do pracy z mikroorganizmami genetycznie modyfikowanymi (GMM). Obecnie wspólne z Panem

Profesorem realizujemy grant badawczy dotyczący oddziaływanie pęcherzyków błony zewnętrznej (omv) produkowanych przez *Yersinia enterocolitica* O:3 z układem dopełniacza (**załącznik 14 i 15**).

Od 1998 roku współpracuję z grupą badawczą pod kierunkiem profesora Otto Holsta z Research Center Borstel, Division of Structural Biochemistry, Leibniz Center for Medicine and Biosciences, ARCN, DCL, Borstel, Niemcy (**załącznik 16**). W okresie od 10.07.2014 do 31.07.2014 (3 tygodnie) przebywałam na stażu szkoleniowo-naukowym w zakresie doskonalenia znajomości metod analizy chemicznej polisacharydów bakteryjnych, w tym LPS i EPS *Yersinia enterocolitica* O:3 (**załącznik 16 i 17**). Pobyt ten wzbogacił moją wiedzę i umiejętności w zakresie zastosowania metod chromatografii gazowej ze spektroskopią mas (GC-MS) w analizie endotoksyn bakteryjnych. Wspólne działania naukowe z Panem Profesorem zaowocowały publikacjami naukowymi w indeksowanych czasopismach naukowych, a także były prezentowane na licznych międzynarodowych konferencjach naukowych. Po zakończeniu pracy naukowej przez profesora Holsta, kierownictwo laboratorium objęła dr Katarzyna Anna Duda, z którą współpracuję naukowo w zakresie analizy strukturalnej antygenów bakteryjnych.

Wykaz publikacji powstałych w wyniku prowadzenia badań w więcej niż jednej jednostce naukowej

1. Radziejewska-Lebrecht J., **Kasperkiewicz K.**, Skurnik M., Brade L., Steinmetz I., Swierzek A. S., Muszyński A. 2003. ECA-antibodies in antisera against R mutants of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Advances in Experimental Medicine and Biology - Book series 529*, 215-218; ***Uniwersytet Śląski w Katowicach, Uniwersytet w Helsinkach, Research Center Borstel, Niemcy.***
2. Pinta E., Duda K. A., Hanuszkiewicz A., Kaczyński Z., Lindner B. L., Miller W., Hyytiäinen H., Vogel C., Borowski S., **Kasperkiewicz K.**, Lam J. S., Radziejewska-Lebrecht J., Skurnik M., Holst O. 2009. Identification and Role of a 6-Deoxy-4-Keto-Hexosamine in the Lipopolysaccharide Outer Core of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Chemistry-A European Journal* 15(38), 9747-9754. DOI:10.1002/chem.200901255. ***Uniwersytet Śląski w Katowicach, Uniwersytet w Helsinkach, Research Center Borstel, Niemcy.***
3. Rabsztyń K., **Kasperkiewicz K.**, Duda K. A., Li C-M., Lukasik M., Radziejewska-Lebrecht J., Skurnik M. 2011. Characterization of anti-ECA antibodies in rabbit antiserum

- against rough *Yersinia enterocolitica* O:3. *Biochemistry (Moscow)* 76(7):832-9. DOI: 10.1134/S0006297911070145. *Uniwersytet Śląski w Katowicach, Uniwersytet w Helsinkach, Research Center Borstel, Niemcy.*
4. Muszyński A., Rabsztyń K., Knapka K., Duda K. A., Duda-Grychtoł K., **Kasperkiewicz K.**, Radziejewska-Lebrecht J., Holst O., Skurnik M. 2013. Enterobacterial common antigen and O-specific polysaccharide coexist in the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* serotype O : 3. *Microbiology*. 159(8):1782-93. DOI: 10.1099/mic.0.066662-0. *Uniwersytet Śląski w Katowicach, Uniwersytet w Helsinkach, Research Center Borstel, Niemcy.*
 5. Noszczyńska M., **Kasperkiewicz K.**, Duda K.A., Podhorodecka J., Rabsztyń K., Gwizdała K., Świerżko A.S., Radziejewska-Lebrecht J., Holst O., Skurnik M. 2015. Serological characterization of the enterobacterial common antigen substitution of the lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica* O:3. *Microbiology* 161:219–27; DOI:10.1099/mic.0.083493-0. *Uniwersytet Śląski w Katowicach, Uniwersytet w Helsinkach, Research Center Borstel, Niemcy.*
 6. **Kasperkiewicz K.**, Świerżko A.S., Bartłomiejczyk M.A., Cedzyński M., Noszczyńska M., Duda K.A., Michalski M., Skurnik M. 2015. Interaction of human mannose-binding lectin (MBL) with *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharide. *International Journal of Medical Microbiology* 305: 544–52; DOI:10.1016/j.ijmm.2015.07.00. *Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi, Uniwersytet Śląski w Katowicach.*
 7. **Kasperkiewicz K.**, Eppa Ł., Świerżko A.S., Bartłomiejczyk M.A., Żuber Z., Siniewicz-Luzeńczyk K., Mężyk E., Matsushita M., Bąk-Romaniszyn L., Zeman K., Skurnik M., Cedzyński M. 2017. Lectin pathway factors in patients suffering from juvenile idiopathic arthritis. *Immunology and Cell Biology* 95, 666-675; DOI:10.1038/icb.2017.31. *Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wojewódzki specjalistyczny Szpital Dziecięcy im. św. Ludwika w Krakowie.*
 8. Świerżko A.S., Michalski M., Sokolowska A., Nowicki M., Eppa Ł., Szala-Pozdziej A., Mitrus I., Szmigielska-Kapłon A., Sobczyk-Kruszelnicka M., Michalak K., Golos A., Wierzbowska A., Giebel S., Jamroziak K., Kowalski M. L., Brzezinska O., Thiel S., Jensenius J.C., **Kasperkiewicz K.**, Cedzynski M. 2018. The role of complement activating collectins and associated serine proteases in patients with hematological malignancies, receiving high-dose chemotherapy, and autologous hematopoietic stem cell transplantations (Auto-HSCT). *Frontiers in Immunology* 9, 2153: 1-15. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02153. *Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi.*

9. **Kasperkiewicz K.**, Świerzko A. S., Przybyła M., Szemraj J., Barski J., Skurnik M., Kałużyński A., Cedzyński M. 2020. The Role of *Yersinia enterocolitica* O:3 Lipopolysaccharide in Collagen-Induced Arthritis. *Journal of Immunology Research* 1–12; DOI: 10.1155/2020/7439506. *Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Centrum Medycyny Doświadczalnej (w) Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Uniwersytet Medyczny w Łodzi.*
 10. **Kasperkiewicz K.**, Świerzko A.S., Michalski M., Eppa Ł., Skurnik M., Żuber Z., Cedzyński M. 2022. Antibodies recognizing *Yersinia enterocolitica* lipopolysaccharides of various chemotypes in synovial fluids from patients with juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Immunology Research* 1-9; DOI:10.1155/2022/9627934. *Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wojewódzki specjalistyczny Szpital Dziecięcy im. św. Ludwika w Krakowie.*
6. **Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.**

A) Informacje o osiągnięciach dydaktycznych:

Od chwili zatrudnienia w Uniwersytecie Śląskim przygotowuje i prowadzi autorskie zajęcia tj. laboratoria, konwersatoria, seminaria oraz wykłady dla studentów studiów I i II stopnia kierunków Biologia i Biotechnologia. Pełnię funkcję koordynatora wydziałowego następujących przedmiotów: *Wybrane zagadnienia z mikrobiologii, Mikrobiologia sanitarna, Biotechnologia medyczna, Immunologia, Podstawy immunologii, Immunodiagnostyka, Mikrobiologia żywności i fizjologia żywienia, Żywność specjalnego przeznaczenia i żywność funkcjonalna, Współczesne trendy w żywieniu człowieka*. Prowadzę również pracownie licencjackie oraz dyplomowe, a także nowatorski przedmiot *Praca w projekcie*, w ramach którego przygotowuje studentów do planowania i prowadzenia eksperymentów badawczych. W ramach swojej pracy dydaktycznej i organizacyjnej w okresie od 2021 roku pełnię rolę opiekuna kierunku Biotechnologia (studia II stopnia).

Moja działalność dydaktyczna jest rokrocznie wysoko oceniana przez studentów w badaniu ankietowym (wyniki od 4.86 do 5.00, w skali punktowej 0-5). Otrzymałam również podziękowanie od JM Rektora Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach prof. dr. hab Ryszarda

Koziółka za dbałość o wysoką jakość dydaktyki akademickiej w sytuacji pandemii oraz profesjonalne wdrożenie zdalnego kształcenia (**załącznik 18**).

Od 2010 roku pełniłam rolę promotora 29 prac licencjackich (w tym zarówno o charakterze teoretycznym jak i doświadczalnym). Byłam również recenzentem 11 prac licencjackich oraz członkiem komisji egzaminacyjnych w trakcie egzaminów licencjackich i magisterskich. Promowałam również dwie prace magisterskie w latach 2022-2023.

W roku 2019 sprawowałam rolę opiekuna naukowego doktoranta z Ecole Nationale Polytechnique d'Alger - mgr inż. Hakima Rabia z wykonującego badania na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska w ramach międzynarodowego projektu pod patronatem UNESCO pt: „Izolacja mikroorganizmów, zdolnych do produkcji EPS i CPS, z rud fosforanowych z Algierii”, którego celem było wyselekcjonowanie i scharakteryzowanie mikroorganizmów zdolnych do produkcji egzopolisacharydów (EPS) i polisacharydów otoczkowych (CPS) - molekuł uczestniczących w biosorpcji metali, oraz wykorzystanie ich w procesie uzdatniania surowców skalnych (**załącznik 19**). Wyniki uzyskane z przeprowadzonych badań zostały opublikowane jako artykuły naukowe: „*Adhesion abilities and biosorption of Cd and Mg by microorganisms - first step for eco-friendly beneficiation of phosphate ore*” (2019; *Scientific Reports - Nature 9 (1): (12929), 1-14*) oraz “*Native Bacteria Isolated from Phosphate Deposits Reveal Efficient Metal Biosorption and Adhesion to Ore Particles*” .2023; *Minerals 13, 388*.

W roku 2020 uchwałą Rady Naukowej Instytutu Metalurgii i Inżynierii Materiałowej im. A. Krupkowskiego Polskiej Akademii Nauk zostałam wyznaczona na promotora pomocniczego pracy doktorskiej mgr Adama Byrskiego (**załącznik 20**). Doktorant mgr Adam Byrski jest absolwentem kierunku Biotechnologia na Wydziale Nauk Przyrodniczych, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach i realizuje interdyscyplinarną pracę badawczą pt: „Bioaktywne implanty, specyficzne dla pacjenta, zapewniające trwałą rekonstrukcję funkcjonalną”. Jako promotor pomocniczy wspieram realizację analiz mikrobiologicznych i molekularnych biomateriałów.

W roku 2022 decyzją Dziekana Szkoły Doktorskiej w Uniwersytecie Śląskim w Katowicach, po uzyskaniu pozytywnej opinii Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska zostałam wyznaczona na promotora pomocniczego Pani mgr Iryny Bodnaruk, doktorantki Szkoły Doktorskiej w Uniwersytecie Śląskim w Katowicach (**załącznik 21**). Mgr Iryna Bodnaruk realizuje pracę doktorską pt: „Wpływ pęcherzyków błony zewnętrznej metaloopornych bakterii endofitycznych na wzrost i kondycję roślin narażonych na wysokie stężenia metali ciężkich”. Jako promotor pomocniczy będę wspierać realizację

zadań badawczych dotyczących izolacji i charakterystyki pęcherzyków błony zewnętrznej metaloopornych bakterii endofitycznych.

Ponieważ praca dydaktyczna jest moją pasją, staram się nieustannie podnosić swoje kwalifikacje w tym obszarze. Dlatego też, podjęłam się pracy jako Tutor na Uniwersytecie Śląskim. Po ukończeniu specjalistycznego szkolenia z zakresu tutoringów (**załącznik 22**), swoją pierwszą pracę w tym obszarze rozpoczęłam w roku szkolnym 2017/2018, pełniąc rolę tutora w „Uniwersyteckim programie tutoringowym dla Mickiewicza” (**załącznik 23**). Program ten obejmował współpracę z wybitnie uzdolnionymi uczniami III Liceum Ogólnokształcącego im. Adama Mickiewicza w Katowicach oraz kształcącymi ich pedagogami. Moja praca tutorska dotyczyła realizacji projektu naukowego, którego tematem była charakterystyka mikroorganizmów występujących w fermentowanej żywności. Spotkania tutorskie polegały zarówno na analizie dostępnej literatury naukowej z tego tematu, jak również miały charakter zajęć praktycznych w laboratorium i obejmowały naukę podstawowych metod izolacji mikroorganizmów z żywności, a następnie ich charakterystykę morfologiczną i biochemiczną.

Pracę tutorską kontynuowałam w latach 2018 i 2019 w inicjatywie „Uniwersytet Najlepszych” pod patronatem JM Rektora prof. dr. hab Ryszarda Koziołka. Celem programu było promowanie i wspieranie talentów oraz zatrzymanie najzdolniejszych młodych ludzi w Katowicach, Sosnowcu i Chorzowie poprzez proponowanie im unikalnych warunków kształcenia (**załącznik 24**). Prowadziłam zajęcia praktyczne i konwersatoryjne z trzema podopiecznymi. Realizowane projekty obejmowały zagadnienia z zakresu mikrobiologii żywności i fizjologii żywienia. Uzyskane wyniki w trakcie realizacji projektu, zostały zaprezentowane przez uczniów na konferencji podsumowującej w formie wystąpień ustnych i posterów. W programie „Uniwersytet Najlepszych” pełniłam również rolę przewodniczącej komisji kwalifikacyjnej z obszaru nauk ścisłych i przyrodniczych (**załącznik 25**). Pracowałam również jako tutor w Centrum Tutorów Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŚ, w roku akademicki 2018/2019 (dwóch podopiecznych). Efektem tej aktywności był prezentacja wyników uzyskanych przez podopiecznych na konferencji podsumowującej projekt w formie posteru. W bieżącym roku akademickim 2022/2023 również planuję współpracę naukowo-dydaktyczną ze studentką, która wybrała moją osobę z grona tutorów Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska.

Podjęłam również chęć zdobycia doświadczenia jako mentor uniwersytecki, w związku z tym wzięłam udział w programie „DUO - Uniwersytet Śląski uczelnią dostępną, uniwersalną i otwartą” (**załącznik 26**). Program był współfinansowanym ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (Program Operacyjny: Wiedza Edukacja

Rozwój, Oś priorytetowa: III. Szkolnictwo wyższe dla gospodarki i rozwoju. Działanie: 3.5 Kompleksowe programy szkół wyższych). Głównym jego celem było zwiększenie zakresu dostępności oraz poziomu otwartości i uniwersalności Uniwersytetu Śląskiego poprzez udoskonalenie wsparcia edukacyjnego m.in. poprzez zniwelowanie barier dostępności dla studentów z niepełnosprawnościami oraz z innymi dysfunkcjami. Pełniłam rolę mentora dla jednego podopiecznego z niepełnosprawnością, będąc Jego wsparciem w realizacji programu studiów. W trakcie realizacji projektu wzięłam udział w superwizjach grupowych i –sześciu szkoleniach specjalistycznych (60 godzin lekcyjnych) (**załącznik 26**).

Jednocześnie staram się w sposób ciągły podnosić swoje kompetencje dydaktyczne poprzez udział w specjalistycznych kursach, m.in. w ramach projektu *SWAN- Szkolnictwo Wyższe Atrakcyjne i Nowoczesne – Podnoszenie kompetencji dydaktycznych kadry akademickiej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach*. Ukończyłam następujące kursy:

- „Poruszanie się w świecie wirtualnych zasobów informacji i usług on –line”, 2018
- „Tworzenie i praca z bazami danych”, 2018
- Specjalistyczny kurs języka angielskiego w ochronie środowiska, 2018 (**załącznik 27**).

Aby podnieść swoje kompetencje zawodowe jako członek Rady Programowej kierunku Biologia żywności i żywienia w 2014 roku rozpoczęłam studia licencjackie na kierunku „Dietetyka” w Śląskiej Wyższej Szkole Medycznej w Katowicach. Kształcenie zakończyłam w 2018 roku, uzyskując tytułu licencjata w dziedzinie dietetyki klinicznej (**załącznik 28**).

B) Informacje o osiągnięciach organizacyjnych.

W ramach działalności organizacyjnej w latach 1998 - 2015 współorganizowałam, a także czynnie uczestniczyłam, jako prelegentka, w seminariach organizowanych przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska w ramach programu LLP-Erasmus, w których brali udział naukowcy m.in. z Niemiec, Włoch, Finlandii i Anglii (**załączniki 14 i 16**).

W 2011 roku byłam współorganizatorką Posiedzenia Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk na Uniwersytecie Śląskim w Katowicach.

W 2012 roku zostałam wybrana przez społeczność akademicką na członka kolegium elektorów wybierających Rektora Uniwersytetu Śląskiego na lata 2012-2016.

W latach 2012-2016 byłam przedstawicielem nauczycieli akademickich w Radzie Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska.

W 2019 roku z powołania Dziekana Wydziału Nauk Przyrodniczych Prof. dr hab. Leszka Marynowskiego zostałam członkiem Rady Dydaktycznej kierunków: Biologia, Biotechnologia i Ochrona Środowiska (**załącznik 29**). Aktywnie uczestniczę w organizacji kształcenia w Instytucie, będąc współautorem programów studiów, jestem również członkiem Pomocniczego Zespołu działającego przy kierunkowym Zespole Zapewniającym Jakość Kształcenia dla kierunku Biotechnologia.

W roku 2022 zostałam powołana na członka Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na kadencję 2022-2026 (**załącznik 30**).

W związku z wieloletnim doświadczeniem w pracy z mikroorganizmami genetycznie modyfikowanymi (GMM), które zdobyłam na stażach naukowych w laboratorium Prof. Mikaela Skurnika (Department of Bacteriology and Immunology, University of Helsinki, Finlandia) oraz na międzynarodowym kursie praktyczno – teoretycznym z zakresu bezpieczeństwa stosowania drobnoustrojów modyfikowanych genetycznie (TEMPUS JEP 12037-97 WORKSHOP on "Risk assessment of GMO – environmental and breeding approach", Uniwersytet Śląski w Katowicach), a także na kursie pt. „Przepisy prawa i informacje praktyczne dla wnioskodawców i użytkowników GMM i GMO”, zostałam powołana na członka Wydziałowej Komisji ds. GMO. Jestem również odpowiedzialna za zamknięte użycie genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów (GMM) kategorii I i II w Zakładzie Inżynierii Genetycznej w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska (**załącznik 31**).

Jako magister analityki medycznej (**załącznik 32**) posiadam prawo wykonywania zawodu diagnosty laboratoryjnego (numer wpisu na listę diagnostów laboratoryjnych: 09612) i jestem aktywnym członkiem Izby Diagnostów Laboratoryjnych (**załącznik 33**).

C) Działalność popularno-naukowa i promocyjna

W ramach swojej działalności popularno-naukowej oraz promocyjnej rokrocznie jestem zaangażowana w prowadzenie zajęć laboratoryjnych oraz wygłoszenie wykładów popularno-naukowych w ramach Ogólnopolskiej Nocy Biologów oraz ogólnopolskiej akcji Plant Day. Wygłaszałam również liczne wykłady popularno-naukowe dla młodzieży szkolnej i licealnej (m.in. z okazji Światowego Dnia Zdrowia, Tygodnia Mózgu), a także prowadziłam warsztaty praktyczne dla dzieci w wieku przedszkolnym (**załącznik 34**).

W roku 2021 byłam aktywnym uczestnikiem Śląskiego Festiwalu Nauki w Katowicach, przygotowując webinar pt. „Układ odpornościowy – nasza niewidzialna tarcza obronna”, link

do wydarzenia: <https://us.edu.pl/event/webinar-sfn-uklad-odpornosciowy-nasza-niewidzialna-tarcza-obronna>”.

W ramach działalności edukacyjno-promocyjnej przygotowałam również kurs z zakresu podstaw Immunologii dla maturzystów, link:

<https://us.edu.pl/dr-katarzyna-kasperkiewicz-niewidzialna-tarcza-obronna-uklad-odpornosciowy/>. Działanie edukacyjne pod patronatem Uniwersytetu Śląskiego: [#wspieramymaturzystów/wykłady](#)

Na zaproszenie Narodowego Centrum Nauki w Krakowie brałam również udział w promocji projektu naukowego (finansowanego przez tą jednostkę), pt: „Badania znaczenia lektyny wiążącej mannan w młodzieńczym idiopatycznym zapaleniu stawów związanym z zakażeniami *Yersinia*”, którym kierowałam w latach 2011-2015, w formie kalendarza NCN na rok 2017 (**załącznik 35**).

Na zaproszenie redaktora Tomasza Rożka brałam udział jako ekspert w programie telewizyjnym „Sonda 2”.

Od 2019 roku aktywnie współpracuję również z redaktor Katarzyną Juskiewicz z Polskiego Radia Katowice, uczestnicząc w podcastach i audycjach radiowych.

- <https://podcasty.radio.katowice.pl/nauka-kazdego-dnia-odc-7-obrona-przed-wirusami-cz-1/>
- <https://podcasty.radio.katowice.pl/nauka-kazdego-dnia-odc-23-limfocyty-i-naturalni-zabojcy/>
- <https://podcasty.radio.katowice.pl/nauka-kazdego-dnia-odc-47-witaminy/>
- <https://podcasty.radio.katowice.pl/category/nauka-kazdego-dnia/>
- Audycja radiowa: magazyn ekologiczny "Wysypisko"; 14 sierpnia 2022
- Audycja radiowa: magazyn "Nauka na UKF-ie ", Jak odróżnić kiszonki od kwaszonek?"; 18 stycznia 2021
- Program radiowy wakacyjny "Jak to działa?"- Jak działają probiotyki?; 27 lipca 2022.

Wspólnie z redaktor dr Małgorzata Kłoskiewicz przygotowałam artykuły popularno-naukowe pt.: „Człowiek kontra wirusy” (**załącznik 36**) oraz „Wszystko co chcielibyście wiedzieć o szczepieniu przeciw COVID -19” (**załącznik 37**) które zostały opublikowane w Gazecie Uniwersyteckiej UŚ oraz czasopiśmie popularno-naukowym Uniwersytetu Śląskiego, No Limits pt: „The natural human fight viruses. 2020, 2(2) (**załącznik 38**).

Aktywnie uczestniczę również w konferencjach prasowych organizowanych przez biuro prasowe Uniwersytetu Śląskiego. Brałam także udział w akcji „UŚ wspiera” w ramach, której naukowcy UŚ pomagali odnaleźć się społeczności akademickiej w trakcie pandemii koronawirusa. W ramach tych działań przygotowałam dwa artykuły w formie on-line:

<https://us.edu.pl/dr-katarzyna-kasperkiewicz-co-jesc-aby-wzmocnic-odpornosc-czesc-1/> oraz

<https://us.edu.pl/dr-katarzyna-kasperkiewicz-co-jesc-aby-wzmocnic-odpornosc-czesc-2/>

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

W latach 2019-2020 roku uczestniczyłam w badaniach prowadzonych pod kierunkiem dr hab. Mirosława Nakoniecznego, prof. UŚ, który jest inicjatorem założenia uniwersyteckiej pasieki na dachu budynku Wydziału Prawa i Administracji UŚ. Badania dotyczyły wpływu niektórych czynników środowiskowych charakterystycznych dla miasta na pszczoły zamieszkujące ule uniwersyteckiej pasieki. Siostrzana pasieka została założona w terenie wiejskim. Jednym z celów badawczych była ocena i porównanie kondycji rodzin pszczelich między pasiekami: miejską i wiejską. Do moich zadań należała identyfikacja i ocena liczebności bakterii kwasu mlekowego występujących w jelitach pszczoł. Zadanie to realizowałam wspólnie z mgr. Anną Urbaś. Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie posteru pt.: „Porównanie siły rodzin pszczoły miodnej *Apis mellifera*, pochodzących z terenów zurbanizowanych i terenów wiejskich” na 57 Naukowej Konferencji Pszczelarskiej, której organizatorem byli: Zakład Pszczelnictwa Instytutu Ogrodnictwa w Puławach, Śląski Związek Pszczelarzy, Urząd Miasta Cieszyn, Uniwersytet Śląski (załącznik 39).

Nagrody i wyróżnienia (załącznik):

Za działalność naukowo-badawczą otrzymałam nagrodę indywidualną III stopnia (załącznik 40).

.....Katarzyna Kasperkiewicz.....

(podpis wnioskodawcy)