

Streszczenie w języku polskim

Archaea, jako odrębna domena organizmów prokariotycznych, została po raz pierwszy opisana w 1977 roku przez Carla Woese. Początkowo archeony uważano, jedynie za organizmy ekstremofilne, ale z czasem wykazano, iż stanowią one istotny składnik mikrobiomu człowieka i zwierząt. Jedną z ważnych grup w domenie *Archaea* są archeony halofilne, charakteryzujące się zdolnością do życia w środowisku o skrajnie wysokim zasoleniu. Biologiczny wpływ archeonów halofilnych na zdrowia człowieka, ich potencjalne właściwości immunomodulacyjne oraz ochronne, pozostają słabo poznane.

Celem pracy było wykazanie potencjału immunomodulacyjnego archeonów halofilnych, *Halorhabdus rudnickae* oraz *Natrinema salaciae*, wobec ludzkich komórek dendrytycznych (KD) pochodzenia monocytarnego. W odpowiedzi odpornościowej KD odgrywają kluczową rolę jako profesjonalne komórki prezentujące antygen dziewiczym limfocytom T. Interakcje pomiędzy KD a halofilami badano na kilku poziomach: zdolności wnikania do KD, bezpieczeństwa wobec KD, zdolności wzbudzania odpowiedzi odpornościowej z udziałem limfocytów T, a także określenia właściwości protekcyjnych halofili przed genotoksycznym działaniem enterotoksyny B (SEB) *Staphylococcus aureus* na KD.

Monocyty oraz limfocyty ludzkie zostały wyizolowane z komercyjnie dostępnych kożuszków leukocytarno-płytkowych uzyskanych od 30 zdrowych dawców krwi metodą separacji magnetycznej. Monocyty przekształcano w komórki dendrytyczne w trakcie 6-dniowej hodowli w środowisku cytokin GM-CSF i IL-4, a następnie stymulowano *in vitro* szczepami archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae*.

W pracy wykazano, iż archeony halofilne wnikały do cytoplazmy i jądra KD, nie indukowały jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA, nie wywoływały apoptozy, ani nekrozy i nie ingerowały w cykl komórkowy, a zatem stanowią bezpieczny stymulator komórek dendrytycznych. Ponadto, oba badane gatunki archeonów halofilnych powodowały dojrzewanie KD, o czym świadczył wysoki poziom ekspresji receptorów powierzchniowych CD86, CD80 i CD83, oceniony metodą cytometrii przepływownej, a także nasilona produkcja cytokin IL-10, IL-12p40 i TNF- α oceniona w teście ELISA. Wykazano, że autologiczne limfocyty T CD4⁺ pobudzane archeonami halofilnymi

prezentowanymi przez KD produkowały istotnie intensywniej IFN- γ , IL-12p40, IL-13 oraz TNF- α , w porównaniu do limfocytów w ko-hodowli z KD niestymulowanymi. O ile wśród limfocytów odpowiadających produkcją IFN- γ na archeony halofilne prezentowane przez KD dominowały limfocyty T CD4⁺ dziewicze, to IL-13 była produkowana zarówno przez limfocyty T CD4⁺ dziewicze, jak i limfocyty pamięci.

W badaniach z użyciem enterotoksyny B *S. aureus* (SEB) wykazano, iż archeony halofilne posiadały właściwości protekcyjne przed genotoksycznym działaniem SEB na KD poprzez ochronę chromatyny przed fragmentacją oraz powstawaniem jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA w KD. Pozostawało to w związku z progresją cyklu komórkowego

i ograniczeniem apoptozy. Z kolei wywołana SEB nasiloną ekspresją receptorów powierzchniowych CD86, CD80, CD83 KD oraz zwiększona produkcja cytokin IFN- γ , IL-12p40, IL-10, IL-13 i TNF- α nie były modulowane po wprowadzeniu do hodowli archeonów halofilnych.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują na bezpieczeństwo stosowania archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae* i *N. salaciae* jako stymulatorów ludzkich KD pochodzenia monocytarnego, zdolność tych drobnoustojów do pobudzania limfocytów T do zrównoważonej odpowiedzi odpornościowej. Ponadto, wykazano właściwości protekcyjne archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae* i *N. salaciae* przed genotoksycznym działaniem enterotoksyny B *S. aureus* na KD. Wyniki prezentowanej pracy pozwalają sugerować przydatność archeonów halofilnych w opracowywaniu modeli eksperymentalnych zmierzających do wyjaśnienia roli archeonów halofilnych w haloterapii, jako metody leczenia chorób układu oddechowego, albowiem korzystne efekty tej terapii mogą wynikać nie tylko z działania aerozolu solnego, ale także z obecności w środowisku solnym archeonów halofilnych.



Streszczenie w języku angielskim

Archaea, as a separate domain of prokaryotic organisms, were first described in 1977 by Carl Woese. Initially, archaea were considered only as extremophilic organisms, but over time it was discovered that they are an important component of the human and animal microbiome. One of the groups in the *Archaea* domain are halophilic archaea, characterized by their adaptation to life in extremely high salinity environments. The biological impact of halophilic archaea on human health, their potential immunomodulatory and protective properties remain poorly understood.

The main objective of this dissertation was to investigate the interactions between selected species of halophilic archaea, *Halorhabdus rudnickae* and *Natrinema salaciae*, with human monocyte-derived dendritic cells (DCs). In the immune response, DCs play a key role as professional antigen-presenting cells to T lymphocytes and the only cells capable of stimulating naïve T cells. Interactions between DCs and halophiles were investigated at several levels: the ability to interact with DCs, the safety of halophilic archaea stimulation of DCs, their recognition by DCs, their ability to stimulate a T cell response, and determination the protective properties of halophiles manifested against the genotoxic effects induced by *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB) on human DCs.

Human monocytes and lymphocytes were isolated from commercially available buffy coats obtained from 30 healthy blood donors using the magnetic separation method. In the next step, DCs were generated from monocytes during a 6-day culture in the presence of GM-CSF and IL-4, and then stimulated *in vitro* with *Hrd. rudnickae* and *N. salaciae*.

The study demonstrated that halophilic archaea penetrated into the cytoplasm and the nucleus of DCs, but did not induce single (SSB)- or double-stranded (DSB) DNA breaks. They did not induce apoptosis or cell necrosis and did not interfere with the DC cell cycle. In addition, both tested halophilic archaeal species induced DC maturation, manifested by high expression of the surface markers CD86, CD80 and CD83, as analyzed by flow cytometry, and enhanced production of the IL-10, IL-12p40 and TNF- α by DCs. Furthermore, autologous CD4⁺ T lymphocytes co-incubated with DCs stimulated with halophilic archaea produced significantly higher amounts of IFN- γ , IL-12p40, IL-13 and TNF- α in comparison to co-cultures of lymphocytes with unstimulated DC. While naïve

CD4⁺ T cells predominated among lymphocytes responding with IFN- γ production to halophilic archaea presented by DC, IL-13 was produced by both naïve and memory CD4⁺ T cells.

Studies using the genotoxic DC stimulator SEB showed that halophilic archaea have protective properties by significantly reducing the degree of chromatin fragmentation and the number of single- and double-stranded DNA breaks in DCs compared to SEB-stimulated DCs in the absence of the halophiles. Furthermore, *Hrd. rudnickae*- or *N. salaciae*-stimulated DCs in the presence of SEB were characterized by significantly lower percentage of apoptotic cells, as well as numbers of cells in the sub-G1 and S phases of the cell cycle compared to non-stimulated DCs. Moreover, the halophiles did not modulate the SEB-induced high expression of the surface markers CD86, CD80 and CD83 on the DCs, and the increase of production of IFN- γ , IL-12p40, IL-10, IL-13 and TNF- α by the DCs.

In conclusion, the results of this thesis demonstrate the safety of the halophilic archaea *Hrd. rudnickae* and *N. salaciae* as stimulators of human monocyte-derived DCs, the ability of these microorganisms to stimulate T lymphocytes for a balanced immune response, and also indicated their protective properties against the genotoxic effects of SEB on DCs. The obtained results allow us to suggest the usefulness of halophilic archaea in the development of experimental models aimed at elucidating the mechanism underlying the beneficial effects of halotherapy, as an alternative therapy for respiratory diseases, as the beneficial effects may be due to not only to the composition of the salt aerosol but also to the presence of halophilic archaea in the salt environment.

