

Stacjonarne Studia doktoranckie Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej

Krzysztof Tadeusz Krawczyk

Archeony halofilne jako stymulatory komórek układu odpornościowego człowieka

Halophilic archaea as stimulators of human immune system

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ

pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Kowalewicz-Kulbat



Kłopot z życiem polega na tym, że nie ma okazji go przećwiczyć i od razu robi się to na poważnie.

Terry Pratchett, Piramidy

SPIS TREŚCI

Wykaz wynikar	publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej łączącej dwa artykuły opublikowane z mi oryginalnymi nieopublikowanymi	6
Wykaz	pozostałych publikacji naukowych	7
Komuni	katy zjazdowe	9
Źródła f	inansowania	13
Wykaz s	skrótów	14
I.	Wprowadzenie	17
I.1.	Odkrycie archeonów oraz ich podział taksonomiczny	17
1.2.	Budowa i podział archeonów	19
1.2.1.	Struktury zewnątrzkomórkowe u Archaea	20
1.2.2.	Ściana komórkowa, warstwa S oraz błona komórkowa u Archaea	22
1.2.3.	Budowa wewnętrzna oraz metabolizm Archaea	23
1.3.	Archeony jako składnik ludzkiego mikrobiomu	23
1.4.	Charakterystyka archeonów halofilnych	25
1.4.1.	Charakterystyka badanych szczepów – Halorhabdus rudnickae oraz Natrinema salaciae	27
1.5.	Zastosowanie archeonów w przemyśle i medycynie	30
1.5.1.	Archeosomy i pęcherzyki gazowe jako potencjalne komponenty do produkcji szczepionek	
[Publika	acja 1]	30
[Publika I.6.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych	30 45
[Publika I.6. I.6.1.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego	30 45 47
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna	30 45 47 48
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2. I.6.3.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna Wybrane receptory komórek dendrytycznych	30 45 47 48 50
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2. I.6.3. I.7.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna Wybrane receptory komórek dendrytycznych Charakterystyka limfocytów T	30 45 47 48 50 51
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2. I.6.3. I.7. I.8.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna Wybrane receptory komórek dendrytycznych Charakterystyka limfocytów T Wybrane cytokiny produkowane przez komórki dendrytyczne oraz limfocyty T	30 45 47 48 50 51 52
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2. I.6.3. I.7. I.8. I.9.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna Wybrane receptory komórek dendrytycznych Charakterystyka limfocytów T Wybrane cytokiny produkowane przez komórki dendrytyczne oraz limfocyty T Toksyny gronkowcowe	30 45 47 50 51 52 53
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2. I.6.3. I.7. I.8. I.9. II.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna Wybrane receptory komórek dendrytycznych Charakterystyka limfocytów T Wybrane cytokiny produkowane przez komórki dendrytyczne oraz limfocyty T Toksyny gronkowcowe Cel pracy	30 45 47 48 50 51 52 53 55
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2. I.6.3. I.7. I.8. I.9. II. III.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna Wybrane receptory komórek dendrytycznych Charakterystyka limfocytów T Wybrane cytokiny produkowane przez komórki dendrytyczne oraz limfocyty T Toksyny gronkowcowe Cel pracy Materiały i metody	30 45 47 50 51 52 53 55 57
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2. I.6.3. I.7. I.8. I.9. II. III. III.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna Wybrane receptory komórek dendrytycznych Charakterystyka limfocytów T Wybrane cytokiny produkowane przez komórki dendrytyczne oraz limfocyty T Toksyny gronkowcowe Cel pracy Materiały i metody Materiały	30 45 47 50 51 52 53 55 57
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2. I.6.3. I.7. I.8. I.9. II. III. III. III.1.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna Wybrane receptory komórek dendrytycznych Charakterystyka limfocytów T Wybrane cytokiny produkowane przez komórki dendrytyczne oraz limfocyty T Toksyny gronkowcowe Cel pracy Materiały i metody Materiały i metody	30 45 47 50 51 53 55 57 57 57
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2. I.6.3. I.7. I.8. I.9. II. III. III. III.1. III.1.1. III.1.2.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna Wybrane receptory komórek dendrytycznych Charakterystyka limfocytów T Charakterystyka limfocytów T Wybrane cytokiny produkowane przez komórki dendrytyczne oraz limfocyty T Toksyny gronkowcowe Cel pracy Materiały i metody Materiały i metody Materiał badany Szczepy archeonów halofilnych	30 45 47 50 51 52 53 57 57 57 57
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2. I.6.3. I.7. I.8. I.9. II. III. III.1. III.1.1. III.1.2. III.1.3.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna Wybrane receptory komórek dendrytycznych Charakterystyka limfocytów T Wybrane cytokiny produkowane przez komórki dendrytyczne oraz limfocyty T Toksyny gronkowcowe Cel pracy Materiały i metody Materiały i metody Materiały adany Szczepy archeonów halofilnych	30 45 47 50 51 52 57 57 57 57 57
[Publika I.6. I.6.1. I.6.2. I.6.3. I.7. I.8. I.9. II. III. III.1. III.1.1. III.1.2. III.1.3. III.1.4.	acja 1] Charakterystyka komórek dendrytycznych Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego Synapsa immunologiczna Wybrane receptory komórek dendrytycznych Charakterystyka limfocytów T Wybrane cytokiny produkowane przez komórki dendrytyczne oraz limfocyty T Toksyny gronkowcowe Cel pracy Materiały i metody Materiały i metody Materiały i metody Materiał badany Szczepy archeonów halofilnych Antygeny bakteryjne Podłoża do hodowli archeonów halofilnych – <i>Halobacteria medium</i> (HBM)	30 45 47 50 51 52 53 57 57 57 57 57

III.1.6.	Surowice	. 59		
III.1.7.	Bufory i roztwory	. 59		
III.1.7.1	.Bufory do testu ELISA	. 60		
III.1.8.	Zestaw do separacji magnetycznej komórek odpornościowych	. 61		
III.1.9. superna	Testy ELISA do oznaczania cytokin: IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-23, TNF-α, IFN-γ w atantach pohodowlanych	. 61		
III.1.10.	Odczynniki chemiczne	. 62		
III.1.11.	Przeciwciała do cytometrii przepływowej – BD Bioscience, Pharmingen	. 64		
III.1.12.	Odczynniki do mikroskopii fluorescencyjnej	. 64		
III.1.13.	Materiały jednorazowe oraz materiały plastikowe	. 65		
III.1.14.	Sprzęt laboratoryjny	. 65		
III.1.15.	Oprogramowanie	. 66		
111.2.	Metody	. 67		
III.2.1.	Hodowla archeonów halofilnych	. 67		
III.2.2.	Przygotowanie zawiesin archeonów halofilnych do stymulacji komórek dendrytycznych	. 67		
III.2.3. płytkow	Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) z kożuszków leukocytarno- vych metodą różnicowego wirowania w gradiencie gęstości	. 68		
III.2.4. magnet	Izolacja monocytów CD14 ⁺ z frakcji PBMC z wykorzystaniem metody pozytywnej separacji ycznej	. 68		
III.2.5. magnet	Izolacja limfocytów CD4 ⁺ z frakcji CD14 ⁻ z wykorzystaniem metody pozytywnej separacji ycznej	. 69		
III.2.6. magnet	Izolacja limfocytów dziewiczych z frakcji CD14 ⁻ z wykorzystaniem metody negatywnej separacji ycznej	. 70		
III.2.7. magnet	Izolacja limfocytów pamięci z frakcji CD14 ⁻ z wykorzystaniem metody negatywnej separacji ycznej	. 71		
III.2.8.	Otrzymanie ludzkich komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego	. 71		
III.2.9.	Stymulacja komórek dendrytycznych archeonami halofilnymi	. 72		
III.2.10. aureus	Stymulacja komórek dendrytycznych archeonami halofilnymi w obecności enterotoksyny B S. (SEB)	. 72		
III.2.11. pamięci	Przygotowanie limfocytów T CD4 ⁺ , limfocytów T dziewiczych (CD4 ⁺ CD45RA ⁺) oraz limfocytów T i (CD4 ⁺ CD45RO ⁺)	. 72		
III.2.12. autolog (CD4 ⁺ CI	Ko-hodowla stymulowanych archeonami halofilnymi i/lub superantygenem SEB KD z icznymi limfocytami T CD4 ⁺ , limfocytami T dziewiczymi (CD4 ⁺ CD45RA ⁺) lub limfocytami T pamięci D45RO ⁺)	. 73		
III.2.13. fluoresc	Ocena obecności archeonów halofilnych wewnątrz KD z wykorzystaniem mikroskopii cencyjnej	. 73		
III.2.14. Ocena stopnia kondensacji oraz fragmentacji chromatyny KD z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej				

III.2.15. Ocena jednoniciowych oraz dwuniciowych pęknięć DNA KD z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej
III.2.16. Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych komórek dendrytycznych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej
III.2.17. Schemat analizy ekspresji receptorów powierzchniowych na powierzchni komórek dendrytycznych
III.2.18. Ilościowe oznaczanie cytokin za pomocą testów ELISA
III.2.19. Ocena cyklu komórkowego komórek dendrytycznych metodą cytometrii przepływowej
III.2.20. Ocena KD ulegających apoptozie lub nekrozie metodą cytometrii przepływowej
III.2.21. Analiza statystyczna wyników81
IV. Wyniki
IV.1. Charakterystyka oddziaływania archeonów halofilnych <i>Hrd. rudnickae</i> lub <i>N. salaciae</i> z ludzkimi komórkami dendrytycznymi [Wyniki oryginalne, nieopublikowane]
IV.1.1. Ocena obecności archeonów halofilnych wewnątrz KD82
IV.1.2. Ocena stopnia kondensacji i fragmentacji chromatyny KD stymulowanych archeonami halofilnymi
IV.1.3. Ocena obecności jednoniciowych pęknięć DNA w KD stymulowanych archeonami halofilnymi
IV.1.4. Ocena obecności dwuniciowych pęknięć DNA w KD stymulowanych archeonami halofilnymi
IV.1.5. Analiza cyklu komórkowego KD stymulowanych archeonami halofilnymi
IV.1.6. Ocena odsetka KD stymulowanych archeonami halofilnymi będących w stanie apoptozy lub nekrozy
 IV.2. Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych stymulowanych archeonami halofilnymi <i>Hrd. rudnickae</i> lub <i>N. salaciae</i> oraz wytwarzania wybranych cytokin [Publikacja 2 oraz wyniki oryginalne, nieopublikowane]
IV.2.1. Określenie optymalnej proporcji archeonów halofilnych użytych do stymulacji KD [Publikacja 2]
IV.2.2. Ekspresja receptorów powierzchniowych na KD stymulowanych archeonami halofilnymi [Publikacja 2]
IV.2.3. Produkcja cytokin przez KD stymulowane archeonami halofilnymi [Publikacja 2]
IV.2.4. Porównanie zdolności archeonów halofilnych, w formie żywych drobnoustrojów lub lizatów komórkowych, do stymulacji KD [Wyniki oryginalne, nieopublikowane]
IV.3. Ocena odpowiedzi cytokinowej limfocytów T CD4 ⁺ w ko-hodowlach z komórkami dendrytycznymi stymulowanymi archeonami halofilnymi <i>Hrd. rudnickae</i> lub <i>N. salaciae</i> [Publikacja 2] 101
IV.3.1. Produkcja IFN-γ oraz IL-13 w ko-hodowli autologicznych limfocytów T CD4 ⁺ z KD stymulowanymi archeonami halofilnymi
IV.3.2. Produkcja IFN-γ i IL-13 w ko-hodowli autologicznych limfocytów T dziewiczych CD4 ⁺ lub autologicznych limfocytów T pamięci CD4 ⁺ z KD stymulowanymi archeonami halofilnymi
IV.4. Ocena właściwości protekcyjnych archeonów halofilnych <i>Hrd. rudnickae</i> lub <i>N. salaciae</i> wobec komórek dendrytycznych, przeciwko genotoksycznemu działaniu enterotoksyny B <i>S. aureus</i> (SEB) jako superantygenu. [Wyniki oryginalne, nieopublikowane]

IV.4.1. Ocena stopnia kondensacji oraz fragmentacji chromatyny w jądrze KD w wyniku stymulacji SEB 115
IV.4.2. Ocena protekcyjnego działania archeonów halofilnych przed jednoniciowymi pęknięciami DNA w KD wywołanymi przez SEB117
IV.4.3. Ocena protekcyjnego działania archeonów halofilnych przed dwuniciowymi pęknięciami DNA w KD wywołanymi przez SEB
IV.4.4. Analiza cyklu komórkowego KD stymulowanych archeonami halofilnymi w środowisku SEB 120
IV.4.5. Ocena apoptozy lub nekrozy KD stymulowanych archeonami halofilnymi w środowisku superantygenu SEB
IV.5. Ocena wpływu archeonów halofilnych, Hrd. rudnickae lub N. salaciae, na zdolność tworzenia synapsy immunologicznej oraz aktywacji limfocytów T CD4+ przez komórki dendrytyczne w środowisku SEB. [Wyniki oryginalne, nieopublikowane]
IV.5.1. Ekspresja receptorów na powierzchni KD stymulowanych archeonami halofilnymi w obecności SEB
IV.5.2. Produkcja cytokin przez KD stymulowane archeonami halofilnymi w środowisku SEB125
V. Podsumowanie wyników uzyskanych w ramach realizacji celów szczegółowych pracy doktorskiej
VI. Dyskusja
VII. Streszczenie w języku polskim141
VIII. Streszczenie w języku angielskim143
IX. Bibliografia145
Oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach162

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej łączącej dwa artykuły opublikowane z wynikami oryginalnymi nieopublikowanymi

 Natalia Adamiak, Krzysztof T. Krawczyk, Camille Locht, Magdalena Kowalewicz-Kulbat. Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development. Frontiers in Immunology. 2021 Sep 10;12:746235. doi: 10.3389/fimmu.2021.746235

IF: 8,787 (2021), Punktacja MEiN: 140pkt

 Krzysztof T. Krawczyk, Camille Locht, Magdalena Kowalewicz-Kulbat. Halophilic Archaea Halorhabdus Rudnickae and Natrinema Salaciae Activate Human Dendritic Cells and Orient T Helper Cell Responses. Frontiers in Immunology. 2022 May 26;13:833635. doi: 10.3389/fimmu.2022.833635

IF: 8,787 (2021), Punktacja MEiN: 140pkt

Łączny IF: 17,574 Łączna liczba punktów MEiN: 280pkt

Wartość IF oraz punktację MEiN podano zgodnie z rokiem opublikowania pracy

Wykaz pozostałych publikacji naukowych

 M Fol, M Włodarczyk, M Kowalewicz-Kulbat, Druszczyńska M, KT Krawczyk, S Wawrocki, W Rudnicka, M Chmiela. Mycobacterium bovis Wild-Type BCG or Recombinant BCG Secreting Murine IL-18 (rBCG/IL-18) Strains in Driving Immune Responses in Immunocompetent or Immunosuppressed Mice. Vaccines (Basel). 2022 Apr 14;10(4):615. doi: 10.3390/vaccines10040615.

IF: 4,961 (2021); Punktacja MEiN: 140pkt

 M Wawrzyniak, D Groeger, R Frei, R Ferstl, P Wawrzyniak, K Krawczyk, B Pugin, W Barcik, P Westermann, A Dreher, M Scharl, M Jutel, CA. Akdis, L O'Mahony. Spermidine and spermine exert protective effects within the lung. Pharmacol Res Perspect. 2021 Aug; 9(4): e00837.

IF: 2,963 (2021); Punktacja MEiN: 70pkt

 M Kowalewicz-Kulbat, P Szpakowski, KT Krawczyk, ML Kowalski, S Kosinski, F Biet, W Rudnicka, C Locht. Decrease of IL-5 Production by Naive T Cells Cocultured with IL-18-Producing BCG-Pulsed Dendritic Cells from Patients Allergic to House Dust Mite. Vaccines (Basel). 2021 Mar 18;9(3):277. doi: 10.3390/vaccines9030277.

IF: 4,961 (2021); Punktacja MEiN: 140pkt

4. P Wawrzyniak, K Krawczyk, S Acharya, G Tan, M Wawrzyniak, E Karouzakis, A Dreher, B Jakiela, C Altunbulakli, M Sanak, L O'Mahony, K Nadeau, CA Akdis. Inhibition of CpG methylation improves the barrier integrity of bronchial epithelial cells in asthma. Allergy. 2021 Jun;76(6):1864-1868. doi: 10.1111/all.14667.

IF: 13,146 (2020); Punktacja MEiN: 140pkt

5. B Steelant, P Wawrzyniak, K Martens, AC Jonckheere, B Pugin, R Schrijvers, DM Bullens, JA Vanoirbeek, K Krawczyk, A Dreher, CA Akdis, PW Hellings. *Blocking histone deacetylase activity as a novel target for epithelial barrier defects in patients with allergic rhinitis.* J Allergy Clin Immunol. 2019 Nov;144(5):1242-1253.e7. doi:10.1016/j.jaci.2019.04.027.

IF: 10,228 (2019); Punktacja MEiN: 200pkt

 Kowalewicz-Kulbat M, Szpakowski P, Locht C, Biet F, Kaplonek P, Krawczyk KT, Pestel J, Rudnicka W. Tuberculin skin test reaction is related to memory, but not naive CD4⁺ T cell responses to mycobacterial stimuli in BCG-vaccinated young adults. Vaccine. 2018 Jul 16;36(30):4566-4577

IF: 3,269 (2018); Punktacja MEiN: 30pkt

 Barcik W, Pugin B, Brescó MS, Westermann P, Rinaldi A, Groeger D, Van Elst D, Sokolowska M, Krawczyk K, Frei R, Ferstl R, Wawrzyniak M, Altunbulakli C, Akdis CA, O'Mahony L. *Bacterial secretion of histamine within the gut influences immune responses within the lung*. Allergy. 2019 May;74(5):899-909. doi: 10.1111/all.13709.

IF: 6,771 (2018); Punktacja MEiN: 45pkt

 Kowalewicz-Kulbat M, Ograczyk E, Krawczyk K, Rudnicka W, Fol M. Type of monocyte immunomagnetic separation affects the morphology of monocyte-derived dendritic cells, as investigated by scanning electron microscopy. J Immunol Methods. 2016 Dec;439:79-82.

IF: 2,100 (2016); Punktacja MEiN: 25pkt

 M Kowalewicz-Kulbat, E Ograczyk, M Włodarczyk, K Krawczyk, M Fol. Efficiency and Impact of Positive and Negative Magnetic Separation on Monocyte Derived Dendritic Cell Generation. Iran J Immunol. 2016 Jun;13(2):132-40.

IF: 0,850 (2016) ; Punktacja MEiN: 15pkt

IF opublikowanych prac: 49,249 Punktacja MEiN opublikowanych prac: 805pkt

Wartość IF oraz punktację MEiN podano zgodnie z rokiem opublikowania pracy

Łączny IF wszystkich opublikowanych prac: 66,823 Łączna punktacja MEiN wszystkich opublikowanych prac: 1085pkt

Komunikaty zjazdowe

Międzynarodowe

- K. Krawczyk, P. Sicińska, M. Kowalewicz-Kulbat. Halophilic archaea Halorhabdus rudnickae and Natrinema salaciae interact with human monocyte-derived dendritic cells. World Immune Regulation Meeting (WIRM) XVI, Davos, Szwajcaria. 6-9.07.2022
- 2. **Krawczyk K**, Juszczyk Z, Okła E, Kowalewicz-Kulbat M. *Halotherapy as an alternative treatment in medicine*. 3rd Wroclaw Scientific Meetings, Wrocław 1-2.03.2019.
- 3. **Krawczyk K**, Juszczyk Z, Okła E, Kowalewicz-Kulbat M. *Biotechnological impact of carotenoids produced by halophilic archaea*. 3rd Wrocław Scientific Meetings, Wrocław 1-2.03.2019.
- 4. **Krawczyk K**, Juszczyk Z, Okła E, Kowalewicz-Kulbat M. *Diversity of halophilic archaea in food and its link to human microbiome*. 3rd Wroclaw Scientific Meetings, Wrocław 1-2.03.2019.
- Steelant B, Wawrzyniak P, Martens K, Jonckheere AC, Krawczyk K, Bullens D, Schrijvers R, Akdis CA, Hellings PW. *Blocking Histone Deacetylase Activity As A Novel Target For Epithelial Barrier Defects In Allergic Rhinitis*. 2019 AAAAI Annual Meeting, San Francisco 22-25.02.2019.
- Kowalewicz-Kulbat M, Krawczyk K, Włodarczyk M, Druszczyńska M, Rudnicka W, Fol M. Effect of BCG and rBCGmIL-18 on central and effector memory T cells in C57BL/6 mice in the model of immunosuppression induced by cyclophosphamide. 5th European Congress of Immunology (ECI) 2018, Amsterdam 2-5.09.2018
- Krawczyk K, Bekier A, da Costa MS, Albuqueque L, Kowalewicz-Kulbat M. *Phenotype of monocyte-derived dendritic cells in response to halophilic archaea Halorhabdus rudnickae and Natrinema salaciae*. 5th European Congress of Immunology (ECI) 2018, Amsterdam 2-5.09.2018
- 8. Juszczyk Z, **Krawczyk K**, Bekier A, Kowalewicz-Kulbat M. Archaea unique components of human microbiome. 4th International Conference of Cell Biology, Kraków, 11-12.05.2018
- 9. Wawrzyniak M, Groeger D, Frei R, Ferstl R, Wawrzyniak P, **Krawczyk K**, Pugin B, Barcik W, Westermann P, Akdis C, O'Mahony L. *Oral gavage of spermine and spermidine reduces HDM-induced lung allergic inflammation.* World Immune Regulation Meeting (WIRM) XII, Davos, 14-17.03.2018
- Steelant B, Wawrzyniak P, Martens K, Krawczyk K, Dreher A, Hellings PW, Akdis CA. Blocking histone deacetylase activity as a novel treatment for epithelial barrier dysfunction in allergic rhinitis and asthma. World Immune Regulation Meeting (WIRM) XII, Davos, 14-17.03.2018

- Wawrzyniak P, Krawczyk K, Giner FC, Wawrzyniak M, Karouzakis E, Jakiela B, Tan G, Altunbulakli C, Sanak M, O'Mahony L, Akdis CA. *Inhibition of CpG methylation improve the barrier integrity of bronchial epithelial cells in asthma*. World Immune Regulation Meeting (WIRM) XII, Davos, 14-17.03.2018
- 12. Bekier A, Wijatkowska A, **Krawczyk K**, da Costa MS, Kowalewicz-Kulbat M. *Immune* activitiy of halophilic archaeon Halorhabdus rudnickae, isolated from a salt mine borehole in Poland, on monocytes from healthy donors. *MIKROBIOT* 2017, Łódź, 19-21.09.2017
- 13. **Krawczyk K**, Bekier A, Wijatkowska A, da Costa MS, Kowalewicz-Kulbat M. Impact of halophilic archaeal strains of Halorhabdus rudnickae, isolated from polish salt mine, on expression of Surface receptors on human monocyte derived dendritic cells. MIKROBIOT 2017, Łódź, 19-21.09.2017
- 14. Kowalewicz-Kulbat M, Krawczyk K, Bekier A, Ograczyk E, Włodarczyk M, Druszczyńska M, Rudnicka W, Fol M. Central and effector memory T cell response in C57BL/6 mice immunized with Mycobacterium bovis BCG in the model of immunosuppression induced by cyclophosphamide. MIKROBIOT 2017, Łódź, 19-21.09.2017
- 15. Bekier A, Wijatkowska A, **Krawczyk K**, Kowalewicz-Kulbat M. *The interaction of human monocytes and lymphocytes with selected halophilic archaea, isolated from the Polish salt mine*. YRLS Young Researchers in Life Science, Paryż, 15-17.05.2017
- 16. **Krawczyk K**, Fol M, Druszczyńska M, Włodarczyk M, Rudnicka W, Ograczyk E, Wawrocki S, Kowalewicz-Kulbat M. *Characteristics of memory T lymphocytes isolated from immunized with Mycobacterium mice in the model of cyclophosphamide-induced immunosuppression*. Bio Chem Med Session, Gdańsk 25-27.11.2016

<u>Krajowe</u>

- K Krawczyk, C Locht, D Rybaczek, P Sicińska, M Kowalewicz-Kulbat. Odpowiedź komórkowa na archeony halofilne Halorhabdus rudnickae i Natrinema salaciae prezentowane przez komórki dendrytyczne osób zdrowych. XXI Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Alergia Astma Immunologia Kliniczna, Łódź. 23-25.06.2022
- K Krawczyk, D Rybaczek, P Sicińska, M Kowalewicz-Kulbat. Aktywność komórek dendrytycznych w odpowiedzi na stymulację archeonami halofilnymi w środowisku enterotoksyny B (SEB) Stapylococcus aureus. V Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, Łódź. 10.06.2022
- 3. A Pyrzanowska, M Mucha, **K Krawczyk**, P Sicińska, M Kowalewicz-Kulbat. *Cykl komórkowy i apoptoza monocytów oraz komórek dendrytycznych stymulowanych archeonami halofilnymi w środowisku enterotoksyny B Staphylococcus aureus (SEB)*. BioOpen 2021, Łódź. 15-16.04.2021
- 4. **K Krawczyk**, M Kowalewicz-Kulbat. Archeony halofilne Halorhabdus rudnickae oraz Natrinema salaciae – indukują ekspresję receptorów powierzchniowych oraz produkcję cytokin przez komórki dendrytyczne. BioOpen 2021, Łódź. 15-16.04.2021

- 5. **K Krawczyk**, E Okła, Z Juszczyk, M Kowalewicz Kulbat. *Odpowiedź dziewiczych limfocytów T CD4+ na stymulowane archeonami halofilnymi komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego osób zdrowych*. III Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego. 7.06.2019
- Juszczyk Z, Krawczyk K, Kowalewicz-Kulbat M. Produkcja IFN-gamma przez ludzkie limfocyty stymulowane antygenami archeonów halofilnych Halorhabdus rudnickae i Natrinema salaciae prezentowanymi przez monocyty. XI Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2019, Lublin 23-24.03.2019
- 7. **Krawczyk K,** Knioła K, Interewicz E, Bekier A, Kowalewicz-Kulbat M. *Fenotyp* komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego w odpowiedzi na antygeny archeonów halofilnych. II Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, Łódź 8.06.2018.
- Kowalewicz-Kulbat M, Szpakowski P, Krawczyk K, Kosiński S, Kowalski ML, Biet F, Rudnicka W. Immunomodulacyjne działanie prątków M. bovis BCG na odpowiedź cytokinową limfocytów T dziewiczych i pamięci chorych z astmą uczulonych na roztocza kurzu domowego. Mikrobiologia w Medycynie, Przemyśle i Ochronie Środowiska – III edycja, Łódź, 24-25.10.2015
- Agier J, Marciniak M, Aleksandrowicz P, Cieśliński Ł, Krawczyk K, Brzezińska-Błaszczyk E. Ocena mikroflory kieszonek dziąsłowych u pacjentów z zapaleniem tkanek wokół implantu (periimplantitis). Mikrobiologia w Medycynie, Przemyśle i Ochronie Środowiska – III edycja, Łódź, 24-25.10.2015
- Krawczyk K, Szczepanik A, Kosiński S, Kowalski ML, Kowalewicz-Kulbat M. Prątki M. bovis jako stymulator produkcji chemokiny CXCl10/IP10 przez komórki dendrytyczne w astmie alergicznej. III Studencka Konferencja Biologii Molekularnej Biofuzje, Warszawa, 22-24.05.2015
- 11. **Krawczyk K**, Lenart D. *Tejksobaktyna początek nowej ery antybiotyków?* IV Konferencja Biologii Molekularnej; Łódź, 26-28.03.2015
- Ograczyk E, Krawczyk K, Grela K., Bialik P., Druszczyńska M., Fol M., Kowalewicz-Kulbat M. Odpowiedź proliferacyjna splenocytów i komórek węzłów chłonnych myszy C57BL/6 w modelu immunosupresji wywołanej działaniem cyklofosfamidu (CTX). IV Wrocławska Konferencja Studentów Nauk Technicznych i Ścisłych Puzzel; Wrocław, 18-19.03.2015

Nagrodzone komunikaty zjazdowe:

- K. Krawczyk, P. Sicińska, M. Kowalewicz-Kulbat. Halophilic archaea Halorhabdus rudnickae and Natrinema salaciae interact with human monocyte-derived dendritic cells. World Immune Regulation Meeting (WIRM) XVI, Davos, Szwajcaria. 6-9.07.2022 – TRAVEL GRANT ufundowany przez European Journal of Immunology
- K Krawczyk, C Locht, D Rybaczek, P Sicińska, M Kowalewicz-Kulbat. Odpowiedź komórkowa na archeony halofilne Halorhabdus rudnickae i Natrinema salaciae prezentowane przez komórki dendrytyczne osób zdrowych. XXI Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Alergia Astma Immunologia Kliniczna, Łódź. 23-25.06.2022 – NAJLEPSZE WYSTĄPIENIE USTNE
- 3. K Krawczyk, D Rybaczek, P Sicińska, M Kowalewicz-Kulbat. Aktywność komórek dendrytycznych w odpowiedzi na stymulację archeonami halofilnymi w środowisku enterotoksyny B (SEB) Stapylococcus aureus. V Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego, Łódź. 10.06.2022 – NAJLEPSZE WYSTĄPIENIE USTNE
- 4. K Krawczyk, M Kowalewicz-Kulbat. Archeony halofilne Halorhabdus rudnickae oraz Natrinema salaciae – indukują ekspresję receptorów powierzchniowych oraz produkcję cytokin przez komórki dendrytyczne. BioOpen 2021, Łódź. 15-16.04.2021 – WYRÓŻNIENIE

Staże zagraniczne:

 12 miesieczny staż naukowy w Swiss Institute of Allergy and Asthma Research (SIAF), Davos, Szwajcaria

Źródła finansowania

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały sfinansowane z następujących źródeł:

- 1. Projekt PRELUDIUM 14 finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki: "Opracowanie modelu wykorzystania drobnoustrojów halofilnych prezentowanych przez komórki dendrytyczne jako modulatora odpowiedzi immunologicznej w reakcjach zapalnych". 2017/27/N/NZ6/02850, kierownik projektu
- Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich przyznana przez Dziekana Wydziału BiOŚ w 2018 r. Temat: "Odpowiedź dziewiczych limfocytów T na antygeny archeonów halofilnych prezentowanych przez komórki dendrytyczne" – kierownik projektu
- 3. Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich przyznana przez Dziekana Wydziału BiOŚ w 2019 r. Temat: "Wpływ wybranych szczepów archeonów halofilnych na cykl komórkowy monocytów i komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego w środowisku enterotoksyny B S. aureus (SEB)" kierownik projektu





Wykaz skrótów

- APC ang. *antigen-presenting cells*, komórki prezentujące antygen
- BSA ang. *bovine serum albumin*, surowicza albumina wołowa
- CD ang. cluster of differentiation, kompleks różnicowania
- CFU ang. colony forming unit, jednostka tworząca kolonię
- cRPMI ang. complete Roswell Park Memorial Institute-1640 medium, podłoże RPMI-1640 zawierające 10% inaktywowanej termicznie surowicy bydlęcej oraz 1% antybiotyków
- CTLA-4 ang. cytotoxic T cell antigen 4, antygen-4 limfocytów cytotoksycznych T
- DAPI ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole, 4',6-diamidyno-2-fenyloindol
- DC ang. *dendritic cells*, komórki dendrytyczne (KD)
- DC-SIGN ang. Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin, swoista dla komórek dendrytycznych nieintegryna wiążąca ICAM-3
- DPANN nadtyp w taksonomii archeonów, nazwa pochodzi od nazw typów składających się na ten nadtyp (*Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota,* Nanohaloarchaeota, Nanoarchaeota)
- DSB ang. *double-stranded breaks*, dwuniciowe pęknięcia DNA
- EDTA ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*, wodny roztwór kwasu etylenodiaminotetraoctowego
- ELISA ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*, immunoenzymatyczny test fazy stałej
- FBS ang. fetal bovine serum, płodowa surowica bydlęca
- FITC ang. *fluorescein isothiocyanate*, izotiocyjanian fluoresceiny
- FSC ang. forward-scattered light, światło rozproszone równolegle do wiązki lasera
- GM-CSF ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
- GVNP ang. gas vesicle nanoparticles, pęcherzyki gazowe
- HBM ang. *Halobacteria medium*, podłoże do hodowli drobnoustrojów halofilnych, por. III.1.4.

- HRM ang. horseradish peroxidase, peroksydaza chrzanowa
- ICAM ang. intercellular adhesion molecule, cząsteczka adhezji międzykomórkowej
- IFN ang. *interferon*, interferon
- IL ang. *interleukin*, interleukina
- LFA ang. *leukocyte function-associated antigen*, antygen powiązany z funkcjami leukocytów
- LPS ang. *lipopolysaccharide*, lipopolisacharyd
- MHC ang. major histocompatibility complex, główny układ zgodności tkankowej
- Mo-DC ang. *monocyte-derived dendritic cells*, komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego
- PAMP ang. *pathogen-associated molecular patterns*, wzorce molekularne związane z patogenami
- PBMC ang. peripheral blood mononuclear cell, jednojądrzaste komórki krwi obwodowej
- PBS ang. *phosphate buffered saline*, buforowana fosforanem sól fizjologiczna
- PD-1 ang. programmed death receptor 1, receptor programowanej śmierci 1
- PE ang. *phycoerythrin*, fikoerytryna
- PI ang. *propidium iodide*, jodek propidyny
- PRR ang. pattern recognition receptors, receptory rozpoznające wzorce
- rGM-CSF ang. recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, rekombinowany ludzki czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
- rIL-4 ang. *recombinant human interleukine-4*, rekombinowana ludzka interleukina-4
- SEB ang. *Staphylococcal enterotoxin B*, enterotoksyna gronkowcowa typu B, superantygen SEB
- SSB ang. single-stranded breaks, jednoniciowe pęknięcia DNA
- SSC ang. side-scattered light, światło rozproszone prostopadle do wiązki lasera

- TACK nadtyp w taksonomii archeonów, nazwa pochodzi od nazw typów składających się na ten nadtyp (*Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota*)
- TCR ang. *T-cell receptor*, receptor limfocytu T
- TLR ang. *toll-like receptors*, receptory *toll*-podobne
- TMB ang. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 3,3',5,5'- tetrametylobenzydyna
- TNF ang. *tumor necrosis factor*, czynnik martwicy nowotworów

I. Wprowadzenie

I.1. Odkrycie archeonów oraz ich podział taksonomiczny

Archaea to domena jednokomórkowych, pozbawionych jądra komórkowego organizmów żywych, posiadających unikalne cechy odróżniające je od bakterii oraz eukariontów [1, 2]. Pierwotnie, archeony wraz z bakteriami opisywane były jako jedna grupa – Monera [3], jednak wyniki badań prowadzonych przez Woese i Fox w 1977 r. stały się podstawą do rozdzielenia tych organizmów na poziomie taksonomicznym [4]. Na podstawie badań filogenetycznych 16S rRNA (u prokariontów) i 18S rRNA (u eukariontów) zaproponowano drzewo filogenetyczne obejmujące trzy grupy: 1. "typowe bakterie", 2. eukarionty, oraz 3. "bakterie" metanogenne [4]. W 1990 Woese i wsp. zaproponowali ostateczny podział organizmów żywych na trzy domeny: Eukarya, Bacteria oraz Archaea [5, 6]. Rozwój technik biologii molekularnej (m.in. sekwencjonowanie całych genomów czy badanie niehodowalnych drobnoustrojów) [1] pozwolił na nowe podejście do klasycznego drzewa filogenetycznego. Obecny podział wskazuje na dwie dominujące linie ewolucyjne [1]. Pierwsza obejmuje bakterie oraz organizmy wchodzące w skład nowo proponowanej grupy *Candidate Phyla Radiation* (obecnie brak polskiej nazwy). Druga linie stanowia archeony oraz eukarionty, które według tej systematyki, stanowią odgałęzienie od głównej grupy Archaea [1]. Podział ten, zaprezentowany na Rycynie 1 [Ryc. 1.], odzwierciedla stopień podobieństwa genetycznego organizmów żywych [1].

Obecnie archeony są podzielone na trzy nadtypy (*superphylum*) – Asgard, DPANN (od nazwy typów składających się na nadtyp: *Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanohaloarchaeota, Nanoarchaeota*) i TACK (od nazwy typów składających się na nadtyp: *Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota, Korarchaeota*) oraz jeden typ (*phylum*) – *Euryarchaeota* [6, 7].



Ryc. 1. Drzewo życia. Jedna z metod oceny filogenetycznego podobieństwa organizmów żywych, opierająca się na podobieństwie genetycznym. Domeny Archaea oraz Bacteria są od siebie oddzielone, natomiast domena Eukarya jest opisana jako "gałąź" domeny Archaea. Wprowadzono pojęcie nowej domeny – Candidate Phyla Radiation [1].

Archeony stanowią interesującą dla naukowców domenę z kilku powodów. Są one istotnym obiektem badań związanych z pochodzeniem życia na Ziemi oraz wzajemnych powiązań między trzema domenami organizmów żywych. Ponadto, archeony są określane mianem "ekstremofili", czyli organizmów zdolnych do życia w ekstremalnych warunkach środowiska. Mimo, że nie wszystkie ekstremofile to archeony (oraz nie wszystkie drobnoustroje z domeny *Archaea* to ekstremofile), to stanowią one dominujące organizmy żyjące w skrajnie niekorzystnych ekosystemach. Archeony stanowią również interesujący obiekt badań biotechnologów, m.in. ze względu na wytwarzanie enzymów zdolnych do działania w wysokiej temperaturze, czy astrobiologów poszukujących cech drobnoustrojów mogących stanowić dowód życia poza Ziemią [2].

I.2. Budowa i podział archeonów

Archeony (*Archaea*) są jednokomórkowymi drobnoustrojami, morfologicznie zbliżonymi do bakterii [8] – komórki mogą występować pojedynczo lub w większych grupach, a ich kształt może przybierać formy kuliste, cylindryczne, spiralne lub nieregularne. Średnica oraz długość komórek archeonów są również zbliżone do bakteryjnych i wynoszą, odpowiednio 0,1-15 μm i 0,1-20 μm [8]. Archeony łączą w sobie cechy bakterii oraz eukariontów. Analiza genów związanych z replikacją, transkrypcją oraz translacją u *Archaea* wykazała podobieństwo do tych występujących u *Eukarya*, natomiast geny związane z procesami metabolicznymi są bardziej zbliżone do *Bacteria* [9]. Najważniejsze różnice między domenami *Archaea* oraz *Bacteria* i *Eukarya* zostały zebrane w Tabeli 1 [Tabela 1.]. Drobnoustroje z domeny *Archaea* charakteryzuje się również zestawem unikalnych cech, których nie posiadają inne organizmy, m.in.: odrębnym rodzajem flageliny – archaellum [10], zdolnością do metanogenezy [11] czy brakiem gatunków patogennych [7, 12].

Pośród drobnoustrojów z domeny *Archaea*, można wyróżnić 4 grupy, podzielone według ich unikalnych cech biochemicznych oraz wymagań środowiskowych [13]:

- Archeony metanogenne (metanogeny) drobnoustroje zamieszkujące głównie środowiska beztlenowe, które posiadają zdolność produkcji metanu ze związków zawierających węgiel (przede wszystkim CO₂)
- Archeony halofilne (halofile) drobnoustroje żyjące w warunkach bardzo wysokiego zasolenia m.in. w salinach, czy naturalnych słonych jeziorach

- Thermococcales archeony obligatoryjnie beztlenowe oraz hipertermofilne (optymalna temperatura wzrostu może przekraczać 80°C), bytujące głównie w źródłach termalnych oraz kominach hydrotermalnych
- Sulfolobales organizmy tlenowe, termofilne i acidofilne (optymalna temperatura wzrostu wynosi między 70 a 85°C, natomiast optymalne pH to 2,0-3,0) izolowane m.in. z gorących źródeł w Parku Narodowym Yellowstone

Cecha	Bacteria	Archaea	Eukarya
Jądro komórkowe	dro komórkowe Brak Brak		Obecne
Organelle komórkowe	Brak	Brak	Obecne
Introny spliceosomowe	Brak	Brak	Obecne
Kształt chromosomu	talt chromosomu Kolisty i liniowy Kolisty		Liniowy
Operony	Obecne	Obecne	Rzadkie
Polimeraza RNA	Bakteryjna	Zbliżona do eukariotycznej	Eukariotyczna
Polimeraza DNA	Polimeraza DNA Bakteryjna Zbliżona do eukariotycznej		Eukariotyczna
Typ rybosomów	oosomów 70S 70S		80S
Początek translacji (aminokwas)	Początek translacji Formylometionina Metionina		Metionina
Histony	Brak	Obecne	Obecne
Peptydoglikan	Tak	Brak, pseudo-peptydoglikan u niektórych	Brak
Ruchliwość	Flagelina bakteryjna	Archaellum	Flagelina eukariotyczna
Lipopolisacharyd	Obecny	Brak	Brak
Lipidy blonowe	Wiązania estrowe	Wiązania eterowe	Wiązania estrowe
Metanogeneza	Metanogeneza Brak Obecna		Brak
Fotosynteza tlenowa	Obecna	Brak	Obecna
Formy przetrwalne	Formy przetrwalne Obecne Brak		Obecne
Patogenność dla człowieka Istnieje		Brak	Istnieje

Tabela 1. Różnice między domenami Bacteria, Archaea oraz Eukarya. Opracowano na podstawie [7].

I.2.1. Struktury zewnątrzkomórkowe u Archaea

U wielu przedstawicieli domeny *Archaea* występują unikalne struktury zewnątrzkomórkowe, które pełnią istotną rolę m.in.: w adhezji, tworzeniu biofilmu czy poruszaniu się drobnoustrojów [8, 14].

Wiele gatunków archeonów wykazuje zdolność do chemo- oraz fototaksji. W celu odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska, archeony wykształciły specyficzne organelle umożliwiające ruch zwane archaellami [15]. Archaellum jest szeroko rozpowszechnione wśród drobnoustrojów z domeny Archaea – obserwowano je zarówno wśród organizmów metanogennych, halofili, termofili czy termoacydofili [15]. Jest to białkowa struktura w kształcie prawoskrętnej helisy, zbudowana z rdzenia oraz filamentu [8, 14]. Mimo morfologicznego podobieństwa do bakteryjnych rzęsek, archaellum jest całkowicie odrębną strukturą – w genomie archeonów nie zidentyfikowano żadnego genu powiązanego z bakteryjnymi rzęskami [16]. Zaobserwowano również, że główne białka filamentu archaellum syntetyzowane sa w formie prebiałek, z krótkimi fragmentami sygnałowymi, które są usuwane przed przyłączeniem białek do struktury filamentu. Podobnego mechanizmu nie zaobserwowano w przypadku rzęsek bakteryjnych [16]. Wykazano natomiast wysoki poziom homologii między białkami budującymi bakteryjne pile typu IV, a białkami występującymi w archaellum zwanymi archaelinami [8]. Oprócz ruchu, archaellum może brać również udział w adhezji archeonów do innych komórek, a w konsekwencji do powstawania biofilmów [8].

Kolejną strukturą zewnątrzkomórkową archeonów są pile, powodujące agregację komórek oraz tworzenie struktur biofilmu [8]. Jest to struktura zbliżona do pili bakteryjnych typu IV, ale posiadająca własną, unikalną strukturę [15] – dwie podjednostki tworzące pile są upakowane w formie helis i/lub pierścieni [8].

Ciekawą i unikalną strukturą zewnątrzkomórkową archeonów są organelle przypominające haczyki opisane w nomenklaturze jako *hamus* (łac. hak, haczyk na ryby; l.m. *hami*) [17]. Ich obecność opisano u archeonów (ziarniaki o średnicy 0,6 µm) wyizolowanych z wody z zimnych (około 10°C), siarkowych bagien [17]. "Haczyki" opisano jako struktury mające około 1 – 3 µm długości, 7 – 8 nm szerokości, przypominające wyglądem drut kolczasty, które są stabilne w szerokim zakresie temperatur (0 – 70°C) oraz pH (0,5 – 11,5 pH) [17]. Na ich końcach zaobserwowano "przyczepione" bakterie towarzyszące archeonom [17]. Są to struktury zaangażowane prawdopodobnie w powstawanie mieszanych biofilmów międzygatunkowych [8].

I.2.2. Ściana komórkowa, warstwa S oraz błona komórkowa u Archaea

Archeony w większości posiadają ścianę komórkową pozbawioną LPS (ang. *lipopolysaccharide*, lipopolisacharyd), a w miejsce bakteryjnego peptydoglikanu u niektórych gatunków *Archaea* występuje pseudomureina [8, 14]. W przeciwieństwie do bakteryjnego peptydoglikanu zbudowanego z kwasu N-acetylomuraminowego połączonego wiązaniami β -1,4 z D-N-acetyloglukozaminą, pseudomureina jest zbudowana z kwasu L-N-acetyltalosaminuronowego połączonego wiązaniami β -1,3 z D-N-acetyloglukozaminą [18].

Niemal u wszystkich drobnoustrojów reprezentujących domenę *Archaea* występuje zewnętrzna warstwa (warstwa S) o grubości 5-25 nm, zbudowana z białek i/lub glikoprotein charakteryzujących się dużą zawartością aminokwasów kwaśnych i hydrofobowych. Struktura ta pozwala zachować kształt komórek oraz stanowi ochronę przed środowiskiem zewnętrznym [8, 9, 14]. Niektóre archeony nie posiadają ściany komórkowej, a jedynie warstwę S, która stanowi ich jedyną warstwę ochronną [8].

Błona komórkowa archeonów, choć zbudowana z glicerofosfolipidów, podobnie jak u *Bacteria* oraz *Eukarya*, charakteryzuje się jednak niespotykaną budową. Archeony nie posiadają w swojej błonie komórkowej D-glicerolu jak inne organizmy, lecz L-glicerol [8]. Unikalną cechą *Archaea* jest obecność wiązań eterowych między glicerolem a izoprenoidami błony komórkowej, w przeciwieństwie do wiązań estrowych występujących u bakterii oraz eukariontów. Wiązania eterowe są bardziej stabilne niż wiązania estrowe, co może przekładać się na zdolność archeonów do zasiedlania ekstremalnych środowisk [7, 8, 14]. Niektóre archeony halofilne posiadają w swojej błonie komórkowej związki o barwie fioletowej, czerwonej lub purpurowej. Jednym z nich jest bakterioruberyna, czerwony barwnik z grupy karotenoidów, występujący m.in. u *Halobacterium halobium*, *Halobacterium salinarum* czy Halorubrum sodomense. W błonie komórkowej *Halobacterium halobium* występuje również bakteriorodepsyna – barwnik purpurowy [8]. W komórkach archeonów może występować również przestrzeń periplazmatyczna między błoną cytoplazmatyczną a warstwą S [8].

I.2.3. Budowa wewnętrzna oraz metabolizm Archaea

Wnętrze komórek archeonów nie jest podzielone systemem błon. Archeony nie posiadają mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego, lizosomów, czy też aparatu Golgiego [8, 14]. Budowa rybosomów archeonów również jest podobna do budowy rybosomów bakteryjnych – rybosomy występują w formie 70S zbudowane z dwóch podjednostek: dużej 50S oraz małej 30S [7, 8, 9]. Archeony nie posiadają jądra komórkowego, ani błony jądrowej. Genom archeonów ma formę kolistą i jest ściśle upakowany w formie nukleoidu [8, 9], jednak w odróżnieniu od bakterii, archeony posiadają również białka histonowe, co łączy domeny *Archaea* oraz *Eukarya* [7, 8, 9]. Ponadto, w komórkach archeonów występuje pozachromosomowy DNA w formie plazmidów [8].

Większość z dotychczas poznanych archeonów to drobnoustroje pozyskujące energię w warunkach beztlenowych [8]. Dobrze poznane są procesy występujące u archeonów metanogennych polegające na uzyskaniu energii poprzez syntezę metanu m.in. z dwutlenku węgla czy cząsteczkowego wodoru [8], a także proces odwrotny polegający na utlenieniu metanu czyli odwróconej metanogenezy [8]. Archeony wykorzystują również inne związki jako źródła energii, m.in. alkohole, octany, jabłczany, aminokwasy czy mono- oraz polisacharydy [8]. Początkowy aminokwas w białkach archeonów oraz eukariontów to metionina, w odróżnieniu od bakteryjnej N-formylometioniny [7]. Metabolizm archeonów ma znaczenie w badaniach nad tą grupą drobnoustrojów – duża część z nich to organizmy niehodowalne w warunkach laboratoryjnych [14].

I.3. Archeony jako składnik ludzkiego mikrobiomu

Organizmy eukariotyczne, oraz żyjące z nimi w ścisłej symbiozie prokarionty, oddziałują na siebie wzajemnie oraz mogą podlegać wspólnej ewolucji. Drobnoustroje kolonizujące makroorganizm stanowią *mikrobiotę*, natomiast genom mikrobioty nazywany jest *mikrobiomem* [19]. Wiele czynników, takich jak: wiek, dieta, stosowanie antybiotyków, geograficzny obszar występowania, a nawet sposób porodu, wpływa na skład mikrobiomu [20]. Każda tkanka organizmu mająca bezpośredni kontakt ze środowiskiem zewnętrznym charakteryzuje się obecnością specyficznego mikrobiomu. Z dotychczasowych badań wynika, że największa różnorodność mikroorganizmów występuje w jelitach. Wiele prac

podkreśla wyjątkową rolę tej mikrobioty w stymulacji układu odpornościowego, syntezie witamin (m.in. biotyna, tiamina, ryboflawina), produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, jak również w oddziaływaniu między mózgiem a jelitami [19, 20]. W organizmie gospodarza wyróżnia się różne drobnoustroje, stanowiące część naturalnej mikrobioty, charakterystyczne dla określonych miejsc, jak np.: w jamie ustnej – *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Actinomyces* spp.; na powierzchni oka – *Acinetobacter* spp. i *Aeribacillus* spp.; na powierzchni skóry – *Staphylococcus* spp., *Bacteroidetes, Proteobacteria*; oraz w jelitach: *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Ruminococcus* spp., *Lactobacillus* spp [19].

Archaea są to organizmy w wiekszości ekstremofilne czyli zdolne do przeżycia w skrajnych warunkach środowiska – wysokiej/niskiej temperaturze, środowisku kwasowym/zasadowym lub o wysokim stężeniu soli [21, 22]. W ostatnich latach nastąpił szereg odkryć wskazujących obecność i znaczenie archeonów w ludzkiej na mikrobiocie. W literaturze anglojęzycznej wprowadzono pojęcie "archaeome" oznaczające udział archeonów jako ważnego składnika ludzkiego mikrobiomu [7, 23]. U człowieka archeony znajdują się głównie na skórze (przedstawiciele typu Thaumarchaeota [24]) oraz w jelitach (Methanobrevibacter smithii oraz Methanosphaera stadtmanae) [7]. Archeony z różnych grup, takich jak: Methanobacteriales, Methanomassiliicoccales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales, Halobacteriales, czy przedstawiciele nadtypu DPANN stanowią składową mikrobioty człowieka [7]. Najwcześniej wyizolowane oraz wyhodowane w warunkach laboratoryjnych zostały archeony metanogenne pochodzące z mikrobioty jelita grubego: Methanobrevibacter smithii, Methanosphaera stadtmana i Methanomassiliicoccus luminyensis [23]. Wiedza na temat funkcji archeonów metanogennych w ludzkiej mikrobiocie jest nadal niewystarczająca. Zauważono m.in. zwiększoną obecność archeonów metanogennych u osób otyłych przy jednoczesnym spadku ilości metanogenów po operacyjnym zmniejszeniu wagi [25]. Badania na myszach wykazały, że obecność M. smithii jest skorelowana ze zwiększonym poziomem krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, co przekłada się na wieksze wchłanianie energii w jelitach [25]. Obserwowano również związek między obecnością metanogenów, a występowaniem nieswoistego zapalenia jelit u 30% pacjentów z chorobą Crohna wykryto archeony metanogenne w porównaniu do 48%

u zdrowych osób. Ponadto, u pacjentów z paradontozą częściej obserwowano archeony metanogenne w jamie ustnej niż u osób zdrowych [25]. Poza drobnoustrojami metanogennymi, w prókach kału rozpoznano i wyizolowano przedstawicieli rzędu *Halobacteriales* (np. *Haloferax massiliensis*) w materiale zarówno od osób zdrowych, jak i od pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit [7, 26, 27]. Jednakże w literaturze brak jest obecnie informacji na temat powiązań między halofilami a ludzkim mikrobiomem – nie ma pewności czy te drobnoustroje stanowią składnik mikrobioty czy ich obecność jest przejściowa i związana ze spożywaniem słonych pokarmów [7, 27]. Oxley i wsp. [28] wskazali, że część archeonów halofilnych zidentyfikowanych w próbkach kału od pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit to drobnoustroje środowiskowe izolowane m.in. ze słonych jezior lub z solonych krewetek [28]. Mimo odkrywania coraz większej liczby gatunków archeonów powiązanych z makroorganizmami lub żyjącymi wolno w środowisku, nadal nie opisano żadnego gatunku chorobotwórczego z domeny *Archaea* [7].

I.4. Charakterystyka archeonów halofilnych

Pojęciem archeonów halofilnych (halofili) określa się drobnoustroje należące do klasy *Halobacteria* w typie *Euryarcharota* domeny *Archaea* [29]. Halofile, w zależności od klasyfikacji, tolerują lub wymagają do wzrostu wysokich stężeń soli NaCl lub KCl [21] i zasiedlają słone jeziora, saliny, solanki, kopalnie soli kamiennej oraz samą sól, a przez to również występują w słonych potrawach [21, 29-31]. W literaturze spotyka się podział halofili na organizmy halotolerancyjne (około 0,3 M NaCl), halofilne (około 0,2-2,0 M NaCl) oraz skrajnie halofilne (około 3,0-5,0 M NaCl) [31]. Halofile morfologicznie przypominają inne archeony – ziarniaki, pałeczki, lub tworzą formy pleomorficzne [21] np. komórki *Haloquadratum walsby* o strukturze zbliżonej do kształtu sześcianu [32]. Biochemia halofili stanowi dowód na ich przystosowanie do panującego środowiska – większość enzymów wymaga do prawidłowego działania wysokiego stężenia NaCl lub KCl (3 – 4 M), budowa białek jest odporna na wysokie zasolenie (duży udział aminokwasów kwasowych, przy znikomym udziale aminokwasów zasadowych), a obecność bakterioruberyny i innych karotenoidów w błonie komórkowej chroni te drobnoustroje przed wpływem światła słonecznego [21].

Interesującym zagadnieniem jest wyjątkowa "długowieczność" archeonów halofilnych. Zaobserwowano m.in. obecność halofili w próbkach halitów z Doliny Śmierci w USA liczących 22 000 – 34 000 lat [33]. Mikroorganizmy w takich środowiskach były narażone przez długi czas na działanie wysokiej temperatury, okresowe wysychanie, niską dostępność substancji odżywczych (źródeł węgla, fosforu i azotu) oraz wysoki poziom promieniowania UV [34]. Halofile wykształciły unikalne mechanizmy, pozwalające przeżyć w tak niekorzystnych warunkach. *Haloquadratum walsbyi* wytwarza białko zbudowane z 9159 aminokwasów zwane halomucyną, które jest wydzielane na zewnątrz komórek i tworzy "chmurę" magazynującą wodę oraz stanowi ochronę drobnoustroju przed fagami [34]. Z kolei *Haloferax volcanii* wykorzystuje zewnątrzkomórkowe DNA obecne w środowisku jako źródło węgla, fosforu i azotu [34].

Większość badań nad przystosowaniem halofili do warunków wysokiego zasolenia przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch organizmów modelowych - Halobacterium salinarum (Halobacteriaceae) oraz Haloarcula marismortui (Haloarculaceae) [35]. Drobnoustroje z klasy Halobacteria ulegają lizie po umieszczeniu w środowisku o niskiej zawartości soli – glikoproteiny w ich ścianie komórkowej potrzebuja wysokiego stężenia soli by utrzymać swoją strukturę [35]. Badania wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wykazały, że halofile utrzymują równowagę osmotyczną dzięki wysokiemu stężeniu kationów potasowych (K⁺), natomiast aniony chlorkowe (Cl⁻) utrzymują w równowadze wewnątrzkomórkowe kationy. Jony sodowe (Na⁺) są obecne w komórce w dużo niższym stężeniu niż kationy potasowe (K⁺) [35]. Badania Engel i Catchpole [36] wykazały, iż Halobacterium salinarum hodowane na agarze peptonowym zawierającym 4,28 M NaCl, 0,036 M K oraz inne sole, zawierały w swoich komórkach stężenie jonów potasowych 110 razy większe niż w podłożu, natomiast stężenie kationów sodowych wewnatrz komórek archeonów wynosiło 0,3 zawartości podłoża [36]. Możliwość utrzymania takich stężeń jonów wymaga od archeonów halofilnych posiadania wielu rodzajów kanałów jonowych, przez które określone jony mogą przechodzić pasywnie, a do transportu kolejnych konieczne są pompy jonowe wymagające udziału energii w formie ATP [35].

Archeony halofilne posiadają również szereg przystosowań na poziomie enzymatycznym. W wyniku zsekwencjonowania genomu *Halobacterium sp.* NRC-1 wykazano, iż drobnoustrój ten posiada nadmiar aminokwasów kwasowych (kwas glutaminowy oraz kwas asparaginowy) przy jednoczesnym niedoborze aminokwasów zasadowych (lizyna i arginina) [37]. Dalsze badania potwierdziły kwasową naturę białek występujących u wszystkich badanych drobnoustrojów z klasy *Haloarchaea* [37].

Każdego roku opisywane są nowe gatunki archeonów halofilnych. Obecnie, baza *PubMed* po wpisaniu hasła "*halophilic archaea*" wyświetla ponad 2200 publikacji naukowych (dane na grudzień 2022). Jedną z ciekawszych baz danych powstałych w ostatnich latach jest projekt *HaloDom*, dokumentujący informacje o wszystkich organizmach halofilnych. W momencie utworzenia (2018 r.) w bazie tej było zebranych ponad 1000 gatunków z różnych domen organizmów żywych. Obecnie opisanych jest łącznie 1267 gatunków bakterii, archeonów oraz eukariontów halofilnych [38].

I.4.1. Charakterystyka badanych szczepów – Halorhabdus rudnickae oraz Natrinema salaciae

Halorhabdus rudnickae oraz Natrinema salaciae to dwa gatunki archeonów halofilnych, opisanych przez zespół naukowców z Uniwersytetu w Coimbrze w Portugalii, kierowany do 2020 roku przez prof. Miltona S da Coste [39, 40]. Schematyczne drzewo taksonomiczne obu drobnoustrojów zamieszczono na Rycinie 2 [Ryc. 2.]. Gatunek Halorhabdus rudnickae (*Hrd. rudnickae*) po raz pierwszy został opisany w 2016 roku przez Albuquerque i wsp. [39]. Hrd. rudnickae to Gram-ujemne nieruchliwe ziarniaki (około 0,8-1,0 µm średnicy), wytwarzające czerwone kolonie na podłożu Halobacteria. Zostały wyizolowane z próbki wody pobranej z poeksploatacyjnego otworu wiertniczego E 632, znajdującego się na terenie obszaru górniczego Barycz, należącego do Kopalni Soli "Wieliczka". Optymalna temperatura wzrostu tych drobnoustrojów to około 40°C (brak wzrostu przy 15°C oraz 60°C), optymalne pH to 6,5-7,5 (brak wzrostu przy pH 5,0 i 9,5), zakres zasolenia to 5,0% – 30% NaCl, optymalnie 20% NaCl. Zawartość par G+C w DNA szczepu Hrd. rudnickae wynosi $61,2 \pm 0,4$ mol%. Pełna nazwa szczepu to Halorhabdus rudnickae WSM-64^T. Opisano również szczep Halorhabdus rudnickae WSM-66 – podobieństwo filogenetyczne 16s rRNA między szczepami WSM-66 oraz WSM-64^T jest na poziomie >99,7% [39].

Archaea



Ryc. 2. Drzewo taksonomiczne Halorhabdus rudnickae oraz Natrinema salaciae. Rycina wykonana z wykorzystaniem narzędzia on-line <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cgi</u>

Gatunek *Natrinema salaciae* (*N. salaciae*) został opisany w 2012 roku przez Albuquerque i wsp. [40] *N. salaciae* to Gram-ujemne, nieruchliwe pleomorficzne komórki o kształcie pałeczek lub ziarniaków (1,0 – 3,0 µm długości i 0,8 – 1,5 µm szerokości), wytwarzające czerwone kolonie na podłożu *Halobacteria*. Zostały wyizolowane z solanki z Jeziora Medee położonego w Basenie Morza Śródziemnego, z głębokości 3050 m. Optymalna temperatura wzrostu to 45°C (brak wzrostu przy 25°C oraz 55°C), optymalne pH to 7,0 – 8,0 (brak wzrostu przy pH 6,0 i 9,5), zakres zasolenia to 9,9% do 29,8% NaCl, optymalny zakres to 15% – 19,8% NaCl. Zawartość par G+C w DNA szczepu *N. salaciae* wynosi 63,0 \pm 0,5mol%. Pełna nazwa szczepu to *Natrinema salaciae* MDB25^T[40].

Różnice między *Hrd. rudnickae 64* i *N. salaciae* zestawiono w Tabeli 2 [Tabela 2.], a obraz morfologiczny przedstawiono na Rycinie 3 [Ryc. 3.].

Charakterystyka	Halorhabdus rudnickae WSM-64 ^T / Halorhabdus rudnickae WSM-66	Natrinema salaciae MDB25 ^T				
Morfologia	ziarniaki	formy pleomorficzne				
Rozmiar komórki	0,8-1,0 μm	0,8-1,5 x 1,0-3,0 μm				
Optimum zasolenia wymagane do wzrostu	20%	15 – 19,8%				
Jony MgCl ₂ wymagane do wzrostu	nie	nie				
Hydroliza skrobi	tak	tak				
Zawartość G+C %	61,0%	63,0%				
Wymagana temperatura:						
zakres	20-57,5°C	30-52,5°C				
optimum	40°C	45°C				
Wymagane pH:						
zakres	5,5-9,0	6,5-9,0				
optimum	6,5-7,5	7,0-8,0				
Wrażliwość na:						
bacytracynę	nie	nie				
afidikolinę	nie	tak				
ryfamycynę b	nie	nie				

Tabela 2. Tabela porównawcza Hrd. rudnickae oraz N. salaciae, na podstawie [39, 40].



Ryc. 3. Obrazy preparatów mikroskopowych przedstawiających Gram-ujemne drobnoustroje halofilne: Hrd. rudnickae 64 oraz N. salaciae, preparat barwiony metodą Grama, pow. 10x100, immersja. Zdjęcie własne.

I.5. Zastosowanie archeonów w przemyśle i medycynie

Archeony są obecne w niemal każdym środowisku na Ziemi, w tym w wielu środowiskach opisywanych jako ekstremalne [41]. Archeony halofilne jak i inne drobnoustroje ekstremofilne są badane przede wszystkim ze względu na ich potencjał biotechnologiczny. Badana i optymalizowana jest zdolność archeonów do wytwarzania metanu, wodoru cząsteczkowego H₂, czy polihydroksyalkanianów [41]. Trwają prace nad wykorzystaniem m.in. halofilnych enzymów aktywnych w warunkach wysokiego zasolenia, przemysłowej produkcji bakteriorodopsyny, a także zastosowaniem archeonów do bioremediacji terenów skażonych wysoką zawartością soli, czy produkcji fermentowanej żywności [42].

Archeony są również badane pod względem ich wykorzystania w medycynie. Jednym z obiecujących komponentów są archeocyny. Są to peptydy przeciwdrobnoustrojowe produkowane przez archeony, o bardzo wąskim spektrum działania (przeciwko drobnoustrojom blisko spokrewnionym ze szczepem produkującym) [43]. Najlepiej poznane są halocyny, produkowane przez drobnoustroje z rzędu *Halobacteriales* oraz sulfobiocyny wytwarzane przez drobnoustroje z rzędu *Sulfolobales* [43].

I.5.1. Archeosomy i pęcherzyki gazowe jako potencjalne komponenty do produkcji szczepionek [Publikacja 1]

Archeosomy to liposomy o wielkości 20-1000 nm zawierające przynajmniej jeden archeonowy polarny lipid, który w przeciwieństwie do wiązań estrowych lipidów eukariotycznych, posiada wiązania eterowe. Błona archeosomów może składać się z warstwy podwójnej zbudowanej z lipidów dieterowych, zwanych archaeolami lub warstwy pojedynczej zbudowanej z lipidów tetraeterowych zwanych kaldarcheolami. Może również zawierać oba komponenty. Unikalna struktura błony archeosomów stanowi ich przewagę w porównaniu do tradycyjnych liposomów – zachowują większą stabilność w szerokim przedziale pH (od 2,0 do 10,0), są termostabilne (4°C – 65°C) i wykazują silniejszy efekt immunostymulujący [44].

W modelach zwierzęcych wykazano, że archeosomy są dobrze tolerowane przez makroorganizm oraz wzbudzają silną odpowiedź humoralną i komórkową skierowaną przeciwko transportowanym antygenom [44]. Obecnie stosuje się dwie metody wytwarzania

techniki wymagają wyizolowania archeonów archeosomów. Obie lipidów Z (metanogennych, halofilnych lub termoacidofilnych) oraz ich oczyszczenia z wykorzystaniem metod chromatograficznych. W metodzie pierwszej cienka warstwa lipidów jest uwadniana w roztworze zawierającym antygeny, w celu otrzymania docelowych archeosomów. Wada tego procesu jest wysoka zmienność i niska wydajność pochłaniania antygenów (od 5% do 40%). W drugiej metodzie do wcześniej przygotowanych, pustych w środku archeosomów dodaje się antygen w formie rozpuszczonej [44]. Ukazało się wiele prac w których opisano wykorzystanie archeosomów jako nośników antygenów bakteryjnych (Mycobacterium tuberculosis, Listeria monocytogenes, Vibrio cholerae), pasożytniczych (Trypanosoma cruzi, Schistosoma mansoni) oraz wirusowych (wirus zapalenia watroby typu B, wirus zapalenia watroby typu C, wirus brodawczaka ludzkiego-16, wirus grypy) [44]. Na modelu mysim wykazano m.in., iż szczepionka przeciwko prątkom *M. tuberculosis*, oparta o archeosomy indukowała istotnie silniejszą produkcję IFN- γ (ang. interferon, interferon) oraz IL-12 (ang. interleukin, interleukina) w porównaniu do powszechnie stosowanej szczepionki Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guérin. Wykorzystanie archeosomów jako nośników antygenów szczepionkowych posiada wiele zalet. W porównaniu do liposomów, archeosomy są bardziej odporne na niskie i wysokie pH oraz na skrajne temperatury, a także wyróżniają się większą odpornością na stres oksydacyjny i działanie soli żółciowych [44]. Dzięki wysokiej termostabilności, preparaty zawierające archeosomy mogą być sterylizowane, oraz zachowują swoje właściwości w wysokiej temperaturze. Badania in vivo na zwierzętach laboratoryjnych wykazały, iż archeosomy podawane śródskórnie są dobrze tolerowane przez organizm i nie powodują skutków ubocznych [44]. Jednakże, istnieją dwa poważne problemy w masowym zastosowaniu archeosomów jako nośników antygenów szczepionkowych. Pierwszym z nich jest brak powtarzalności otrzymanych struktur – archeosomy izolowane są z komórek archeonów

i przez to są zróżnicowane ze względu na rodzaj komórek oraz fazę wzrostu drobnoustroju. Drugą przeszkodą jest niska efektywność "zamykania" antygenów szczepionkowych w archeosomach, co w konsekwencji prowadzi do wydłużenia procesu przygotowania szczepionek oraz zwiększonych kosztów. Oba problemy mogą zostać rozwiązane dzięki ulepszeniu technik wytwarzania archeosomów, m.in. poprzez tworzenie archeosomów półsyntetycznych [44].

Innymi strukturami wytwarzanymi przez archeony, głównie przez archeony metanogenne i halofilne, które mogą być efektywnie wykorzystane w produkcji szczepionek, są białkowe, puste w środku pęcherzyki gazowe [44]. Są to struktury o wymiarach 0,045 – $0,2 \mu m$ szerokości i $0,1 - 2,0 \mu m$ długości, wykorzystywane przez różne drobnoustroje wodne do utrzymania się na odpowiedniej głębokości, w celu zapewnienia dostępu tlenu oraz światła słonecznego. Jednakże, wiedza na temat pęcherzyków gazowych obecnych metanogennych jest niewystarczająca [44]. u archeonów Pecherzyki gazowe wykorzystywane jako nośniki antygenów powstają w organizmach modyfikowanych genetycznie i noszą nazwę GVNP (ang. gas vesicle nanoparticles). W celu otrzymania GVNP, genom drobnoustroju zostaje zmodyfikowany genetycznie poprzez dodanie sekwencji kodującej dany antygen. W rezultacie powstaje GVNP zawierający na swojej powierzchni docelowy antygen. GVNP zostały opisane jako nośniki antygenów m.in. małpiego wirusa niedoboru odporności, Salmonella enterica serovar Typhimurium, Chlamydia trachomatis i Plasmodium falciparum [44]. Immunizacja myszy szczepionką opartą o GVNP, zawierającą wybrane peptydy S. enterica serowar Typhimurium, skutkowała silną odpowiedzią odpornościową, powiązaną m.in. z podwyższonym poziomem cytokin prozapalnych jak m.in.: IFN-y, IL-2, IL-9 czy GM-CSF (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów). GVNP cechują się wysoką stabilnością, przejawiającą się m.in. odpornością na chemiczną czy enzymatyczną degradację oraz termostabilnością [44]. Pęcherzyki gazowe jako nośniki antygenów szczepionkowych charakteryzują się bezpieczeństwem stosowania w modelach zwierzęcych oraz zapewniają silną odpowiedź odpornościową przeciwko antygenom [44]. Głównym problemem w zastosowaniu GVNP jest biotechnologiczny proces produkcyjny – z racji swojego powstawania, pęcherzyki gazowe mogą przenosić jedynie białka oraz peptydy. Oznacza to, iż GVNP są optymalnym nośnikiem antygenów bakteryjnych m.in. S. enterica serovar Typhimurium czy C. trachomatis [44].

Podsumowując, zarówno archeosomy, jak i pęcherzyki gazowe mogą w przyszłości stanowić alternatywę dla obecnie stosowanych nośników antygenów szczepionkowych i/lub

adiuwantów. Mimo, iż badania wskazują na bezpieczeństwo ich stosowania oraz wysoką skuteczność w indukowaniu odpowiedzi odpornościowej, to wiedza na temat ich działania pochodzi z badań *in vivo* z wykorzystaniem modeli mysich. Wykorzystanie innych modeli zwierzęcych, jak również innych form podawania antygenów (archeosomy i GVNP stosowano przede wszystkim w formie domięśniowej, dootrzewnowej i podskórnie) pozwoliłoby przyśpieszyć proces wykorzystania tych komponentów jako składników szczepionek zaakceptowanych do użycia u ludzi [44].

Dokładna charakterystyka archeosomów oraz pęcherzyków gazowych stosowanych w produkcji szczepionek została przedstawiona w publikacji "*Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development*", będącej składową niniejszej pracy doktorskiej [Publikacja 1].







Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development

Natalia Adamiak¹, Krzysztof T. Krawczyk¹, Camille Locht^{1,2} and Magdalena Kowalewicz-Kulbat^{1*}

¹ Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland, ² Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR9017 – CIIL – Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

Archaea are prokaryotic organisms that were classified as a new domain in 1990. Archaeal cellular components and metabolites have found various applications in the pharmaceutical industry. Some archaeal lipids can be used to produce archaeosomes, a new family of liposomes that exhibit high stability to temperatures, pH and oxidative conditions. Additionally, archaeosomes can be efficient antigen carriers and adjuvants promoting humoral and cellular immune responses. Some archaea produce gas vesicles, which are nanoparticles released by the archaea that increase the buoyancy of the cells and facilitate an upward flotation in water columns. Purified gas vesicles display a great potential for bioengineering, due to their high stability, immunostimulatory properties and uptake across cell membranes. Both archaeosomes and archaeal gas vesicles are attractive tools for the development of novel drug and vaccine carriers to control various diseases. In this review we discuss the current knowledge on production, preparation methods and potential applications of archaeosomes and gas vesicles as carriers for vaccines. We give an overview of the traditional structures of these carriers and their modifications. A comparative analysis of both vaccine delivery systems, including their advantages and limitations of their use, is provided. Gas vesicle- and archaeosomebased vaccines may be powerful next-generation tools for the prevention and treatment of a wide variety of infectious and non-infectious diseases.

Keywords: archaeosomes, gas vesicles, GVNP, vaccines, Archaea

INTRODUCTION

Archaea constitute the domain consisting of small, single-celled organisms lacking a cell nucleus. They are generally considered non-pathogenic to humans. Most known species inhabit extreme environments, such as underwater hydrothermal vents, glaciers or brine lakes. Therefore, they are called extremophiles and include thermophilic, psychrophilic, acidophilic, alkalophilic, piezophilic and halophilic microorganisms, as well as polyextremophilics, such as thermoacidophiles. Metabolites and cellular components of extremophilic archaea are thus resistant to extreme physical and chemical conditions. Hence, they are widely used in environmental protection (amidases, nitrilases), molecular biology studies (proteases, DNA polymerases) and industry, such as the food and feed, pharmaceutical (lipases, esterases, xynalases, chitinases, CGTases,

OPEN ACCESS

Edited by: Sofia A Casares,

Naval Medical Research Center, United States

Reviewed by:

Michael McCluskie, National Research Council Canada (NRC-CNRC), Canada Ganesh Ram Visweswaran, Seattle Children's Hospital, United States

*Correspondence:

Magdalena Kowalewicz-Kulbat magdalena.kowalewicz@ biol.uni.lodz.pl

Specialty section:

This article was submitted to Vaccines and Molecular Therapeutics, a section of the journal Frontiers in Immunology

> Received: 23 July 2021 Accepted: 27 August 2021 Published: 10 September 2021

Citation:

Adamiak N, Krawczyk KT, Locht C and Kowalewicz-Kulbat M (2021) Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development. Front. Immunol. 12:746235. doi: 10.3389/fimmu.2021.746235

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

1

September 2021 | Volume 12 | Article 746235

pullulanases, nitrilases, glucosidases), paper (lipases, esterases, cellulases, endoglucanases, xynalases), detergent (lipases, esterases, proteases, α -amylases, CGTases, pullulanases, cellulases, nitrilases, glucosidases), chemical (lipases, esterases, proteases, nitrilases), agrochemical (lipases, esterases, nitrilases), cosmetic (canthaxanthin), holographic (bacteriorhodopsin), textile (cellulases, endoglucanases, glucosidases), biofuel (lipases, esterases, α -amylases, glucoamylases, pullulanases, amylopullulanases, cellulases) and medical industry (nitrilases, bacteriorhodopsin, bacterioruberin, diketopiperazines, polyhydroxyalkanoates, archaeocins, archaeosomes, gas vesicles) (1–5).

In the medical industry, archaeal enzymes, e.g. nitriledegrading enzymes called nitrilases, are used for the production of drugs, such as Ibuprofen, Naproxen, Gabapentin, Pregabalin, Atorvastation and penicillin (1). Bacteriorhodopsin is used for the production of artificial retinas for patients with retinitis pigmentosa (2), while bacterioruberin (red pigment) is being tested for its anti-cancer effect. Bacterioruberin of 3 different halophilic species, Halogeometricum limi RO1-6, Haloplanus vescus RO5-8 and Halobacterium halobium, has shown cytotoxicity on hepatocellular adenoma HepG2 cells (3). Diketopiperazines, produced at industrial scale by halophilic Naloterrigena hispanica and Natronococcus occultus, present antimicrobial, antifungal, antiviral and antitumor activity. They also affect the blood clotting process and inhibit quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa (2). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters produced by many types of halophilic archaea, such as Haloferax mediterranei, a potential industrial source of the compound. Due to the fact that PHAs are biodegradable and biocompatible with mammalian tissues and blood, they can be used as sutures, as well as dressing and osteosynthesis materials (4).

Archaeocins have also found potential use in the medical industry. They are antimicrobial proteins or peptides, including halocins and sulfolobiocin. Halocins are produced by halophilic archaea of the genera *Halobacterium*, *Halorubrum* and *Haloferax* (3). So far, 7 halocins have been described, but it is suspected that there are many more (6). Halocins proved to be active against other halophilic archaea and certain types of bacteria from hypersaline environments, such as *Halomonas*, *Rhadovibrio*, *Salisaeta* and *Pontobacillis* (3). Their effect on human pathogens has not been studied yet. Sulfolobiocin is produced by hyperthermophilic *Sulfolobus*. Its effect on human pathogens also remains unexplored (6).

Some archaeal products may also serve as vaccine carriers of great potential. These include archaeosomes and gas vesicles, which can act both as transporters of vaccine antigens and as adjuvants. As purified and synthetic antigens are usually poorly immunogenic, they often require the addition of adjuvants and/ or particulate carriers. Alum is the most widely used adjuvant/ carrier and has been used for nearly a century. While alum strongly increases antibody responses to co-administered antigens, it has less stimulatory effects on T cell responses (7).

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

2

More recently, additional adjuvants and vaccine carriers have been used in licensed vaccines, including oil-in-water emulsions, virosomes, outer membrane vesicles and liposomes, sometimes containing Toll-like-Receptor (TLR) agonists to enhance the activation of antigen-presenting cells (APC) (8). Archaeosomes (9) and gas vesicles from halophilic archaea (10) are relatively recent additions to this list and are the objects of this article.

ARCHAEOSOMES

Definition of Archaeosomes

Archaeosomes are liposomes consisting of at least one total polar lipid extract (TPL) from archaea. In contrast to eukaryotic esterlinked lipids, archaeal lipids are ether-bound (11). Archaeosomal membranes composed of ether-lipids can form bilayers, monolayers or a combination of both (12). The core of bilayer archaeosomes is composed of diether lipids called archaeols, while the core of monolayer archaeosomes contains tetraether lipids called caldarchaeols (12). Archaeols and caldarchaeols have irregularly branched, usually fully saturated phytanyl chains (20-40 carbon atoms long) connected by ether bonds to sn-2, 3 carbons of a glycerol backbone (12, 13).

The unique structure of archaeal lipids provides advantages of archaeosomes over traditional liposomes. They display higher stability to a wide range of pH (from pH as low as 2 for some archaeosomes to as high as 10.0), enhanced thermostability (from 4 to 65° C), low proton permeability and stronger immunostimulatory effects (12, 14, 15). Moreover, their structures include both hydrophilic and hydrophobic domains, allowing both hydrophobic and hydrophilic substances to be entrapped (12).

Natural archaeosomes consisting of non-modified archaeal TPLs are effective in delivering a wide range of antigens to APC for the initiation of strong specific humoral and cellular CD4⁺ and CD8⁺ immune responses, as well as cellular memory (12, 13, 15, 16). They are ideally suited as carrier systems and/or adjuvants, as they naturally target and are effectively phagocytosed by mononuclear cells, and can therefore effectively present antigens by APC. This facilitates the induction of humoral and cellular immune responses and long-term cellular memory (17). The induction of CD8+ cytotoxic T cell responses by archaeosomes via the stimulation of dendritic cells and MHC class I cross-presentation can be very effective against neoplastic cells and intracellular pathogens (12-14, 17). Natural archaeosomes are well tolerated when administered intramuscularly to animals (14) and strongly enhance antibody and T cell responses to entrapped antigens (18). Administration routes other than systemic routes have also been explored for archaeosomes, including transdermal, oral and nasal routes. Topical application of ovalbumin (OVA) included in archaeosomes resulted in strong antibody responses to OVA in mice with a Th2 bias (19). Similar results were obtained when influenza vaccine was used as antigen and administered topically in an archaeosome formulation, which also resulted in a strong IFN-y response (20). A comparison of archaeosomes composed

September 2021 | Volume 12 | Article 746235
of TPLs from three different archaea applied topically revealed differences in their ability of antigen distribution and vesicle accumulation in the skin epidermis (21). An archaeosome formulation containing total antigen extract from *Leishmania braziliensis* topically administered to mice induced a stronger antibody response to the *L. braziliensis* antigens than a lipid formulation, most likely because of its improved stability and uptake by APC (22). Similarly, OVA formulated in archaeosome vesicles was more immunogenic when given orally than OVA formulated in liposomes, likely because of superior stability in gastric and intestinal fluids (23). Nasal administration of archaeosome-formulated antigens also induces strong systemic immune responses and induces IgA responses in the nasal cavity, in the bile and vagina when aggregated with calcium or combined with a mucosal adjuvant (24).

Semi-Synthetic Archaeosomes

Traditionally produced, natural archaeosomes are mixtures of glycolipids for which lot consistency and reproducibility of the formulations are difficult to control (16). To improve consistency of archaeosomes, simplified, semi-synthetic formulations have been developed, which consist of a single lipid called sulfated Slactosylarchaeol (SLA), in which the sulfated saccharide group is covalently linked to the free sn-1 hydroxyl backbone of the archaeol core (14–16, 25). The chemical formula of SLA is 6'sulfate- β -D-Galp-(1,4)- β -D-Glcp-(1,1)-archaeol (14, 15). SLA ensures consistency combined with an easy synthesis method and therefore reduced production cost (14).

Similar to traditional archaeosomes, SLA archaeosomes are capable of eliciting long-term cellular and humoral responses against various antigens and maintain a good safety profile (14– 16, 26). They have been shown to be well tolerated without inducing adverse reactogenicity in mice at doses up to 10 times higher than those typically used in vaccines (14). Their adjuvant effect is comparable to or greater than that of widely used adjuvants, such as aluminum hydroxide, TLR3, TLR4 and TLR9 agonists, oil-in-water or water-in-oil formulations (11). SLA preparations cause intense local secretion of cytokines, retention of the antigen uptake by APCs and other cells of the immune system, such as neutrophils and monocytes (14, 16). They are preferentially taken up by macrophages (16).

In addition to SLA archaeosomes, other semi-synthetic archaeosomes have also been tested in earlier studies as carriers and adjuvants for entrapped antigens (27). Semisynthetic archaeosomes based on archaeol from *Halobacterium salinarum* to which various sugar moieties were grafted showed various types of immune responses to entrapped antigens. Immunization of mice with OVA entrapped into an archaetidylglycerophosphate-O-methyl archaeosome purified from *Haloferax volcanii* to which 45% gentiotriosylarchaeol, mannotriosylarchaeol or maltotriosylarchaeol were added resulted in enhanced CD8⁺ T cell and decreased antibody responses, compared to the same archaeosome formulation without the triglycosylarchaeols. In contrast, when all three triglycosylarchaeols were added to the archaeosome, the

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

antibody response was less affected, while the enhanced CD8⁺ T cell response was still observed (28).

Encapsulated and Admixed Archaeosomes

Among the archaeosome formulations there are traditional encapsulated archaeosomes, in which the antigen is released from the interior of the carrier, and admixed archaeosomes, in which the antigens are not entrapped but mixed with empty archaeosomes (18). Due to the differences in antigen localization on admixed archaeosomes compared to encapsulated archaeosomes, it is hypothesized that admixed archaeosomes may induce alternative antigen presentation pathways to those induced by encapsulated archaeosomes (16). Despite these differences, both formulations have repeatedly been shown to elicit comparable humoral and cellular responses and to induce strong antigen and immune cell retention at the vaccination site, with strong local cytokine secretion (15, 16, 26, 29). Similarly, by comparing three different formulations, Jia et al. also found that entrapped and admixed archaeosomes induced similar antibody and T cell responses to the test antigens OVA and hepatitis B surface antigen (18). However, in a B16- OVA melanoma model, the encapsulated archaeosomes appeared to have a greater ability to activate CD8⁺ T cells by dendritic cells in vitro than admixed formulations, yet in an in vivo murine tumor model the activity of both formulations was comparable with respect to survival (16). On the other hand, in a Human papilloma virus-16 (HPV-16) model, admixed preparations containing plasmid DNA encoding L1, E6 and E7 of HPV-16 induced higher IFN-7 response than encapsulated archaeosomes, but showed comparable effects on tumor size and survival of the mice (13).

Combination of Archaeosomes With Adjuvants

Recent studies have shown that when OVA-containing SLA archaeosomes were co-administered with the TLR3 agonist poly(I:C), antibody responses to OVA were significantly enhanced after intramuscular administration over those obtained when OVA was formulated with SLA archaeosome or poly(I:C) alone (30). Antigen-specific cytotoxic T cell activity and IFN-y production were also synergistically increased by the SLA archaeosome - poly(I:C) combination. A similar synergistic effect on antigen-specific cytotoxicity and IFN-y production was also seen when the TLR9 agonist CpG instead of poly(I:C) was combined with the SLA archaeosomes. A synergistic effect of CpG or poly(I:C) with SLA archaeosomes could also be observed in a murine B16-OVA tumor model, in which the combination of SLA archaeosomes with poly(I:C) significantly delayed tumor growth and prolonged the mouse survival time compared to OVA formulations with SLA archaeosomes or poly(I:C) alone (31)

Production of Archaeosomes

The first step in the production of archaeosomes is the isolation of lipids from methanogenic, halophilic or thermoacidophilic archaea species, like *Methanobrevibacter smithii, H. salinarum* or *Thermoplasma acidophilum* (12, 16, 17). However, the main

source of lipids is *H. salinarum* (**Table 1**). The obtained lipid composition depends on the type of archaea. Archaeosomes made of archaeol mainly come from halophiles, while archaeosomes containing caldarchaeol are from acidophils, and archaeosomes composed of the mixture of these lipids are mainly from methanogens (12). The size of archaeosomes varies from 20-1,000 nm (12). The zeta potential is similar between different archaeosomal formulations and ranges from -52.6 to -77.7 mV with a negative surface charge, and the polydispersity index is in the range of 0.3 to 0.6, which is larger than that of liposomes, suggesting a broader particle size distribution (21).

The natural lipids of archaea needed for the production of archaeosomes can be obtained from total lipid extracts, which include polar lipids and neutral lipids (e.g. squalene). This can be done by extracting archaea biomass in a mixture of chloroform, methanol and water. In order to obtain a pure fraction of TPL, the extract can then be precipitated with acetone (12, 17).

In order to purify the obtained lipids, chromatography methods, such as column chromatography or preparative thinlayer chromatography are routinely used (12, 17). At this stage, lipids can be chemically modified by modifying the lipid head groups (12, 17). From natural or chemically modified lipids, archaeosomes carrying both hydrophilic and hydrophobic compounds can be produced by hydrating previously dried thin lipid layers (12, 15, 17).

Traditionally, encapsulated archaeosomes are produced by hydrating a thin layer of lipids in an antigen solution. As a result, a solution of archaeosomes with the entrapped antigen is formed (18). The archaeosome suspension can then be further processed to obtain a uniform size, e.g. by sonication, and can be separated from free antigen by centrifugation (13, 15–17). However, due to the variable and relatively low encapsulation efficiency of the antigens, ranging from 5–40%, resulting not only in the loss of antigen, but also in increased cost of vaccine production and variable antigen concentrations in a vaccine, a new archaeosome formula was recently developed, referred to as admixed archaeosomes (29). They can be formed by admixing a soluble antigen solution into pre-formed, hollow archaeosomes, which provides a convenient, easy process of archaeosome formulations (13, 15, 29). Admixed archaeosomes do not result in loss of antigen during production and are highly reproducible, while maintaining strong adjuvant properties (16).

Applications of Archaeosomal Vaccines

Several studies have shown that archaeosomal vaccines are capable of inducing immune responses against antigens. The effects of these carriers have been investigated with *Mycobacterium tuberculosis, Listeria monocytogenes, Vibrio cholerae, Trypanosoma cruzi, Schistosoma mansoni,* hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV), HPV-16 and influenza virus, as well as with murine B16 melanoma cells.

Human Papilloma Virus-16

Karimi et al. (13) developed 2 vaccine formulations against HPV-16, which accounts for approximately 55-60% of all cervical cancer cases. The encapsulated and admixed formulations of the natural archaeosomes contained plasmid DNA encoding the capsid-building protein L1, as well as the E6 and E7 oncoproteins. Immunization of mice with either archaeosome-L1/E6/E7 induced humoral and cellular CD4⁺ and CD8⁺ responses, with high levels of IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10. However, the admixed archaeosomes stimulated higher concentrations of these cytokines

Type of archaea	Producer	Vaccine carrier	Vaccine target	Antigen	Reference
Halophilic	H. salinarum	Admixed archaeosome	Melanoma B16- OVA	OVA	
	H. tebenquichense	Encapsulated archaeosome	T. cruzi	T. cruzi homogenate	(32)
	H. salinarum	Encapsulated archaeosome	L. monocytogenes	Secretory proteins	(33)
	H. salinarum	Encapsulated archaeosome	M. tuberculosis	Secretory protein Rv3619c	(34)
	TPL from H. salinarum	Encapsulated and admixed archaeosome	HPV-16	pDNA coding L1, E6, E7	(13)
	SLA from modified <i>H. salinarum</i> lipids	Encapsulated SLA archaeosome	HBV	Surface antigen	(11)
	SLA from modified <i>H. salinarum</i> lipids	Encapsulated SLA archaeosome	Melanoma B16	TRP-2	(25)
	SLA from modified H. salinarum	Encapsulated and admixed SLA archaeosome	HCV	Heterodimer E1E2	(26)
	SLA from modified <i>H. salinarum</i> lipids	Encapsulated and admixed SLA archaeosome	Melanoma B16- OVA	OVA	(29)
	SLA	Admixed SLA archaeosome	Schistosoma mansoni	Cysteine protease SmCB	(35)
	H. salinarum	GVNP	SIV	Gag, Tat, Rev and Nef1 fragments	(36)
	H. salinarum	GVNP	S. typhimurium	SopB fragments	
	H. salinarum	GVNP	C. trachomatis	MOMP, OcmB and PompD fragments	
	H. salinarum	GVNP	P. falciparum	Enolase fragment	
Methanogenic	M. smithii	Encapsulated archaeosome	Melanoma B16	Gp-100, TRP-2	(37)
	M. smithii	Encapsulated archaeosome	Influenza virus	Hemagglutinin	(15)
	M. smithii	Encapsulated archaeosome	V. cholerae	Cholera toxin B subunit	(38)

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

4

compared to the encapsulated archaeosomes. In addition, administration of archaeosomes to mice was associated with increased apoptosis of tumor cells, which reached 40 to 60% of the PBS controls, while the plasmid DNA alone led to 15 to 20% apoptosis (13). Empty archaeosomes were not tested for this readout. Furthermore, archaeosomes reduced and delaved the growth of tumors, as by day 28, the average tumor volume in mice immunized with archaeosomes-L1/E6/E7 was only 15% compared to that of the control mice. Recombinant plasmid DNA alone and empty archaeosomes led to a tumor size reduction of approximately 65% and 30%, respectively. Finally, while all mice in the control group had died by day 42, all mice immunized with archaeosomes were still alive at that time point. The recombinant plasmid alone and the empty archaeosome groups showed a slight delay in mortality compared to the PBS control (13).

Hepatitis C Virus

When admixed and encapsulated SLA archaeosomes containing the HCV H77 E1/E2 heterodimer were compared to other adjuvant formulations, the admixed vaccine provided the strongest humoral response (26). Moreover, the SLA-admixed formulation induced antibodies that strongly neutralized HCV pseudoparticles and prevented infection of Huh7.5 liver cells, whereas the encapsulated formulation did not. However, the encapsulated formulation provided the strongest CD4⁺ cellular response. Neither preparation induced CD8+ cell responses in this model (26).

Influenza Virus

When encapsulated and admixed SLA preparations, natural encapsulated archaeosomes, and the squalene-based adjuvant AddaVax, carrying the influenza virus haemagglutinin were compared to each other, all preparations were found to elicit humoral responses against the antigen (15). However, the encapsulated SLA archaeosomes and AddaVax-formulated haemagglutinin provided stronger protection against influenza virus than M. smithii archaeosomes and prevented weight loss in influenza virus-infected mice, which averaged 10% in the natural archaeosome vaccinated group. Maternal vaccination to protect pups was also assessed using SLA and AddaVax formulations. Sixweek old female mice were vaccinated with either encapsulated or admixed archaeosomes once before pregnancy or once before and once during pregnancy. The anti-HA antibody titers in the blood of the pups were higher when the mothers had received two doses and were about 10 times lower than in the blood of the mothers. Pups born to mothers vaccinated with encapsulated SLA archaeosomes had lower titers than those that were born to mothers vaccinated with admixed SLA archaeosomes. After one week, the pups and mothers were infected with the influenza virus H1N1 strain PR8 and protection against the disease in pups and mothers was evaluated. Both immunization protocols with the admixed archaeosomes induced strong protection against virusinduced mortality in both mothers and pups, while a single maternal immunization with the encapsulated archaeosomes did not protect the pups (15). There appeared thus to be a correlation between protection against weight loss/death and antibody titers

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

Archaeosome and Gas Vesicle Vaccines

in the pups. These titers did not reach the threshold levels in the pups born to mothers vaccinated once with the encapsulated archaeosomes, while the mothers had antibody levels high enough to be protected.

Hepatitis B Virus

In order to evaluate the immunomodulatory properties of SLA archaeosomes and to compare them to other adjuvants, such as TLR3, TLR4 and TLR9 agonists, water-in-oil and oil-in-water emulsions, and aluminum hydroxide, a preparation containing encapsulated recombinant HBV surface antigen was produced. The formulation was found to induce strong humoral and CD8+ T cell responses and to stimulate the expression of IL-6, G-CSF, GM-CSF, KC, MCP-1 and MIP-2. The SLA archaeosomes showed strong adjuvant properties, similar to or stronger than other adjuvants and induced the strongest cytotoxic response among the tested formulations (11).

Melanoma B16

Four encapsulated natural archaeosomes containing separately Gp100 and TRP-2, a mixture of coentrapped melanoma antigens and a mixture of archaeosomal carriers of both proteins were reported to stimulate CD8⁺ T cell responses and to provide protection against cancer. Dipeptide vaccines were found to induce better and longer protection than monopeptide vaccines (37). Subsequently, it was shown that the TRP-2 protein encapsulated in the SLA archaeosome induced a strong CD8⁺ T cell response in mice and strong protection against B16 melanoma, comparable to that induced by the natural archaeosome formulation (25).

In the melanoma B16-OVA model, archaeosome vaccines against OVA and checkpoint inhibitor therapy consisting of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 antibodies were combined. All formulations tested, i.e. admixed and entrapped SLA archaeosomes and encapsulated natural archaeosomes presenting OVA, enhanced the effects of checkpoint inhibition therapy by increasing the survival rate of mice and OVA-CD8⁺ T cell production and by reducing tumor growth in comparison to checkpoint inhibition therapy alone (29).

Trypanosoma cruzi

A vaccine formulation against T. cruzi, the parasite that causes Chagas disease, based on archaeosomes composed of Halorubrum tebenquichense lipids in which dissolved parasite homogenates had been encapsulated was found to be effective in stimulating specific humoral responses. In addition, immunized mice infected with T. cruzi trypomastigotes showed low blood parasite titers and high viability compared to the groups of unvaccinated mice (32).

Schistosoma mansoni

Perera et al. (35) prepared three vaccine formulations targeting Cathepsin B (SmCB), the most abundant cysteine protease in schistosomula and adult *S. mansoni* by combining the antigen with SLA archaeosomes or AddaWaxTM. Both vaccines provided 40% protection and reduced adult worm burden, liver and intestinal egg counts, with the SLA archaeosome formulation

5

reaching 60.5% reduction and AddaWax 86.8%. Both formulations also induced humoral and cellular immune responses. The SLA archaeosome formation increased IL-3 and Th1 cytokine levels, while AddaWax stimulated Th17 and Th2 cytokine production.

Listeria monocytogenes

In a vaccine formulation against *L. monocytogenes*, secretory proteins obtained from the culture supernatant of this pathogen were encapsulated in archaeosomes composed of *H. salinarum* lipids. Vaccination with this formulation resulted in increased production of the Th1 cytokines IFN- γ and IL-12, induction of T cell memory, without inducing IL-4. One week after infection with *L. monocytogenes*, a significant reduction in bacterial burden in the liver and spleen was noticed in the vaccinated animals compared to the controls, and after further 4 weeks, all vaccinated mice, unlike the control group, were protected against death (33).

Mycobacterium tuberculosis

A vaccine formulation against *M. tuberculosis* based on natural archaeosomes encapsulated with the Rv3619c antigen was compared to the most commonly used vaccine, the Bacille Calmette-Guérin, and shown to provide stronger IFN- γ and IL-12 responses, as well as proliferation of Rv3619-specific T cells, higher concentrations of co-stimulatory markers, stronger effector memory T cell responses and significantly greater reduction in bacterial load in the lungs and spleen after *M. tuberculosis* challenge (34).

Vibrio cholerae

The immune responses against the cholera toxin subunit B were also compared between preparations using liposomal and archaeosomal carriers. Archaeosomal vaccines prepared from *M. smithii* lipids appeared to induce significantly higher humoral responses compared to liposomes and similar responses compared to Freund's complete adjuvant. Moreover, archaeosomal vaccines only required two administrations to achieve maximum antibody titers in mice (38).

GAS VESICLES

Definition of Gas Vesicles

Gas vesicles are small, inert, empty, proteinaceous intracellular organelles, produced by various microbes, including cyanobacteria, proteobacteria and halophilic and methanogenic archaea (36, 39, 40). In microorganisms inhabiting the water environment, gas vesicles play a role in the buoyancy of the cell, allowing it to adapt to environmental changes and to maintain access to oxygen and light required for ATP synthesis and optimal microbial growth (39–41). However, the role of gas vesicles in microorganisms such as methanogenic archaea or soil bacteria still remains unknown (36). In the first stages of their biosynthesis, the vesicles are biconical and subsequently evolve into a cylindrical shape (39, 40). Usually, gas vesicles are 0.045 - 0.2 μ m wide and 0.1 - 2 μ m long, but their exact size and shape are determined by environmental conditions, e.g. the higher the pressure, the narrower the gas vesicles (39). Gas vesicles consist only of proteins. The basic composition of the vesicle structure includes two proteins: small hydrophobic GvpA proteins (7-8 kDa) and large hydrophilic GvpC proteins (20-40 kDa) (39, 40).

The GvpA proteins are the main component of the gas vesicle, building its core. GvpA forms 4.6 nm-wide ribs that spiral up perpendicular to the long axis of the gas vesicle. The hydrophobic vesicle wall composed of a single layer of GvpA proteins is 2 nm thick and allows diffusion of gases in both directions (23). The GvpC proteins form a hydrophilic mesh on the outer surface of the gas vesicle, strengthening its stability and structure (39, 40), but do not play an important role in membrane integrity. The *H. volcanii* 1C mutant containing all gvp genes except for gvpC still produces gas vesicle structures, although they take an unusual shape (41).

The production of gas vesicles and its regulation are driven by the differential expression of gvp gene clusters and often depend on environmental parameters (24). Besides the gvpA and gvpC genes, there are many other genes with unknown functions. While there is homology between the major genes encoding GvpA and GvpC of different organisms, distinct variations exist for the rest of the genes (39). The gvp cluster encodes between 8-14 Gvp proteins, which are found both on chromosomes and plasmids (40). A total of 14 gvp genes were identified in the Halobacterium NRC-1 strain, organized into two divergent operons, gvpACNO and gvpDEFGHIJKLM (37, 39, 41). While the function of most proteins remains unclear, it has been proposed that they are less important structural proteins or perform regulatory functions (23). It is known that not all Gvp proteins are necessary for the formation of gas vesicles. GvpC, GvpD, GvpE, GvpH and GvpI are redundant (41). GvpD and GvpE are regulatory proteins. GvpD represses the expression of gvpA and gvpC, while GvpE activates their expression (40, 41). Among these genes the most widely used for biotechnological purposes is gvpC. Several studies have shown that foreign sequences inserted into gvpC in Halobacterium sp. NRC-1 allowed the effective presentation of antigens on the surface of the vesicle (39).

Gas vesicles were first proposed as antigen carriers almost 20 years ago. Since then, they have been studied for the presentation of viral, bacterial and eukaryotic antigens (39). For this purpose, gas vesicle nanoparticles (GVNPs), i.e. gas vesicles isolated from producer cells modified genetically to present the desired antigen, have been used (39). Most of these studies have been performed using GVNPs obtained from *Halobacterium* sp. NRC-1 (39).

GVNPs are in the size range of the nanometer and therefore are ideally suited as carriers of drugs and vaccines. They have been shown to induce both humoral and cellular responses, as well as cellular memory. The mechanisms by which GVNPs induce immune responses include the presentation of antigens

6

by APC and the cross-presentation of vaccine antigens (42). Moreover, Halobacterium sp. NRC-1 GVNPs not containing foreign antigens have been shown to stimulate the immune response without the addition of an exogenous adjuvant, and can therefore function both as antigen carriers and as inbuilt adjuvant (39).

Production of GVNP Vaccines

Genetic engineering techniques have been used to obtain GVNPs presenting various antigens. The codon-modified DNA sequence corresponding to the desired antigens can be inserted into the gene sequence corresponding to the acidic tail at the C-terminal moiety of GvpC, which makes up the outer surface of the gas vesicle. As a result, the antigen is expressed on the surface of the gas vesicle (39). Halophilic archaea that produce gas vesicles include: H. salinarum, H. mediterranei and Haloquadratum walsbyi, although H. salinarum is the leading producer of GVNPs (Table 1) (39). To obtain purified gas vesicles, the cells have to be lysed. For Halobacterium sp. NRC-1 the cells can be lysed simply by incubating the recombinant halophiles in water. The cell lysate can then be subjected to low-speed centrifugation overnight to harvest the gas vesicles floating on the surface of the supernatant (39, 41). Gas vesicles are stable in water or detergent solutions and only dissolve in 80% formic acid (41).

Applications of GVNP Vaccines

Various antigens have already been presented on the surface of GVNPs, such as simian immunodeficiency virus (SIV) antigens, as well as antigens from Salmonella enterica serovar Typhimurium, Chlamydia trachomatis and Plasmodium falciparum.

Simian Immunodeficiency Virus

In the case of SIV, fragments of Gag, Tat, Rev and Nef1 were expressed on the surface of GVNPs. Recombinant GVNPs presenting fragments of Gag (17, 168 or 235 amino acids-long peptides) induced IgG production and long-term immune memory. Anti-Gag antibodies were detected 120 days after a booster injection (36, 39). The fragments of Tat (50 amino acids), Rev (81 amino acids) and Nef1 (214 amino acids) were also expressed on GVNP. The recombinant GVNPs induced immune responses at levels similar to those obtained by Gag-GVNPs (36). During immunization with recombinant Tat-GVNP, Rev-GVNP and Nef1-GVNP vaccines, IL-10, IL-12 and IL-18 were produced (36, 39). The strongest immune response was shown after immunization with the recombinant Tat-GVNP vaccine (39).

Salmonella enterica serovar Typhimurium

To stimulate immunity against S. enterica serovar Typhimurium, GVNPs containing 2 fragments of SopB (100 amino acid-long SopB4 and 165 amino acid-long SopB5) have been prepared. Mice primed with an attenuated vaccine against S. typhimurium, followed by boosting with 100 µg of SopB4-GVNP or SopB5-GVNP 7 and 14 days later, developed a strong and long-lasting immune response against SopB and increased levels of the proinflammatory cytokines IFN-y, IL-2 and IL-9, as well as GM-CSF in the serum. One week after oral challenge with 107 colonyforming units of virulent Salmonella the bacterial loads in

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

However, work with natural archaeosomes revealed important limitations of this carrier, which are related to the various lipid compositions between lots, which cause issues in lot consistency.

September 2021 | Volume 12 | Article 746235

Archaeosome and Gas Vesicle Vaccines

mesenteric lymph nodes, liver and spleen were at least 2 orders of magnitude lower than in mice boosted with non-recombinant GVNP. CD4⁺ T cell levels in the spleen were increased 2- to 4fold compared to non-recombinant GVNP-boosted controls. Moreover, mice boosted with SopB5-GVNP survived 3-5 days longer than those boosted with non-recombinant GVNP (36, 42).

Chlamydia trachomatis

For the expression of C. trachomatis antigens on the GVNP surface, protein fragments of the major outer membrane protein MOMP (48 and 69 amino acids), the outer membrane B complex OcmB (162 and 144 amino acids) and the outer membrane polymorphic protein PompD (173 and 222 amino acids) have been used (36, 39). Immunostaining confirmed that GVNPs presenting the C. trachomatis antigens were absorbed by human foreskin fibroblast cells, in which they were gradually disintegrated and finally exposed on the surface of the fibroblasts (36, 39). Recombinant GVNPs were shown to engage TLR-4 and TLR-5 and to stimulate the production of TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-12 (36, 42).

Plasmodium falciparum

The highly conserved 15 amino acid-long fragment of the P. falciparum enolase (14 out of the 15 residues are identical between the P. falciparum and the Plasmodium yoelii peptide) was also expressed on GVNPs. Mice immunized with the recombinant GNVPs and then challenged with the murine Plasmodium yoelii parasite showed a lower degree of parasitemia and a longer survival rate compared to mice immunized with non-recombinant GVNPs (39). As P. falciparum does not infect mice, P. yoelli is routinely used for studies in mouse models (43). Likewise, the P. falciparum circumsporozoite protein was successfully expressed on the GVNP surface. However, the induced immune responses to this antigen have not yet been assessed (36, 44).

ADVANTAGES AND LIMITATIONS OF ARCHAEOSOME AND GAS VESICLE VACCINE APPLICATIONS

Compared to liposomes, archaeosomes are characterized by greater resistance to high and low pH and temperature extremes, stronger resistance to oxidative stress, chemical hydrolysis and bile salts, lower proton permeability and a stronger immunostimulatory effect (12-14, 16). The thermostability of archaeosomes enables their sterilization and ensures their stability even without a cold chain (12, 17). Studies have also demonstrated that they are well tolerated when injected intradermally, do not induce toxic and other adverse effects in vaccinated animals, which indicates a good safety profile (12 - 14).

The lipid composition of archaea includes a wide range of natural

7

lipids, which is specific for each cell and changes throughout the growth phases of the culture. This precludes homogeneity among vaccine batches (18, 28). However, this problem has been solved by the development of semi-synthetic SLA archaeosomes, which improves the consistency of the lipid composition of the vaccines, while providing a greater or similar adjuvant effect as compared to natural archaeosomes (14–16, 25, 29).

A second limitation is that the encapsulated archaeosome formulation has a low efficiency of entrapping antigens, ranging from 5-40%, which results in loss of antigen during production and thus increased production costs, as well as uneven antigen-lipid ratios in the vaccine batches (16, 29). The admixed formulation has been proposed as the solution to the variations in the amounts of encapsulated antigens. Admixed formulations result in less antigen loss than encapsulated archaeosomes, hence the production cost is lower and the antigen-lipid ratio and lot consistency are easier to control (29).

GVNPs also present great biological stability, including resistance to chemical and enzymatic degradation, as well as high thermal stability, as they can be stored for several months at room temperature and even at 50°C (36, 39, 43). In addition, they show high biocompatibility and induce strong systemic immunity after both subcutaneous and intraperitoneal administration, without causing adverse post-vaccination events and systemic or local toxic effects (36). Gas vesicles induce stronger immune responses than subunit vaccines and are generally safer than attenuated vaccines, which suggests their potential use for immune-compromised subjects (36, 39). As the development of GVNP-based vaccines requires the use of genetic engineering technologies, their technical limitations are directly linked to the limitations of genetic engineering applicable to archaea. Antigens suitable for GVNP-based vaccines are limited to protein and peptide antigens. Furthermore, if precise posttranslational modifications of proteins or peptides, such as glycosylation, are critical for the induction of protective immunity, it will be challenging to generate them in GVNPs. Therefore, the GVNP technology may be most suited for bacterial protein antigens, and only to a limited extend for viral, eucaryotic and cancer antigens.

Table 2 summarizes the features of both archaeal vaccine carriers. Archaeosomes are liposomes composed of ether lipids obtained from methanogenic, halophilic and thermophilic archaea. GVNPs are empty, protein organelles, not only produced by halophilic and methanogenic archaea, but also by bacteria. Studies on archaeal antigen carriers showed the great potential of halophilic archaea in vaccine development. This is especially the case for halophilic H. salinarum which is a leading producer of GVNPs and lipids used in archaeosome production (Table 1). Archaeosomes, unlike GVNPs, do not require genetic engineering technologies for vaccine production and provide possibilities for modifications, such as chemical modifications of the lipid components to obtain SLA archaeosomes. Archaeosomes allow for both the presentation of antigens on their surface and the release of antigens from their interior, whereas GVNPs allow for the presentation of antigens only on their surface. The cargos presented by archaeosomes include proteins and plasmid DNA, potentially even mRNA, while GVNPs present only fragments of proteins. However, both carriers have successfully displayed viral, bacterial, and eukaryotic antigens, although so far, only archaeosomes have been used to present tumor antigens. Furthermore, both carriers share the ability to effectively induce cellular and humoral immunity and an excellent safety profile in animal models. However, no studies have yet been conducted to compare the immunostimulatory capabilities of these two archaeal vaccine carriers in head-to-head evaluations. Table 3 summarizes information regarding the route of vaccination and the size of archeosomes and gas vesicles in different disease models.

The structure of archaeosomes offers the possibility of improving their formulation and adapting them to generate the desired type of immune responses, which is their strong advantage over GVNPs. This is reflected by the strong interest of investigators in the semi-synthetic SLA and admixed formulations of the archaeosomes. Recent studies have now engaged in comparisons of different archaeosomes aiming at determining the optimal formulations for a given antigen and comparing their immunostimulatory abilities to commonly used commercial adjuvants (16).

	ARCHAEOSOMES	GVNPs
Definition	liposomes composed of ether lipids	empty, proteinaceous organella
Producers	methanogenic, halophilic and thermophilic archaea	cyanobacteria, proteobacteria, methanogenic and halophilic archae
Leading producer	Halobacterium salinarum	Halobacterium salinarum
Production process	does not require genetic engineering methods	requires genetic engineering methods
Semi-synthetic formulation	+	
Antigen presentation	released from archaeosome and presented on archaeosome	presented on GVNP surface
	surface	
Types of antigens	proteins, long peptides, DNA	protein fragments
Source of antigens	viral, bacterial, eucaryotic	viral, bacterial, eucaryotic
Tumor antigens	+	-
presentation		
Induced response	humoral and cellular	humoral and cellular
Safety of use	+	+

8

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

	Mode of delivery/route of vaccination	Size (diameter) [nm]	Disease model/antigen	Reference
ARCHAEOSOMES	subcutaneously	• 100-200	melanoma	• (18)
	intramuscularly	• NS	 influenza virus 	 (15)
	 subcutaneously 	 159-271 	melanoma	• (29)
	 subcutaneously 	• 564	 Chagas disease 	 (32)
	 subcutaneously 	• 99.15	 listeriosis 	 (33)
	 subcutaneously 	 NS 	 tuberculosis 	 (34)
	 subcutaneously 	 127-429 	 cervical cancer 	• (13)
	intramuscularly	• 92-266	 hepatitis 	• (11)
	 subcutaneously 	 172-202 	 melanoma 	 (25)
	intramuscularly	 159-271 	HCV	 (26)
	 intramuscularly 	• NS	 schistosomiasis 	 (35)
	 intraperitoneally 	• 63-207	 BSA, OVA, HEL 	• (9)
	intramuscularly	 130-220 	 cholera toxin B subunit 	• (38)
	 subcutaneously 	• 50-100	 listeriosis 	 (45)
	intraperitoneally	• 100	tularemia	 (46)
	 subcutaneously 	 150-300 	 OVA 	• (21)
	intranasally			
	transdermal			
GVNPs	intraperitoneally	• NS	 salmonellosis 	• (36)
	 in vitro analysis 	• 300	malaria	• (44)
	 in vitro analysis 	• NS	trachoma	• (47)
	subcutaneously	• NS	• SIV	• (10)

TABLE 3 | Particle size and the mode of delivery of the archaeosomes and gas vesicles in different disease models.

NS, non-specified; BSA, Bovine Serum Albumin; OVA, ovalbumin; HEL, hen egg lysozyme; SIV, simian immunodeficiency virus

CONCLUSION

Although both archaeosomes and GVNPs are able to effectively present exogenous antigens and induce strong cellular and humoral responses, as well as cellular memory, so far, all *in vivo* studies on archaeosomes and GVNPs have been conducted only in murine models. Immunogenicity, vaccine efficacy and safety studies in other animals, including humans, are lacking. It remains therefore be investigated whether the properties of GVNPs and archaeosomes observed in murine models can be extrapolated to vaccine-target animal species, including humans. If lot consistency issues can be solved in a satisfactory manner and acceptable safety and immunogenicity can be established, GVNP and archaeosome-based vaccines may be powerful nextgeneration tools for the prevention and treatment of a wide variety of infectious and non-infectious diseases.

While most investigations have carried out with the intramuscular, intraperitoneal or subcutaneous route of vaccination, alternative routes, such as transdermal or mucosal routes may be attractive alternatives, as they are needle free and may induce potent mucosal immunity in addition to systemic immunity. Several studies on these alternative routes have been performed with archaeosomes, but these routes have yet attracted limited attention for GVNPs, although one study has explored the transdermal route of vaccination with GVNPs (48). While GVNPs, like archaeosomes have in-built adjuvant

REFERENCES

- Cabrera MA, Blamey JM. Biotechnological Applications of Archaeal Enzymes From Extreme Environments. *Biol Res* (2018) 51(1):37. doi: 10.1186/s40659-018-0186-3
- Coker JA. Extremophiles and Biotechnology: Current Uses and Prospects. F1000Res (2016) 5:396. doi: 10.12688/f1000research.7432.1

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

properties, the addition of exogenous adjuvants that orient and further strengthen the desired immune responses have only recently started to be explored for archaeosomes, but have not yet been investigated with GVNPs. Together with targeting relevant species, other than mice, for given diseases that need to be assessed for the potency of archaeosomes and GVNPs, investigations of alternative vaccination routes and adjuvant combinations may reveal the true potential of these archaeal vaccine carriers and may help to generate interest of developers of vaccines for human or animal use.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NA and MK-K conceptualized the manuscript. NA and MK-K wrote the original draft. CL made substantial contributions to discussions of the content and revised the manuscript. KK contributed to design and table content and manuscript editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the National Science Centre grant no 2017/27/N/NZ6/02850.

 Kumar V, Tiwari SK. Halocin Diversity Among Halophilic Archaea and Their Applications. In: Satyanarayana T, Johri BN, Das SK, editors. Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications. Singapore: Springer Singapore (2019). p. 497–532.

September 2021 | Volume 12 | Article 746235

9

Corral P, Amoozegar MA, Ventosa A. Halophiles and Their Biomolecules: Recent Advances and Future Applications in Biomedicine. *Mar Drugs* (2019) 18(1):33. doi: 10.3390/md18010033

- Pecher WT, Al Madadha ME, DasSarma P, Ekulona F, Schott EJ, Crowe K, et al. Effects of Road Salt on Microbial Communities: Halophiles as Biomarkers of Road Salt Pollution. *PloS One* (2019) 14(9):e0221355. doi: 10.1371/journal.pone.0221355
- O'Connor EM, Shand RF. Halocins and Sulfolobicins: The Emerging Story of Archaeal Protein and Peptide Antibiotics. J Ind Microbiol Biotechnol (2002) 28(1):23–31. doi: 10.1038/sj/jim/7000190
- Marrack P, McKee AS, Munks MW. Towards an Understanding of the Adjuvant Action of Aluminium. Nat Rev Immunol (2009) 9(4):287–93. doi: 10.1038/nri2510
- Pulendran B, Arunachalam PS, O'Hagan DT. Emerging Concepts in the Science of Vaccine Adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* (2021) 20(6):454–75. doi: 10.1038/s41573-021-00163-y
- Krishnan L, Dicaire CJ, Patel GB, Sprott GD. Archaeosome Vaccine Adjuvants Induce Strong Humoral, Cell-Mediated, and Memory Responses: Comparison to Conventional Liposomes and Alum. *Infect Immun* (2000) 68 (1):54–63. doi: 10.1128/IAI.68.1.54-63.2000
- Stuart ES, Morshed F, Sremac M, DasSarma S. Cassette- Based Presentation of SIV Epitopes With Recombinant Gas Vesicles From Halophilic Archaea. J Biotechnol (2004) 114(3):225–37. doi: 10.1016/j.biotec.2004.01.005
- Akache B, Stark FC, Jia Y, Deschatelets L, Dudani R, Harrison BA, et al. Sulfated Archaeol Glycolipids: Comparison With Other Immunological Adjuvants in Mice. *PloS One* (2018) 13(12):e0208067. doi: 10.1371/ journal.pone.0208067
- Kaur G, Garg T, Rath G, Goyal AK. Archaeosomes: An Excellent Carrier for Drug and Cell Delivery. Drug Delivery (2016) 23(7):2497–512. doi: 10.3109/ 10717544.2015.1019653
- Karimi H, Soleimanjahi H, Abdoli A, Banijamali RS. Combination Therapy Using Human Papillomavirus L1/E6/E7 Genes and Archaeosome: A Nanovaccine Confer Immuneadjuvanting Effects to Fight Cervical Cancer. Sci Rep (2020) 10(1):5787. doi: 10.1038/s41598-020-62448-3
- Akache B, Stark FC, Iqbal U, Chen W, Jia Y, Krishnan L, et al. Safety and Biodistribution of Sulfated Archaeal Glycolipid Archaeosomes as Vaccine Adjuvants. *Hum Vaccin Immunother* (2018) 14(7):1746–59. doi: 10.1080/ 21645515.2017.1423154
- Stark FC, Akache B, Ponce A, Dudani R, Deschatelets L, Jia Y, et al. Archaeal Glycolipid Adjuvanted Vaccines Induce Strong Influenza-Specific Immune Responses Through Direct Immunization in Young and Aged Mice or Through Passive Maternal Immunization. Vaccine (2019) 37(47):7108–16. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.07.010
- Agbayani G, Jia Y, Akache B, Chandan V, Iqbal U, Stark FC, et al. Mechanistic Insight Into the Induction of Cellular Immune Responses by Encapsulated and Admixed Archaeosome-Based Vaccine Formulations. *Hum Vaccin Immunother* (2020) 16(9):2183–95. doi: 10.1080/21645515.2020
- Vazzana M, Fangueiro J, Faggio C, Santini A, Souto EB. Archaeosomes for Skin Injuries. In: Ascenso A, Simoes S, Ribeiro H, editors. Carrier-Mediated Dermal Delivery: Applications in the Prevention and Treatment of Skin Disorders. Singapore Pan Stanford Publishing Pte. Ltd (2016). p. 323–55.
- Jia Y, Akache B, Deschatelets I, Qian H, Dudani R, Harrison BA, et al. A Comparison of Immune Responses Induced by Antigens in Three Different Archaeosome-Based Vaccine Formulations. *Int J Pharm* (2019) 561:187–96. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.02.041
- Caimi AT, Parra F, de Farias MA, Portugal RV, Perez AP, Romero EL, et al. Topical Vaccination With Super-Stable Ready to Use Nanovesicles. *Colloids* Surf B Biointerfaces (2017) 152:114–23. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.12.039
- Caimi AT, Altube MJ, de Farias MA, Portugal RV, Perez AP, Romero EL, et al. Novel Imiquimod Nanovesicles for Topical Vaccination. *Colloids Surf B Biointerfaces* (2019) 174:536–43. doi: 10.1016/i.colsurfb.2018.11.031
- Jia Y, McCluskie MJ, Zhang D, Monette R, Iqbal U, Moreno M, et al. In Vitro Evaluation of Archaeosome Vehicles for Transdermal Vaccine Delivery. *Liposome Res* (2018) 28(4):305–14. doi: 10.1080/08982104.2017.1376683
- Higa LH, Arnal L, Vermeulen M, Perez AP, Schilrreff P, Mundina-Weilenmann C, et al. Ultradeformable Archaeosomes for Needle Free Nanovaccination With Leishmania Braziliensis Antigens. *PloS One* (2016) 11(3):e0150185. doi: 10.1371/journal.pone.0150185
- Li Z, Zhang L, Sun W, Ding Q, Hou Y, Xu Y. Archaeosomes With Encapsulated Antigens for Oral Vaccine Delivery. Vaccine (2011) 29 (32):5260-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.015

- Patel GB, Chen W. Archaeal Lipid Mucosal Vaccine Adjuvant and Delivery System. Expert Rev Vaccines (2010) 9(4):431–40. doi: 10.1586/erv.10.34
- McCluskie MJ, Deschatelets L, Krishnan L. Sulfated Archaeal Glycolipid Archaeosomes as a Safe and Effective Vaccine Adjuvant for Induction of Cell-Mediated Immunity. *Hum Vaccin Immunother* (2017) 13(12):2772–9. doi: 10.1080/21645515.2017.1316912
- Akache B, Deschatelets L, Harrison BA, Dudani R, Stark FC, Jia Y, et al. Effect of Different Adjuvants on the Longevity and Strength of Humoral and Cellular Immune Responses to the HCV Envelope Glycoproteins. *Vaccines (Basel)* (2019) 7(4):204. doi: 10.3390/vaccines7040204
- Haq K, Jia Y, Krishnan L. Archaeal Lipid Vaccine Adjuvants for Induction of Cell-Mediated Immunity. *Expert Rev Vaccines* (2016) 15(12):1557–66. doi: 10.1080/14760584.2016.1195265
- Sprott GD, Yeung A, Dicaire CJ, Yu SH, Whitfield DM. Synthetic Archaeosome Vaccines Containing Triglyccosylarchaeols can Provide Additive and Long-Lasting Immune Responses That Are Enhanced by Archaetidylserine. Archaea (2012) 2012:513231. doi: 10.1155/2012/513231
- Stark FC, Ágbayani G, Sandhu JK, Akache B, McPherson C, Deschatelets L, et al. Simplified Admix Archaeal Glycolipid Adjuvanted Vaccine and Checkpoint Inhibitor Therapy Combination Enhances Protection From Murine Melanoma. Biomedicines (2019) 7(4):91. doi: 10.3390/biomedicines7040091
- Jia Y, Akache B, Agbayani G, Chandant V, Dudani R, Harrison BA, et al. The Synergistic Effects of Sulfated Lactosyl Archaeol Archaeosomes When Combined With Different Adjuvants in a Murine Model. *Pharmaceutics* (2021) 13(2):205. doi: 10.3390/pharmaceutics13020205
- Akache B, Agbayani G, Stark FC, Jia Y, Dudani R, Harrison BA, et al. Sulfated Lactosyl Archaeol Archaeosomes Synergize With Poly(I:C) to Enhance the Immunogenicity and Efficacy of a Synthetic Long Peptide-Based Vaccine in a Melanoma Tumor Model. *Pharmaceutics* (2021) 13(2):257. doi: 10.3390/ pharmaceutics13020257
- Higa LH, Corral RS, Morilla MJ, Romero EL, Petray PB. Archaeosomes Display Immunoadjuvant Potential for a Vaccine Against Chagas Disease. Hum Vaccin Immunother (2013) 9(2):409–12. doi: 10.4161/hv.22780
- Ansari MA, Zubair S, Tufail S, Ahmad E, Khan MR, Quadri Z, et al. Ether Lipid Vesicle-Based Antigens Impart Protection Against Experimental Listeriosis. Int J Nanomedicine (2012) 7:2433–47. doi: 10.2147/IJN.S25875
- Ansari MA, Zubair S, Mahmood A, Gupta P, Khan AA, Gupta UD, et al. RD Antigen Based Nanovaccine Imparts Long Term Protection by Inducing Memory Response Against Experimental Murine Tuberculosis. *PloS One* (2011) 6(8):e22889. doi: 10.1371/journal.pone.0022889
- Perera DJ, Hassan AS, Jia Y, Ricciardi A, McCluskie MJ, Weeratna RD, et al. Adjuvanted Schistosoma Mansoni-Cathepsin B With Sulfated Lactosyl Archaeol Archaeosomes or Addavax[™] Provides Protection in a Pre-Clinical Schistosomiasis Model. Front Immunol (2020) 11:605288. doi: 10.3389/ fimmu.2020.605288
- DasSarma S, DasSarma P. Gas Vesicle Nanoparticles for Antigen Display. Vaccines (Basel) (2015) 3(3):686–702. doi: 10.3390/vaccines3030686
- Krishnan L, Deschatelets L, Stark FC, Gurnani K, Sprott GD. Archaeosome Adjuvant Overcomes Tolerance to Tumor-Associated Melanoma Antigens Inducing Protective CD8 T Cell Responses. Clin Dev Immunol (2010) 2010;578432. doi: 10.1155/2010/578432
- Sprott GD, Tolson DL, Patel GB. Archaeosomes as Novel Antigen Delivery Systems. FEMS Microbiol Lett (1997) 154(1):17–22. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12618.x
- Hill AM, Salmond GPC. Microbial Gas Vesicles as Nanotechnology Tools: Exploiting Intracellular Organelles for Translational Utility in Biotechnology, Medicine and the Environment. *Microbiol (Reading)* (2020) 166(6):501–9. doi: 10.1099/mic.0.000912
- Upadhyay P, Nagarkar A, Jain D, Anil A. Understanding Gas Vesicles and Its Scope in Biotechnological Applications. Adv Biotech Micro (2018) 11(2):1–3. doi: 10.19080/AIBM.2018.11.555806
- Winter K, Born J, Pfeifer F. Interaction of Haloarchaeal Gas Vesicle Proteins Determined by Split-GFP. Front Microbiol (2018) 9:1897. doi: 10.3389/ fmicb.2018.01897
- DasSarma P, Negi VD, Balakrishnan A, Kim JM, Karan R, Chakravortty D, et al. Haloarchaeal Gas Vesicle Nanoparticles Displaying Salmonella Antigens as a Novel Approach to Vaccine Development. Proc Vaccinol (2015) 9:16–23. doi: 10.1016/j.provac.2015.05.003

10

- Minkah NK, Schafer C, Kappe SHI. Humanized Mouse Models for the Study of Human Malaria Parasite Biology, Pathogenesis and Immunity. Front Immunol (2018) 9:807. doi: 10.3389/fimmu.2018.00807
- Pecher WT, Kim J-M, DasSarma P, Karan R, Sinnis P, DasSarma S. Halobacterium Expression System for Production of Full-Length Plasmodium Falciparum Circumsporozoite Protein. In: Rampelotto PH, editor. Biotechnology of Extremophiles. Grand Challenges in Biology and Biotechnology, vol. Cham: Springer International Publishing (2016). p. 699-709.
 Conlan JW, Krishnan L, Willick GF, Patel GB, Sprott GD. Immunization of
- Conlan JW, Krishnan L, Willick GF, Patel GB, Sprott GD. Immunization of Mice With Lipopeptide Antigens Encapsulated in Novel Liposomes Prepared From the Polar Lipids of Various Archaeobacteria Elicits Rapid and Prolonged Specific Protective Immunity Against Infection With the Facultative Intracellular Pathogen, Listeria Monocytogenes. *Vaccine* (2001) 19:3509–17. doi: 10.1016/s0264-410x(01)00041-x
 Patel G, Zhou H, Ponce A, Harris G, Chen W, Intranasal Immunization With
- Patel G, Zhou H, Ponce A, Harris G, Chen W. Intranasal Immunization With an Archaeal Lipid Mucosal Vaccine Adjuvant and Delivery Formulation Protects Against a Respiratory Pathogen Challenge. *PlosOne* (2010) 5: e15574. doi: 10.1371/journal.pone.0015574
- Childs TS, Webley W. In Vitro Assessment of Halobacterial Gas Vesicles as a Chlamydia Vaccine Display and Delivery System. Vaccine (2012) 30 (41):5942-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.038

 Andar AU, Karan R, Pecher WT, DasSarma P, Hedrich WD, Stinchcomb AL, et al. Microneedle-Assisted Skin Permeation by Nontoxic Bioengineerable Gas Vesicle Nanoparticles. Mol Pharm (2017) 14(3):953–8. doi: 10.1021/ acs.molpharmaceut.6b00859

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Adamiak, Krawczyk, Locht and Kowalewicz-Kulbat. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

11

I.6. Charakterystyka komórek dendrytycznych

Za odkrywcę komórek dendrytycznych (KD) uznaje się prof. Ralpha Steinmana z Instytutu Rockefellera, USA, który w latach 1973-1974 opublikował trzy prace na modelu mysim, w których opisał bardzo rzadkie komórki obecne we krwi (<1% komórek adherentnych), o nieregularnych kształtach, z widocznymi wypustkami (dendrytami), o większej ruchliwości oraz o słabszych zdolnościach fagocytujących niż makrofagi [45-48]. Steinman nazwał nowoodkryte komórki "komórkami dendrytycznymi", lecz nie miał pewności co do ich roli jaką pełnią w układzie odpornościowym [45-48]. Nowo odkryte komórki zostały następnie zidentyfikowane w różnych narządach limfatycznych (śledziona, węzły chłonne, kępki Peyera), gdzie stanowiły do 1% jednojądrzastych komórek adherentnych. Ponadto, w pracy opublikowanej w 1978 r. [49] Steinman wykazał, iż KD mają zdolność do stymulacji mieszanych populacji leukocytów. W 1982 r. zespół naukowców pod kierownictwem Steinmana po raz pierwszy opisał występowanie KD w organizmie człowieka [50]. Za swoje odkrycia prof. Ralph Steinman został w 2011 r. uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny [51].

Komórki dendrytyczne pełnią kluczową rolę w układzie odpornościowym, odpowiadając za inicjację oraz kontrolę odpowiedzi adaptacyjnej swoistej na obce antygeny [52, 53]. Głównym zadaniem komórek dendrytycznych jest łączenie cech wrodzonej oraz nabytej odpowiedzi immunologicznej przez wychwytywanie, przetwarzanie oraz prezentację antygenów białkowych limfocytom T w kontekście cząsteczek MHC (ang. *major histocompatibility complex,* główny układ zgodności tkankowej) [54].

Komórki dendrytyczne człowieka stanowią heterogenną populację komórek, które na podstawie ontogenezy, fenotypu i profilu transkrypcyjnego podzielono na liczne subpopulacje [53, 55]. Ostatnie lata zaowocowały poszerzeniem wiedzy na ich temat – zostały opisane m.in. czynniki transkrypcyjne KD oraz charakterystyczne receptory [52]. Obecnie wyróżnia się następujące subpopulacje komórek dendrytycznych: plazmocytoidalne DC (ang. *dendritic cells*, komórki dendrytyczne), mieloidalne cDC1 oraz cDC2, komórki Langerhansa, komórki pre-DC, Mo-DC (ang. *monocyte-derived dendritic cells*, komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego) oraz nie-klasyczne monocyty [52].

Komórki dendrytyczne charakteryzują się obecnością wielu receptorów zaangażowanych w kontrolowanie pracy układu odpornościowego. KD posiadają m.in. receptory PRR (ang. *pattern recognition receptors*, receptory rozpoznające wzorce) rozpoznające PAMP (ang. *pathogen-associated molecular patterns*, wzorce molekularne związane z patogenami), jak CD (ang. *cluster of differentiation*, kompleks różnicowania) 207 rozpoznający mannozę, czy CD369 będący receptorem dla β-glukanu; receptory "zmiatacze", jak CD36 rozpoznający m.in. kolagen i zaangażowany w fagocytozę komórek apoptotycznych; receptory TLR (ang. *toll-like receptors*, receptory *toll*-podobne) (TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10); receptory rozpoznające sygnały śmierci komórkowej (np. P2RX7 rozpoznający ATP), receptory dla fragmentów Fc przeciwciał oraz adhezyny i białka ułatwiające migrację komórek [56].

Komórki dendrytyczne występujące naturalnie we krwi obwodowej stanowia mniej niż 1% wszystkich leukocytów [56]. By umożliwić badania in vitro nad komórkami dendrytycznymi, opracowano metodę przekształcania monocytów w komórki dendrytyczne w środowisku IL-4 oraz GM-CSF [57], otrzymując niedojrzałe komórki dendrytyczne charakteryzujące się niską ekspresją cząsteczek MHC klasy II, cząsteczek ko-stymulujących oraz niewielka produkcja cytokin [57, 58]. Przy braku rozpoznanych patogenów, niedojrzałe KD migrują do węzłów chłonnych, gdzie prezentują "własne" antygeny, dzięki czemu utrzymywana jest tolerancja immunologiczna na nie [58]. Niedojrzałe KD mogą przekształcić się dalej w dojrzałe komórki dendrytyczne w warunkach in vitro dzięki stymulacji w środowisku LPS, TNF-a (tumor necrosis factor, czynnik martwicy nowotworów), IFN-γ lub CD40L [57]. Wysoka ekspresja receptorów C-lektynowych jak DC-SIGN (ang. Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin, swoista dla komórek dendrytycznych nieintegryna wiążąca ICAM-3), CLEC-1, czy DEC-205 na niedojrzałych KD umożliwia wychwyt antygenów o charakterze glikopeptydowym i glikolipidowym. Niedojrzałe KD charakteryzują się również słabą zdolnością do produkcji cytokin [58]. W wyniku kontaktu z antygenem KD dojrzewa, co objawia się spadkiem ekspresji receptorów lektynowych i nasileniem ekspresji cząsteczek MHC oraz receptorów tworzących synapsę immunologiczną. Dojrzałe KD produkują więcej cytokin niż komórki niedojrzałe [58]. Różnice między KD niedojrzałymi oraz dojrzałymi komórkami dendrytycznymi zostały przedstawione na Rycinie 4 [Ryc. 4.].



Ryc. 4. Różnice między niedojrzałymi oraz dojrzałymi komórkami dendrytycznymi [58]. DC – komórka dendrytyczna, CD -, kompleks różnicowania, low – niska ekspresja, high – wysoka ekspresja, MHC - główny układ zgodności tkankowej, CCR – receptor chemokin CC, CCL – ligand chemokin CC.

I.6.1. Komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego

Termin komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego (Mo-DC) odnosi się do subpopulacji komórek dendrytycznych, które wywodzą się z monocytów infiltrujących tkanki objęte stanem zapalnym [59]. U ludzi, Mo-DC zostały opisane w wielu schorzeniach związanych

z występowaniem stanu zapalnego, m.in. w nowotworach, alergii, przewlekłych stanach zapalnych oraz infekcjach [59]. Według Tang i wsp. [60] Mo-DC posiadają fenotyp: CD1a⁺, CD80⁺, CD86⁺, CD83⁻, CD14⁺, CD56⁻, CD3⁻ oraz CD19⁻ [60]. Badania *ex-vivo* wykazały, że Mo-DC wydzielają IL-1, TNF- α , IL-12 i IL-23 oraz stymulują limfocyty T CD4⁺ i limfocyty T CD8⁺ [52]. Zdolność monocytów do przekształcania w komórki dendrytyczne jest szeroko stosowana w badaniach *in vitro*. Najczęściej spotykaną metodą różnicowania jest hodowla monocytów uzyskanych z krwi obwodowej w podłożu hodowlanym z dodatkiem GM-CSF oraz IL-4 przez minimum 6 dni, w celu otrzymania niedojrzałych komórek dendrytycznych, które nie miały kontaktu z antygenem [61].

I.6.2. Synapsa immunologiczna

Synapsą immunologiczną nazywamy specyficzne połączenie pomiędzy APC (ang. *antigenpresenting cells*, komórki prezentujące antygen), a limfocytem T [62]. Powstanie synapsy inicjowanie jest poprzez interakcję między TCR (ang. *T-cell receptor*, receptor limfocytu T) i białkami MHC, w kontekście których prezentowany jest antygen. Zarówno receptory TCR jak i białka MHC znajdują się w błonie komórkowej, odpowiednio, limfocytów T i komórek dendrytycznych prezentujących antygen, tak więc konieczny jest bezpośredni kontakt między dwiema komórkami [62].

Na poziomie molekularnym synapsę immunologiczną można porównać do tarczy gdzie centralne miejsce zajmuje kompleks TCR-MHC, otoczony przez kompleksy białek LFA (ang. *leukocyte function-associated antigen*, antygen powiązany z funkcjami leukocytów)-1 – ICAM (ang. *intercellular adhesion molecule*, cząsteczka adhezji międzykomórkowej)-1 oraz inne białka biorące udział w aktywacji limfocytów, m.in. CD45. Pierwszym etapem tworzenia synapsy jest wiązanie się KD z limfocytem, warunkowane łączeniem integryn ICAM-1 (KD) z LFA-1 (limfocyt) lub ICAM-3 z LFA-1 [63]. W kolejnym etapie następuje prezentacja antygenu.

Prawidłowa prezentacja antygenu w synapsie immunologicznej wymaga trzech sygnałów. Sygnał pierwszy powstaje w wyniku bezpośredniego kontaktu cząsteczek MHC prezentujących antygen z receptorem TCR obecnym na powierzchni limfocytu T. Drugi sygnał dostarczają cząsteczki kostymulujące obecne na powierzchni KD: CD40, CD86, CD80, PD-L1 oraz cząsteczki: CD40L, CD28, CTLA-4 (ang. *cytotoxic T cell antigen 4*, antygen-4 limfocytów cytotoksycznych T), PD-1 (ang. *programmed death receptor 1*, receptor programowanej śmierci 1) będące na powierzchni limfocytu T, które wzmacniają lub hamują aktywację limfocytu T. Oddziaływanie receptorów CD40 – CD40L prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu komórek [64]. Ligandem dla receptorów CD86/CD80 jest cząsteczka CD28 na powierzchni limfocytów, a także CTLA-4 oraz PD-1. Trzeci sygnał stanowią cytokiny (m.in. IL-12) wydzielane przez KD jako APC, które mają polaryzować odpowiedź odpornościową limfocytów T [58]. Schemat prezentacji antygenu przez KD oraz wszystkie opisane wyżej sygnały przedstawiono na Rycinie 5 [Ryc. 5.].



Ryc. 5. Synapsa immunologiczna między komórką dendrytyczną, a limfocytem T. Zaznaczono trzy sygnały aktywacji. W sygnale II strzałki oznaczają podwyższenie lub obniżenie aktywacji limfocytu T [58] (zmodyfikowane). KD – komórka dendrytyczna, CD -, kompleks różnicowania, MHC - główny układ zgodności tkankowej, PD-1 – receptor programowanej śmierci 1, TCR – receptor limfocytów T, CTLA-4 – antygen-4 limfocytów cytotoksycznych T.

I.6.3. Wybrane receptory komórek dendrytycznych

• CD80/CD86

CD80 oraz CD86 to dwa receptory obecne na powierzchni komórek dendrytycznych, mające powinowactwo do receptora CD28 limfocytów T [65]. Łączenie CD28 z CD80/CD86 stanowi "drugi sygnał aktywacji" i skutkuje pobudzeniem limfocytów T, co przejawia się m.in. produkcją cytokin [66].

• CD40

Receptor CD40 jest obecny na powierzchni wielu typów komórek, m.in. limfocytów B, limfocytów T, monocytów oraz komórek dendrytycznych. Jego ligandem jest receptor CD40L, występujący głównie na powierzchni limfocytów T CD4⁺ [67]. Interakcja CD40 oraz CD40L stymuluje przeżywalność KD, ich dojrzewanie oraz sekrecję cytokin (m.in. IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α) [68].

• CD83

Receptor CD83 jest opisywany głównie jako marker dojrzałych komórek dendrytycznych (zarówno u człowieka, jak i u myszy) [69].

• DC-SIGN

DC-SIGN jest receptorem obecnym na powierzchni zarówno niedojrzałych, jak i dojrzałych KD. Główną funkcją DC-SIGN jest rozpoznawanie oraz wiązanie glikoprotein bogatych w mannozę, występujących na powierzchni drobnoustrojów [70].

• TLR

Receptory TLR stanowią grupę receptorów rozpoznających określone struktury mikroorganizmów. U ssaków, receptory TLR są syntetyzowane w retikulum endoplazmatycznym, a następnie transportowane do określonych miejsc w komórce. TLR4 rozpoznaje LPS, TLR5 flagelinę, TLR1, TLR2 i TLR6 bakteryjne lipoproteiny, TLR3 dwuniciowy RNA, TLR7 i TLR8 jednoniciowe RNA, TLR9 niemetylowane wyspy CpG jednoniciowego DNA, TLR13 bakteryjne rybosomalne RNA. Dodatkowo, mysi TLR11 rozpoznaje białko (profilinę) *Toxoplasma gondii* [71].

I.7. Charakterystyka limfocytów T

Limfocyty T dojrzewają w grasicy, wykazują ekspresję receptora TCR i oraz glikoproteiny CD8 (limfocyty cytotoksyczne, CD8⁺) lub glikoproteiny CD4 (limfocyty pomocnicze, CD4⁺) [72, 73]. Obecnie podział limfocytów T obejmuje: limfocyty pomocnicze, limfocyty cytotoksyczne, limfocyty regulatorowe T, limfocyty T dziewicze oraz limfocyty T pamięci [73, 74].

Limfocyty pomocnicze CD4⁺ różnicują się w różne subpopulacje m.in. limfocyty Th1, Th2, czy Th17, które charakteryzuja się odrębnym profilem uwalnianych cytokin [72]. Kiedy komórka APC prezentuje antygen dziewiczym limfocytom T CD4⁺, limfocyty ulegają aktywacji [72], co prowadzi do ich proliferacji, różnicowania się do komórek efektorowych oraz migrację do miejsca lokalizacji obcego antygenu [72]. Około 90-95% aktywowanych limfocytów ulega apoptozie, natomiast pozostałe 5-10% limfocytów, w odpowiedzi na antygen, różnicuje się w komórki pamięci [74]. Limfocyty T pamięci stanowia heterogenna grupę komórek i pełnią różne role, w zależności od fenotypu [75]. Wyróżnia się kilka rodzajów limfocytów T pamięci. Limfocyty T pamięci centralnej obecne są w obwodowych narządach limfatycznych takich jak węzły chłonne czy migdałki; charakteryzują się fenotypem: CD45RO, CCR7, CD62L, CD44, CD27, CD28, CD95, CD122 i wydzielaja IL-2, IL-4, IFN- γ oraz TNF- α . Druga subpopulacja sa limfocyty T pamieci efektorowej, obecne w narządach nie-limfatycznych takich jak płuca czy wątroba i opisywane są jako komórki wykazujące ekspresję: CD45RO, CD44, CD95, CD122 oraz brak ekspresji receptorów CD62L i CCR7. Komórki te produkują IL-4, IL-5 i IFN-γ oraz posiadają zdolność migracji z krwi obwodowej do tkanek. Trzecią grupą są limfocyty T pamięci obecne w tkankach. Stanowią one pierwszą linię obrony przeciwko patogenom, głównie w żeńskim układzie rozrodczym, w układzie pokarmowym, w płucach, w skórze oraz w mózgu. Wykazują ekspresję CD69, CD103, CD44 oraz brak ekspresji receptora CD62L [74].

Limfocyty T, które opuściły grasicę nazywane są limfocytami dziewiczymi (ang. *naive*). Posiadają one zdolność rozpoznawania własnych białek MHC, ale nie odpowiadają na nie pełną aktywacją. Ich przetrwanie jest zależne od ciągłego kontaktu z białkami MHC obecnymi na powierzchni komórek organizmu oraz od IL-7. Rolą limfocytów dziewiczych

jest odpowiedź na obce antygeny prezentowane przez komórki APC, co skutkuje ich przekształceniem w limfocyty efektorowe [75].

Różne subpopulacje limfocytów T CD4⁺ pełnią rozmaite funkcje. Limfocyty Th1 wydzielają m.in. IFN-γ i uczestniczą w odpowiedzi typu komórkowego skierowanej przeciwko patogenom wewnątrzkomórkowym. Limfocyty Th2 wydzielają IL-4, IL-5, IL-10 oraz IL-13 – cytokiny zaangażowane w odpowiedź odpornościową typu humoralnego przeciwko patogenom zewnątrzkomórkowym i pasożytom oraz w chorobach alergicznych. Limfocyty Th17 wydzielają IL-17, IL-6, TNF oraz GM-CSF i biorą udział w odpowiedzi na patogeny pochodzenia bakteryjnego i grzybiczego [76].

I.8. Wybrane cytokiny produkowane przez komórki dendrytyczne oraz limfocyty T

• **TNF-***α*

TNF jest cytokiną plejotropową, która ogrywa podwójną rolę w regulacji odpowiedzi odpornościowej, pełniąc funkcję prozapalną (inicjuje silną odpowiedź zapalną), jak i przeciwzapalną (hamuje rozwój procesów z autoimmunizacji oraz hamuje rozwój nowotworów). Cytokina ta bierze udział w obronie organizmu przeciw patogenom bakteryjnym, wirusowym, grzybiczym i pasożytniczym. Wysokie stężenie TNF-α może prowadzić do szoku septycznego [77].

• IFN-γ

Interferon-γ jest produkowany zarówno przez komórki odpowiedzi wrodzonej (m.in. makrofagi), jak i nabytej (limfocyty Th1, limfocyty cytotoksyczne, limfocyty B). Silna produkcja IFN-γ przez limfocyty Th1 aktywuje makrofagi do niszczenia drobnoustrojów oraz promuje cytotoksyczne właściwości innych komórek [77].

• IL-10

IL-10 jest cytokiną przeciwzapalną, produkowaną głównie przez monocyty makrofagi, KD, limfocyty T oraz limfocyty B. IL-10 oddziałuje na komórki prezentujące antygen zmniejszając ekspresję MHC kl. II na ich powierzchni. Ponadto, hamuje wydzielanie cytokin i chemokin prozapalnych oraz indukuje różnicowanie się limfocytów T w kierunku limfocytów T regulatorowych [77].

• IL-12

IL-12 (IL-12p70) ma formę heterodimeru złożonego z dwóch podjednostek: p35 oraz p40. Jest produkowana przez aktywowane monocyty, makrofagi, neutrofile oraz KD. Promuje przekształcanie się limfocytów dziewiczych w limfocyty efektorowe Th1, pobudzając je do wydzielania IFN-γ [77].

• IL-13

IL-13 jest produkowana głównie przez aktywowane limfocyty Th2, komórki tuczne oraz eozynofile. Aktywuje te same szlaki sygnałowe jak IL-4 i pobudza produkcję przeciwciał IgE przez limfocyty B. Bierze również udział w aktywacji oraz rekrutacji komórek tucznych i eozynofilów [77].

• IL-17A

IL-17A jest produkowana przez aktywowane limfocyty CD4⁺ Th17, ale jej ekspresja została również zaobserwowana m.in. w limfocytach CD8⁺, komórkach NK czy neutrofilach. IL-17A indukuje wytwarzanie chemokin rekrutujących neutrofile [77].

• IL-23

IL-23 zbudowana jest z podjednostki IL-12p40 oraz IL-23p19. Cytokina ta jest produkowana głównie przez makrofagi oraz aktywowane komórki dendrytyczne, bierze udział w powstawaniu limfocytów Th17, a także stymuluje wytwarzanie IFN- γ przez limfocyty T pomocnicze [77].

I.9. Toksyny gronkowcowe

Staphylococcus aureus (gronkowiec złocisty) jest powszechnie występującą bakterią Gramdodatnią, wywołującą choroby u ludzi i zwierząt, m.in. zatrucia pokarmowe, zakażenia skóry, zapalenie gardła, a nawet sepsę. *S. aureus* posiada liczne czynniki wirulencji, w tym adhezyny oraz toksyny [78]. Enterotoksyny gronkowcowe (ang. *staphylococcal enterotoxins*), posiadają cechy superantygenów – w niespecyficzny sposób aktywują limfocyty T, co prowadzi do ich proliferacji i nadmiernej aktywacji [79]. Toksyny gronkowcowe charakteryzują się zdolnością niespecyficznego aktywowania limfocytów T, co oznacza, że przyłączają się do fragmentów łańcucha receptora TCR nie zaangażowanych bezpośrednio w rozpoznawanie antygenu [79]. Enterotoksyna B *S. aureus* (ang. *Staphylococcal enterotoxin B*, SEB) jest najsilniejszą spośród enterotoksyn gronkowcowych (A, B, C, D, E, I) – w niskim stężeniu może doprowadzić do niewydolności wielonarządowej i śmierci (dawka śmiertelna powodująca zgon 50% populacji wynosi 0,02 μ g/kg masy ciała człowieka w przypadku drogi wziewnej) [80]. SEB jest białkiem o wadze 28 kDa, zbudowanym z 239 aminokwasów, rozpuszczalnym w wodzie, termolabilnym, odpornym na enzymy proteolityczne (m.in. pepsynę, trypsynę i papainę) [80].

Celami komórkowymi SEB są receptory TCR obecne na powierzchni limfocytów T oraz cząsteczki MHC kl. II na powierzchni APC. Aktywacja limfocytów T w wyniku niespecyficznego związania SEB skutkuje wydzieleniem dużych ilości cytokin, przede wszystkim IL-2, TNF-α oraz IFN-γ [80]. Badania *in vitro* nad aktywnością SEB wykonuje się głównie na splenocytach myszy oraz jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) człowieka [80]. W modelu wykorzystującym ludzkie KD CD11c⁺, wykazano, iż stymulacja superantygenem SEB prowadziła do dojrzewania komórek [81], co przejawiało się zwiększoną ekspresją receptorów CD86, CD80 oraz CD83 na powierzchni KD [81]. Wykazano również, iż stymulacja KD pochodzenia monocytarnego superantygenem SEB skutkowało nasiloną produkcją cytokin, m.in. TNF-α i IL-12p70 [82].

II. Cel pracy

Archeony halofilne to drobnoustroje występujące w środowisku ekstremalnym, zawierającym wysokie stężenie soli. Początkowo, drobnoustroje te były obiektem zainteresowań głównie mikrobiologów środowiskowych, z czasem ich produkty zostały opisane i wykorzystane w biotechnologii przemysłowej, a obecnie również w naukach medycznych. Pomimo coraz szerszej wiedzy na temat archeonów halofilnych i możliwości ich wykorzystania, nadal wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi, m.in.: jaka jest ich rola jako składnika ludzkiego mikrobiomu, czy ich obecność w środowisku wpływa w jakikolwiek sposób na organizm człowieka. Kluczowym w ocenie działania archeonów halofilnych na organizm człowieka wydaje się poznanie w jaki sposób układ odpornościowy rozpoznaje i odpowiada na antygeny tych drobnoustrojów oraz jakie jest działanie substancji o charakterze biologicznie czynnym produkowanych przez te drobnoustroje.

Niniejsza praca doktorska dotyczy oddziaływania archeonów halofilnych z komórkami układu odpornościowego człowieka – komórkami dendrytycznymi (profesjonalnymi komórkami prezentującymi antygen, zdolnymi do inicjowania i regulowania odpowiedzi odpornościowej) oraz limfocytami T.

Celem eksperymentalnej części pracy była charakterystyka wzbudzanej archeonami halofilnymi (*Halorhabdus rudnickae* oraz *Natrinema salaciae*) synapsy immunologicznej komórek dendrytycznych z komórkami limfoidalnymi izolowanymi z krwi obwodowej zdrowych, dorosłych osób oraz określenie właściwości protekcyjnych archeonów halofilnych w środowisku superantygenu – enterotoksyny B *Staphylococcus aureus* (SEB), w hodowlach *in vitro*.

Cele szczegółowe:

1. Charakterystyka oddziaływania archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* z ludzkimi komórkami dendrytycznymi.

2. Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych stymulowanych archeonami halofilnymi *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* oraz wytwarzania wybranych cytokin.

3. Ocena odpowiedzi cytokinowej limfocytów T CD4⁺ w ko-hodowlach z komórkami dendrytycznymi stymulowanymi archeonami halofilnymi *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae*.

4. Ocena właściwości protekcyjnych archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* wobec komórek dendrytycznych, przeciwko genotoksycznemu działaniu enterotoksyny B *S. aureus* (SEB) jako superantygenu.

5. Ocena wpływu archeonów halofilnych, *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae*, na zdolność tworzenia synapsy immunologicznej oraz aktywacji limfocytów T CD4⁺ przez komórki dendrytyczne w środowisku SEB.

III. Materiały i metody

III.1. Materialy

III.1.1. Materiał badany

Materiał badany stanowiły kożuszki leukocytarno-płytkowe o objętości około 60 ml uzyskane od 30 krwiodawców, zakupione w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa, znajdującym się przy ulicy Franciszkańskiej 17/25 w Łodzi. Od wszystkich dawców uzyskano pisemną zgodę na wykorzystanie materiału biologicznego w celach naukowych. Na wykonywanie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej (Uchwała nr 3/KBBN- UŁ/II/2017).

III.1.2. Szczepy archeonów halofilnych

W badaniach wykorzystano następujące szczepy archeonów halofilnych, uzyskane dzięki uprzejmości prof. Miltona Simõesa da Costa oraz dr Luciany Albuquerque z University of Coimbra w Portugalii:

- Halorhabdus rudnickae (Hrd. rudnickae) WSM-64^T (=DSM 29498^T =CECT 8673^T) oraz Hrd. rudnickae WSM-66^T wyizolowane z solanki pobranej z otworu E'632 znajdującego się na poeksploatacyjnym terenie obszaru górniczego "Barycz" należącego do Kopalni Soli "Wieliczka" (2016 r.) [39]
- Natrinema salaciae (N. salaciae) MDB25^T (=DSM 25055(T) =JCM 17869(T)) wyizolowany z solanki pochodzącej z Jeziora Medee z obszaru Morza Śródziemnego we Włoszech (2012 r.) [40]

III.1.3. Antygeny bakteryjne

- LPS (lipopolisacharyd) Escherichia coli O55:B5 o stężeniu końcowym 1 μg/ml (Sigma-Aldrich)
- SEB (enterotoksyna B Staphylococcus aureus) o stężeniu końcowym 1 μg/ml (Sigma-Aldrich)

Wszystkie antygeny bakteryjne przygotowano w sterylnej wodzie do iniekcji i przechowywano w -20°C.

III.1.4. Podłoża do hodowli archeonów halofilnych – *Halobacteria medium* (HBM)

- Podłoże płynne do hodowli *Hrd. rudnickae* WSM-64^T, *Hrd. rudnickae* WSM-66^T oraz *N. salaciae* MDB25^T
 - Ekstrakt drożdżowy; Biomaxima, 5 g
 - Kwaśny hydrolizat kazeiny; Merck, 5 g
 - o L-glutaminian sodu (C₅H₈NO₄Na); Aldrich Chemistry, 1 g
 - Chlorek potasu (KCl); POCH S.A 2 g
 - o Cytrynian sodu (Na₃C₆H₅O₇); Sigma-Aldrich, 3,4 g
 - Siarczan magnezu (MgSO₄ x 7 H₂O); Chempur 20 g
 - Chlorek żelaza (FeCl₃ x 4 H₂O); Sigma-Aldrich. 36 mg
 - $\circ~$ Chlorek manganu (MnCl_3 x 4 H₂O); Sigma-Aldrich, 360 μg
 - o Woda destylowana 1000 ml
 - Chlorek sodu (NaCl) 150 g (w przypadku podłoża dla *N. salaciae* MDB25^T),
 200 g (w przypadku podłoża dla *Hrd. rudnickae* WSM-64^T oraz *Hrd. rudnickae* WSM-66^T), P.P.H. STANLAB
- Podłoże stałe do hodowli *Hrd. rudnickae* WSM-64^T, *Hrd. rudnickae* WSM-66^T oraz *N. salaciae* MDB25^T
 - Ekstrakt drożdżowy; Biomaxima, 5 g
 - Kwaśny hydrolizat kazeiny; Merck, 5 g
 - \circ L-glutaminian sodu (C₅H₈NO₄Na); Aldrich Chemistry, 1 g
 - Chlorek potasu (KCl); POCH S.A 2 g
 - $\circ~$ Cytrynian sodu (Na_3C_6H_5O_7); Sigma-Aldrich, 3,4 g
 - o Siarczan magnezu (MgSO₄ x 7 H₂O); Chempur 20 g
 - Chlorek żelaza (FeCl₃ x 4 H₂O); Sigma-Aldrich, 36 mg
 - ο Chlorek manganu (MnCl₃ x 4 H₂O); Sigma-Aldrich, 360 μg
 - o Woda destylowana 1000 ml
 - o Agar mikrobiologiczny; Biomaxima, 20 g
 - Chlorek sodu (NaCl) 150 g (w przypadku podłoża dla *N. salaciae* MDB25^T),
 200 g (w przypadku podłoża dla *Hrd. rudnickae* WSM-64^T oraz *Hrd. rudnickae* WSM-66^T), P.P.H. STANLAB

III.1.5. Podłoża do hodowli komórkowych

- Podłoże hodowlane RPMI-1640 z 10% FBS (ang. complete RPMI, cRPMI)
 - o RPMI 1640, Biowest; 880 ml
 - FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*, Płodowa surowica bydlęca), Sigma-Aldrich; 100 ml
 - L-glutamina, Polfa Tarchomin S.A; 10 ml
 - Antybiotyki:
 - Penicylina, Polfa Tarchomin S.A; 5 ml
 - Streptomycyna, Polfa Tarchomin S.A.; 5 ml
- Podłoże wykorzystane do przekształcenia monocytów w komórki dendrytyczne
 - o cRPMI
 - o rekombinowany ludzki GM-CSF (rGM-CSF), R&D; 25 ng/ml
 - o rekombinowana ludzka IL-4 (rIL-4), R&D; 10 ng/ml
- Podłoże do mrożenia limfocytów
 - o cRPMI; 450 ml
 - FBS, Sigma-Aldrich; 450 ml
 - o DMSO (dimetylosulfotlenek), Sigma-Aldrich; 100 ml

III.1.6. Surowice

- FBS inaktywowana 56°C, 30 min., Sigma-Aldrich
- BSA (ang. Bovine Serum Albumin, Surowicza albumina wołowa), Sigma-Aldrich

III.1.7. Bufory i roztwory

- Czynnik lityczny wykorzystany do lizy erytrocytów
 - NH₄Cl; 82,9 g
 - KHCO₃; 10 g
 - 0,5 M EDTA (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*, wodny roztwór kwasu etylenodiaminotetraoctowego) Merck; 200 μg
 - Woda destylowana; 1000 ml
- PBS (ang. *Phosphate Buffered Saline*, buforowana fosforanem sól fizjologiczna z dodatkiem 0,5 M EDTA

- o EDTA, Merck; 4 ml
- o PBS bez jonów magnezu i wapnia, Biowest; 1000 ml
- Bufor wykorzystywany do separacji magnetycznej:
 - BSA, Sigma-Aldrich; 5 g
 - EDTA 0,5 M, Merck; 4 ml
 - PBS, Biowest; 1000 ml

III.1.7.1. Bufory do testu ELISA

- PBS, Biowest
- PBS 10x stężony:
 - o Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 28,9 g
 - KH₂PO₄; 2 g
 - o NaCl; 80 g
 - Woda destylowana; 1000 ml
- Bufor do płukania z Tween 20
 - o PBS 10x stężony; 100 ml
 - o Tween 20, Sigma-Aldrich; 500 μl
 - Woda destylowana; 900 ml
- Bufor do opłaszczania płytek
 - PBS, Biowest; 100 ml
- Bufor do blokowania wolnych miejsc na nośniku
 - o BSA, Sigma-Aldrich; 5 g
 - PBS, Biowest; 100 ml
- Bufor do rozcieńczeń prób oraz standardu
 - BSA, Sigma-Aldrich; 1g
 - o PBS, Biowest; 100 ml
- Bufor do rozcieńczenia streptawidyny
 - o BSA, Sigma-Aldrich; 1 g
 - ο Tween 20, Sigma-Aldrich; 100 μl
 - o PBS, Biowest; 100 ml

III.1.8. Zestaw do separacji magnetycznej komórek odpornościowych

W celu izolacji czystych populacji komórek z frakcji monocytarno-limfocytarnej krwi, zastosowano technikę separacji magnetycznej z użyciem następujących materiałów firmy Miltenyi Biotec

- MACS MultiStand statyw do separacji magnetycznej
- QuadroMACSTM Separator magnes do separacji magnetycznej
- LS Columns kolumny do separacji magnetycznej
- Human CD14 MicroBeads kulki paramagnetyczne opłaszczone mysimi przeciwciałami monoklonalnymi IgG2a skierowanymi przeciwko ludzkim antygenom CD14
- Human CD4 MicroBeads kulki paramagnetyczne opłaszczone mysimi przeciwciałami monoklonalnymi IgG1 skierowanymi przeciwko ludzkim antygenom CD4
- Human Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit kulki paramagnetyczne opłaszczone przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko: CD45RO, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD25, CD34, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ, HLA-DR, i CD235a
- Human Memory CD4⁺ T Cell Isolation Kit kulki paramagnetyczne opłaszczone przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko: CD45RA, CD8, CD14, CD16, CD19, CD56, CD36, CD123, TCRγ/δ i CD235a

III.1.9. Testy ELISA do oznaczania cytokin: IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-23, TNF-α, IFN-γ w supernatantach pohodowlanych

W celu oznaczenia poziomu cytokin w supernatantach pohodowlanych wykorzystano testy ELISA firmy Diaclone (Immuniq, Polska). Skład testów ELISA do oznaczania cytokin: IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17A, TNF- α oraz IFN- γ został zamieszczony w Tabeli 3 [Tabela 3.].

- Human IL-23 Elisa Kit
 - o Płytka 96-studzienkowa opłaszczona przeciwciałami przeciwko IL-23
 - o Standard IL-23 o stężeniu 5000 pg/ml
 - o Przeciwciało drugorzędowe biotynylowane
 - Streptawidyna-HRP (ang. horseradish peroxidase peroksydaza chrzanowa)
 - TMB (3,3',5,5'- tetrametylobenzydyna)

Tabela 3. Komercyjne testy ELISA wykorzystane do oznaczania ludzkich cytokin: IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IFN-γ, TNF-α.

Badana cytokina	Human IL-10	Human IL-12p40	Human IL-12p70	Human IL-13	Human IL-17A	Human IFN-γ	Human TNF-α
Standard	IL-10 400 pg/ml	IL-12p40 2000 pg/ml	IL-12p70 200 pg/ml	IL-13 100 pg/ml	IL-17A 100 pg/ml	IFN-γ 400 pg/ml	TNF-α 800 pg/ml
Czułość testu	<5 pg/ml	<20 pg/ml	<2,2 pg/ml	<1,5 pg/ml	<2,3 pg/ml	<5 pg/ml	<8 pg/ml
Przeciwciała opłaszczające (ang. <i>capture antibody</i>)				Obecne			
Biotynylowane przeciwciała wykrywające badaną cytokinę (ang. biotinylated detection antibody)				Obecne			
Streptawidyna-HRP (ang. horseradish peroxidase – peroksydaza chrzanowa)				Obecna			
TMB (3,3',5,5'- tetrametylobenzydyna)	Obecna						

III.1.10. Odczynniki chemiczne

- Agar mikrobiologiczny, Biomaxima
- Alkohol etylowy (C₂H₅OH) 96%, POCH S.A.
- Antybiotyki:
 - Penicylina, Polfa Tarchomin S.A
 - Streptomycyna, Polfa Tarchomin S.A
- Błękit trypanu, Merck
- Buforowana fosforanem sól fizjologiczna (PBS) bez jonów magnezu i wapnia, Biowest
- Chlorek amonu (NH₄Cl), Chempur
- Chlorek manganu (MnCl₃ x 4 H₂O), Sigma-Aldrich
- Chlorek potasu (KCl), POCH S.A.

- Chlorek sodu (NaCl), P.P.H. STANLAB
- Chlorek żelaza (FeCl₃ x 4 H₂O), Sigma-Aldrich
- Cytrynian sodu (Na₃C₆H₅O₇), Sigma-Aldrich
- Diwodorofosforan potasu (KH₂PO₄), Chempur
- DMSO (dimetylosulfotlenek), Sigma-Aldrich
- EDTA 0,5 M, Merck
- Ekstrakt drożdżowy, Biomaxima
- Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare
- Jodek propidyny, Merck
- Kwas siarkowy 1M (H₂SO₄), POCH S.A.
- Kwaśny hydrolizat kazeiny, Merck
- L-glutamina, Polfa Tarchomin S.A
- L-glutaminian sodu (C₅H₈NO₄Na), Aldrich Chemistry
- RNaza A, Sigma-Aldrich
- RPMI 1640, Biowest
- Siarczan magnezu (MgSO₄ x 7 H₂O), Chempur
- Tween 20 (Monolaurynian polioksyetyleno-20-sorbitanu), Sigma-Aldrich
- Wodorofosforan sodu hydrat (Na₂HPO₄ x 12 H₂O), Chempur
- Wodorowęglan potasu (KHCO₃), Chempur
- Zestaw do wykrywania apoptozy FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I; BD Pharmingen

III.1.11. Przeciwciała do cytometrii przepływowej – BD Bioscience, Pharmingen

W celu przygotowania prób do wybarwienia techniką cytometrii przepływowej wykorzystano przeciwciała zakupione w firmie BD Bioscience, Pharmingen.

- Kontrole izotypowe
 - Mysie przeciwciało IgG1 nieswoiste znakowane FITC (ang. *fluorescein isothiocyanate*, izotiocyjanian fluoresceiny)
 - Mysie przeciwciało IgG1 nieswoiste znakowane PE (ang. *phycoerythrin*, fikoerytryna
- Przeciwciała swoiste
 - o Mysie przeciwciało IgG1 znakowane FITC przeciwko ludzkiemu CD86
 - o Mysie przeciwciało IgG1 znakowane FITC przeciwko ludzkiemu CD40
 - o Mysie przeciwciało IgG1 znakowane FITC przeciwko ludzkiemu DC-SIGN
 - Mysie przeciwciało IgG1 znakowane FITC przeciwko ludzkiemu HLA-DR
 - o Mysie przeciwciało IgG1 znakowane PE przeciwko ludzkiemu CD80
 - o Mysie przeciwciało IgG1 znakowane PE przeciwko ludzkiemu CD83
 - o Mysie przeciwciało IgG1 znakowane PE przeciwko ludzkiemu TLR2
 - o Mysie przeciwciało IgG1 znakowane PE przeciwko ludzkiemu TLR4
- Zestaw odczynników wykorzystanych do kompensacji prób:
 - Anti-Rat and Anti-Hamster Ig κ /Negative Control Compensation Particles Set

III.1.12. Odczynniki do mikroskopii fluorescencyjnej

- Aldehyd glutarowy (C₅H₈O₂), POCH S.A.
- Azydek sodu (NaN₃), Sigma-Aldrich
- Bromek etydyny, Sigma-Aldrich
- DAPI (4',6-diamidyno-2-fenyloindol), Sigma-Aldrich
- Falloidyna znakowana rodaminą, Sigma-Aldrich
- Formaldehyd (aldehyd mrówkowy, CH₂O), Polysciences, Inc.
- Fosfo-H2AX(Ser139); marker dwuniciowych pęknięć DNA, Upstate/Millipore
- Oranż akrydyny, Sigma-Aldrich

- Polimeraza poli (ADP-rybozy)-2 (PARP-2); marker jednoniciowych pęknięć DNA, Agrisera
- Przeciwciało kozie drugorzędowe skoniugowane z Alexa Fluor 488 przeciwko przeciwciałom króliczym, Cell Signaling Technology
- Przeciwciało królicze pierwszorzędowe przeciwko β-tubulinie, Sigma-Aldrich
- Surowica końska, Sigma-Aldrich
- Triton X-100, Sigma-Aldrich

III.1.13. Materiały jednorazowe oraz materiały plastikowe

- Ezy BioSigma
- Filtry o średnicy porów 0,25 µm Minisart
- Pipety Pasteura 3 ml Sigma Aldrich
- Pipety serologiczne 5, 10, 25 i 50 ml Falcon
- Płytki polistyrenowe 12-studzienkowe BD Biosciences
- Płytki polistyrenowe 48-studzienkowe BD Biosciences
- Płytki polistyrenowe 96-studzienkowe NUNC
- Probówki do cytometrii Immunogen
- Probówki do densytometru (4, 11 ml) Medlab Products
- Probówki do mrożenia komórek typu cryo-tubes Slinap
- Probówki hodowlane Falcon (15, 50 ml) BD Biosciences
- Probówki typu Eppendorf Eppendorf
- Skrobak do komórek TPP Techno Plastic Products AG
- Strzykawki jednorazowe o pojemności 20 ml Polfa Tarchomin S.A.
- Szkiełka hodowlano-mikroskopowe Thermo Scientific[™] Nunc[™] Lab-Tek[™] Chamber Slide[™], Thermo Fisher
- Szkiełka szklane Super Frost, Menzel-Gläser

III.1.14. Sprzęt laboratoryjny

- Cieplarka, Pol-Eko
- Cytometr przepływowy Cyto-BD LSR II, BD Biosciences

- Czytnik fluorescencji Multiscan® EX
- Inkubator Galaxy S+, RS Biotech
- Inkubator z wytrząsaniem MaxQ 4450, Thermo Scientific
- Komora Bürkera, Superior Marienfeld Germany
- Mieszadło typu vortex, Labnet international
- Mikroskop Optiphot-2, NIKON
 - kamera do mikroskopu NIKON DS-Fi1
- Mikroskop świetlny CX21, Olympus
- Mikroskop fluorescencyjny Axio.Imager.A1, Zeiss
- Sorter komórkowy MACS
- Spektrofotometr Bio-rad, SmartSpecTM Plus
- Szafa laminarna, Biohazard
- Urządzenie do zamrażania komórek Mr. Frosty™ Freezing Container, Thermo Scientific
- Wirówka Centrifuge 5804 R Eppendorf

III.1.15. Oprogramowanie

- Adobe Photoshop CS5, Adobe Systems
- FlowJo, wersja 10.0.7, FlowJo LLC, Ashland, OR, United States
- GraphPad Prism, wersja 7.0, GraphPad Software
- ImageJ, wersja 1.37c, NIH and LOCI, University of Wisconsin, Madison, WI, United States
- Nikon ACT-1, wersja 2.7, Warszawa, Polska
- Ryciny wykonano wykorzystując oprogramowanie Biorender, licencja do użytku niekomercyjnego
- Statistica, wersja 13.0, StatSoft INC, Tulusa, OK, USA

III.2. Metody

III.2.1. Hodowla archeonów halofilnych

Szczepy *Hrd. rudnickae* WSM-64T, *Hrd. rudnickae* WSM-66T oraz szczep *N. salaciae* MDB25T hodowano w 100 ml podłoża *Halobacteria medium* (HBM) zawierającego 20% NaCl (*Hrd. rudnickae*) lub 15% NaCl (*N. salaciae*). Hodowlę prowadzono w kolbach Erlenmeyera o pojemności 250 ml: 120 rpm, 48 godz., w temperaturze 37°C dla *Hrd. rudnickae* lub 45°C dla *N. salaciae*. W celu określenia gęstości hodowli archeonów, drobnoustroje wysiewano na podłoże HBM z dodatkiem 2% agaru oraz policzono CFU (ang. *colony-forming unit*, jednostka tworząca kolonię). Hodowle drobnoustrojów prowadzono w inkubatorze z wytrząsaniem MaxQ 4450w znajdującym się w Pracowni Obrazowania Mikroskopowego i Specjalistycznych Technik Biologicznych UŁ.

III.2.2. Przygotowanie zawiesin archeonów halofilnych do stymulacji komórek dendrytycznych

Wzrost archeonów halofilnych był oceniany spektrofotometrycznie na podstawie gęstości optycznej przy długości fali $\lambda = 600$ nm. Do stymulacji komórek dendrytycznych wykorzystano drobnoustroje z 48-godzinnej hodowli płynnej, z fazy logarytmicznego wzrostu. Hodowle drobnoustrojów halofilnych odwirowano (4500 x g, 15 min., 4°C), a następnie osad zawieszano w 1 ml zimnego PBS, przeniesiono do nowych probówek typu Falcon i uzupełniano zimnym PBS do 10 ml. Po wirowaniu (4500 x g, 15 min., 4°C) osad zawieszano w 1 ml cRPMI, uzyskując końcową gęstość 1x10⁷/ml.

Lizat archeonów halofilnych przygotowano przez zawieszenie osadu 1 godz. w 1 ml wody destylowanej w temperaturze pokojowej. Po inkubacji osad odwirowano (4500 x g, 15 min., 4°C), a następnie zawieszono w 1 ml zimnego PBS, przeniesiono do nowych probówek typu Falcon i uzupełniano zimnym PBS do 10 ml. Po wirowaniu (4500 x g, 15 min., 4°C) osad zawieszono w 1 ml cRPMI. W celu sprawdzenia poprawności procesu lizy archeonów halofilnych, 100 µl zawiesiny lizatu archeonów halofilnych w cRPMI wysiano na płynne podłoża HBM. Po 72 godzinach nie zaobserwowano wzrostu wartości OD.

III.2.3. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) z kożuszków leukocytarno-płytkowych metodą różnicowego wirowania w gradiencie gęstości

Kożuszki leukocytarno-płytkowe w objętości około 60 ml rozcieńczono w stosunku 1:1 w PBS, a następnie nawarstwiono na gradient typu Ficoll w proporcji: 5:3 (krew:gradient) i wirowano (800 x g, 30 min., w temperaturze pokojowej, bez hamowania). W celu pozbycia się gradientu typu Ficoll, frakcję komórek PBMC zawieszono w 50 ml PBS i ponownie wirowano (390 x g, 10 min., w temperaturze pokojowej). Płukanie powtórzono dwukrotnie. W kolejnym etapie usunięto nadsącz, a do osadu dodano 2 ml buforu lizującego i inkubowano (10 min., 4°C). Po inkubacji do próby dodano 20 ml cRPMI i odwirowano (250 x g, 10 min., w temperaturze pokojowej).

Zawiesinę komórek rozcieńczono 10x błękitem trypanu, a następnie naniesiono do komory Bürkera, oglądano pod mikroskopem i liczono komórki.

Gęstość zawiesiny komórkowej obliczono ze wzoru:

$$d = a \times b \times 10^4$$

gdzie:

d – gęstość komórek w 1ml zawiesiny

a – średnia liczba komórek w dużym kwadracie

b-rozcieńczenie zawiesiny komórkowej

III.2.4. Izolacja monocytów CD14⁺ z frakcji PBMC z wykorzystaniem metody pozytywnej separacji magnetycznej

Zawiesinę PBMC uzyskaną zgodnie z opisem w podrozdziale III.2.3. odwirowano (300 x g, 10 min., 4°C), następnie usunięto supernatant, a do osadu dodano kulki paramagnetyczne opłaszczone przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko ludzkiemu receptorowi CD14 w proporcji 10 μl kulek:1x10⁷ PBMC. Do zawiesiny dodano 80 μl buforu MACS na 1x10⁷ PBMC. Po dokładnym wymieszaniu zawiesinę komórek inkubowano 30 min. w temperaturze 4°C, a następnie przepłukano buforem MACS (1,5 ml buforu na 1x10⁷ PBMC) i odwirowano (300 x g, 10 min., 4°C). Osad zawieszono w 500 μl buforu MACS. W celu uzyskania frakcji komórek CD14⁺ wykorzystano zestaw do separacji magnetycznej

MidiMACSTM (Miltenyi Biotec). Kolumnę LS do separacji umieszczono w polu magnetycznym i trzykrotnie przemyto 3ml buforu MACS, a następnie naniesiono zawiesinę komórek. Frakcja komórek CD14⁺ związana z kulkami paramagnetycznymi została zatrzymana na kolumnie LS. W przesączu zostały nieoznaczone komórki CD14⁻. Po usunięciu kolumny LS z pola magnetycznego, na kolumnę naniesiono bufor MACS, a następnie za pomocą tłoka strzykawki uwolniono komórki CD14⁺ z kolumny. Zawiesinę komórek CD14⁻ (frakcja limfocytarna) oraz CD14⁺ (frakcja monocytarna) odwirowano (300 x g, 10 min., 4°C), a następnie osady zawieszono w podłożu cRPMI i policzono gęstość obu frakcji z wykorzystaniem komory Bürkera. Czystość frakcji komórek CD14⁺ oceniono z wykorzystaniem cytometrii przepływowej i wynosiła ona ponad 90% [Ryc. 6.].



Ryc. 6. Przykładowe widmo typu dot-blot przedstawiające czystość frakcji CD14⁺.

III.2.5. Izolacja limfocytów CD4⁺ z frakcji CD14⁻ z wykorzystaniem metody pozytywnej separacji magnetycznej

Zawiesinę komórek CD14⁻ uzyskaną zgodnie z opisem w podrozdziale III.2.4. odwirowano (300 x g, 10 min., 4°C), następnie usunięto supernatant, a do osadu dodano kulki paramagnetyczne opłaszczone przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko ludzkiemu receptorowi CD4⁺ w ilości 10 µl kulek na 1x10⁷ komórek CD14⁻. Do zawiesiny dodano 80 µl buforu MACS na 1x10⁷ komórek CD14⁻. Po dokładnym wymieszaniu zawiesinę komórek inkubowano 30 min. w temperaturze 4°C. Po inkubacji komórki przemyto buforem MACS (1,5 ml buforu:1x10⁷ komórek CD14⁻) i odwirowano (300 x g, 10 min., 4°C), a następnie osad zawieszono w 500 µl buforu MACS. W celu uzyskania frakcji komórek CD4⁺ wykorzystano zestaw do separacji magnetycznej MidiMACSTM (Miltenyi

Biotec). Kolumnę LS przygotowano identycznie według opisu w podrozdziale III.2.4. Frakcja komórek CD4⁺ związana z kulkami paramagnetycznymi została zatrzymana na kolumnie LS, natomiast w przesączu zostały komórki CD4⁻. Po usunięciu kolumny LS z pola magnetycznego, kolumnę przepłukano buforem MACS z wykorzystaniem tłoka w celu uwolnieniu komórek CD4⁺ z kolumny. Zawiesinę komórek o fenotypie CD4⁺ (limfocyty T) wirowano (300 x g, 10 min., 4°C). Po wirowaniu osady zawieszono w podłożu cRPMI, a następnie policzono gęstość frakcji CD4⁺ z wykorzystaniem komory Bürkera. Limfocyty doprowadzano do gęstości 1x10⁷ komórek/ml w podłożu do mrożenia (por. III.1.5.), a następnie zamrożono w -80°C w pudełku typu Mr Frosty, zapewniającym spadek temperatury 1°C/1 min.

III.2.6. Izolacja limfocytów dziewiczych z frakcji CD14⁻ z wykorzystaniem metody negatywnej separacji magnetycznej

Zawiesinę komórek CD14⁻ uzyskaną zgodnie z opisem w podrozdziale III.2.4. odwirowano (300 x g, 10 min., 4°C), a następnie do osadu dodano zestaw przeciwciał monoklonalnych "Naive CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail II" zawierający przeciwciała: anty-CD45RO, anty-CD8, anty-CD14, anty-CD15, anty-CD16, anty-CD19, anty-CD25, anty-CD34, anty-CD36, anty-CD56, anty-CD123, anty-TCRγ/δ, anty-HLA-DR, i anty-CD235a w objętości $10 \,\mu$ l na 1×10^7 komórek CD14⁻ oraz uzupełniono buforem MACS w objętości 40 μ l na 1×10^7 komórek. Zawiesinę dokładnie wymieszano i inkubowano w temperaturze 4°C 5 min. Następnie do frakcji CD14⁻ dodano mysie przeciwciała monoklonalne "Naive CD4⁺ T Cell MicroBead Cocktail II" w objętości 20 µl na 1x10⁷ komórek oraz uzupełniano buforem MACS w objętości 30 µl na 1x10⁷ komórek. Po dokładnym wymieszaniu zawiesine inkubowano 5 min. w temperaturze 4°C. Kolumne LS umieszczono w polu magnetycznym i przygotowano jak w podrozdziale III.2.4. Komórki o fenotypie CD4⁺ CD45RA⁺ znajdowały się w przesączu stanowiącym frakcję negatywną. Zawiesinę komórek CD4⁺ CD45RA⁺ (limfocyty dziewicze T) wirowano (300 x g, 10 min., 4°C), a następnie osady zawieszono w podłożu cRPMI i policzono gęstość frakcji CD4⁺ CD45RA⁺ z wykorzystaniem komory Bürkera. Limfocyty dziewicze doprowadzono do gęstości 1x10⁷ komórek/ml w podłożu do mrożenia limfocytów (por. III.1.5.), a następnie zamrożono w -80°C w pudełku typu Mr Frosty, zapewniającym spadek temperatury 1°C/1 min.

III.2.7. Izolacja limfocytów pamięci z frakcji CD14⁻ z wykorzystaniem metody negatywnej separacji magnetycznej

Zawiesinę komórek CD14⁻ uzyskaną zgodnie z opisem w podrozdziale III.2.4. odwirowano (300 x g, 10 min., 4°C), a następnie do osadu dodano koktaji przeciwciał monoklonalnych "Memory CD4⁺ T Cell Biotin-Antibody Cocktail": anty-CD45RA, anty-CD8, anty-CD14, anty-CD16, anty-CD19, anty-CD56, anty-CD36, anty-CD123, anty-TCRy/8 i anty-CD235a w objętości 10 µl na 1x10⁷ komórek CD14⁻ oraz uzupełniano buforem MACS w objętości 40 μ l na 1x10⁷ komórek. W kolejnym etapie zawiesinę komórek z przeciwciałami wymieszano i inkubowano w temperaturze 4°C 10 min. Następnie do mieszaniny dodano Anti-Biotin MicroBeads w objętości 20 µl na 1×10^7 komórek oraz bufor MACS w objętości 30 µl/1x10⁷ komórek i inkubowano 15 min. w temperaturze 4°C. Kolumnę LS do separacji umieszczono w polu magnetycznym i przemyto 3 razy 3 ml buforu MACS, a następnie naniesiono zawiesinę komórek. Komórki o fenotypie CD4⁺CD45RO⁺ (limfocyty T pamięci) stanowiły frakcję negatywną i znalazły się w przesączu. Zawiesinę komórek CD4+CD45RO+ (limfocyty pamięci T) wirowano (300 x g, 10 min., 4°C), a następnie osady zawieszono w podłożu cRPMI i policzono gęstość frakcji CD4⁺CD45RO⁺ z wykorzystaniem komory Bürkera. Limfocyty pamięci doprowadzono do gęstości 1x10⁷ komórek/ml w podłożu do mrożenia limfocytów, a następnie zamrożono w -80°C w pudełku typu Mr Frosty, zapewniającym spadek temperatury 1°C/1 min.

III.2.8. Otrzymanie ludzkich komórek dendrytycznych pochodzenia monocytarnego

Monocyty uzyskane w podrozdziale III.2.4. doprowadzono do gęstości 1x10⁶ komórek/ml w podłożu hodowlanym cRPMI, a następnie dodano cytokiny (rGM-CSF 25 ng/ml; rIL-4 10 ng/ml) i zawiesiny komórek naniesiono na płytki 6-studzienkowe, które inkubowano 6 dni w temperaturze 37°C, 5% CO₂ w celu otrzymania niedojrzałych komórek dendrytycznych. Hodowlę komórek dendrytycznych oglądano w mikroskopie świetlnym z odwróconym polem widzenia w celu oceny ich morfologii. W kolejnym etapie płytki z hodowlą KD inkubowano 30 min. w temperaturze 4°C, a następnie KD zebrano z wykorzystaniem pipet Pasteura oraz jałowych skrobaków do komórek. Zawiesinę KD przeniesiono do nowych probówek, a do studzienek dodano po 1 ml zimnego cRPMI
i inkubowano 10 min. Następnie zebrano pozostałe komórki i odwirowano (350 x g, 10 min., temperatura pokojowa). W końcowym etapie osad KD zawieszono w cRPMI, policzono ich gęstość w komorze Bürkera i doprowadzono do gęstości $1x10^6$ komórek/ml jak w podrozdziale III.2.3.

III.2.9. Stymulacja komórek dendrytycznych archeonami halofilnymi

Komórki dendrytyczne o gęstości 1×10^6 komórek/studzienkę uzyskane w podrozdziale III.2.7. naniesiono na płytkę 12-studzienkową i stymulowano zawiesinami archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae* WSM-64T, *Hrd. rudnickae* WSM-66T lub *N. salaciae* MDB25T w proporcji 1:1 (KD:archeony) i uzupełniono podłożem do 1 ml. Kontrolę negatywną stanowiły KD niestymulowane, natomiast kontrolę pozytywną KD stymulowane LPS *E.coli* O:55 w stężeniu 1 µg/ml. Hodowle komórek inkubowano 24 godz. w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Po stymulacji komórki zebrano oraz odwirowano (350 x g, 10 min., w temperaturze pokojowej).

III.2.10. Stymulacja komórek dendrytycznych archeonami halofilnymi w obecności enterotoksyny B S. aureus (SEB)

Uzyskane w podrozdziale III.2.8. KD o gęstości 1x10⁶ komórek/studzienkę naniesiono na płytkę 12-studzienkową i stymulowano drobnoustrojami halofilnymi *Hrd. rudnickae* WSM-64T, *Hrd. rudnickae* WSM-66T lub *N. salaciae* MDB25T w proporcji 1:1 (KD:archeony). W kolejnym etapie do komórek dodano SEB w stężeniu 1 µg/ml, a studzienki uzupełniono podłożem cRPMI do 1 ml. Po stymulacji komórki zebrano oraz odwirowano (350 x g, 10 min., w temperaturze pokojowej). Hodowle komórek inkubowano 24 godz. w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Po stymulacji komórki zebrano oraz odwirowano (350 x g, 10 min., w temperaturze pokojowej).

III.2.11. Przygotowanie limfocytów T CD4⁺, limfocytów T dziewiczych (CD4⁺ CD45RA⁺) oraz limfocytów T pamięci (CD4⁺CD45RO⁺)

Limfocyty T, limfocyty T dziewicze oraz limfocyty T pamięci zamrożone w podrozdziałach III.2.5., III.2.6., oraz III.2.7. przechowywano w -80°C. Tuż przed dodaniem limfocytów do KD, probówki z limfocytami umieszczono w rozgrzanej łaźni wodnej (37°C). Po rozmrożeniu, zawiesinę komórek przeniesiono do nowych probówek typu Falcon,

a następnie zawieszono w 10 ml podłoża cRPMI o temperaturze 37°C i odwirowano (450 x g, 10 min. w temperaturze pokojowej). Po dwukrotnym odwirowaniu, limfocyty T, limfocyty T dziewicze oraz limfocyty T pamięci zawieszono w podłożu cRPMI o temperaturze 37°C, policzono gęstość według metody opisanej w podrozdziale III.2.3. i doprowadzono do gęstości 1x10⁷ komórek/ml.

III.2.12. Ko-hodowla stymulowanych archeonami halofilnymi i/lub superantygenem SEB KD z autologicznymi limfocytami T CD4⁺, limfocytami T dziewiczymi (CD4⁺ CD45RA⁺) lub limfocytami T pamięci (CD4⁺CD45RO⁺)

KD o gęstości 1x10⁵ komórek/studzienkę uzyskane w podrozdziale III.2.8. naniesiono na płytkę 48-studzienkową, stymulowano archeonami halofilnymi a następnie superantygenem SEB. Płytki inkubowano 24 godz. (37°C, 5% CO₂). Po inkubacji do KD dodano rozmrożone (według podrozdziału III.2.11.) autologiczne limfocyty T CD4⁺, autologiczne limfocyty T dziewicze (CD4⁺ CD45RA⁺) lub autologiczne limfocyty T pamięci (CD4⁺CD45RO⁺) w stosunku 1:10 (KD:frakcja limfocytów T). Studzienki uzupełniono podłożem do 1 ml i inkubowano 96 godz. w 37°C, 5% CO₂.

III.2.13. Ocena obecności archeonów halofilnych wewnątrz KD z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej

W celu identyfikacji archeonów halofilnych wewnątrz KD wykorzystano metodę barwienia oranżem akrydyny/bromkiem etydyny według Rybaczek i wsp., 2015 [83]. KD stymulowano archeonami halofilnymi według podrozdziału III.2.9., a następnie barwiono 4 min. 1 ml mieszaniny (100 µg/ml oranżu akrydyny, 100 µg/ml bromku etydyny, PBS). Następnie, KD przemyto 2 razy PBS i utrwalano 1% aldehydem glutarowym w PBS 15 min. W dalszym etapie komórki przemyto dwukrotnie PBS i umieszczano na szkiełkach SuperFrost Plus. Obserwacje prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego Optiphot-2 (Nikon) wyposażonego w filtr B-2A (światło niebieskie; $\lambda = 495$ nm). Zdjęcia wykonano korzystając z kamery mikroskopowej DS-Fi1 (Nikon) i oprogramowania Act-1 (Precoptic, Warszawa, Polska). Analizy zdjęć KD z archeonami halofilnymi dokonano wykorzystując oprogramowanie ImageJ v1.37c (Public Domain by Wayne Rasband) we współpracy z dr hab. Dorotą Rybaczek, prof. UŁ z Katedry Cytofizjologii UŁ.

III.2.14. Ocena stopnia kondensacji oraz fragmentacji chromatyny KD z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej

Do oceny stopnia kondensacji oraz fragmentacji chromatyny wykorzystano KD stymulowane archeonami halofilnymi, superantygenem SEB lub archeonami halofilnymi w obecności superantygenu SEB jak opisano w sekcjach III.2.9. oraz III.2.10.; układy badane umieszczono na szkiełkach hodowlano-mikroskopowych ThermoScientific™ Nunc™ Lab-Tek[™] ChamberSlide[™] i inkubowano jak opisano w podrozdziałach III.2.9. oraz III.2.10. KD utrwalono 15 min. w roztworze 4% paraformaldehydu w PBS. Następnie, KD inkubowano 1 godz. w mieszaninie blokującej (10% surowicy końskiej, 1% BSA, 0,02% azydku sodu, PBS) w temperaturze pokojowej w celu zminimalizowania ryzyka niespecyficznego wiązania przeciwciał. KD inkubowano przez noc w komorze wilgotnej (4°C) z przeciwciałem króliczymi przeciwko ludzkiej β-tubulinie. Komórki przepłukano trzykrotnie z wykorzystaniem mieszaniny PBS/0,2% Triton X-100, a następnie inkubowano 1 godz. w ciemności w temperaturze pokojowej z kozimi przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z Alexa Fluor 488 przeciwko przeciwciałom króliczym. KD przepłukano trzykrotnie PBS/0,2% Triton X-100 oraz jednokrotnie w PBS. KD dobarwiono 5 min. DAPI (0,1 mg/ml). Obserwacje przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Axio.Imager.A1 wyposażonego w filtr B-2A ($\lambda = 450-490$ nm) dla AlexaFluor 488 oraz w filtr UV-2A (światło UV; $\lambda = 518$ nm). Procent fragmentacji chromatyny został oszacowany na podstawie pomiarów ilościowych fluorescencji DAPI. Związek ten wbudowuje się równomiernie w nić DNA, przez co zmiany w poziomie fluorescencji podczas obserwacji pod mikroskopem odpowiadają zwiększonej gestości chromatyny. Niższy poziom fluorescencji oznacza miejsca, w których chromatyna jest mniej skondensowana. W przypadku pomiaru fluorescencji całego jądra komórkowego, niższy wynik wskazuje na fragmentację chromatyny. Ilościowej analizy zdjęć KD dokonano za pomocą funkcji pomiaru poziomu fluorescencji (measure) osobno dla DAPI oraz fluorochromu AlexaFluor 488 (skoniugowanego z β-tubuliną) w poszczególnych komórkach, za pomocą programu ImageJ. Wizualizację wyników przeprowadzono przy użyciu programu Photoshop CS5. Wyniki uzyskano we współpracy z dr hab. Dorotą Rybaczek, prof. UŁ z Katedry Cytofizjologii UŁ.

III.2.15. Ocena jednoniciowych oraz dwuniciowych pęknięć DNA KD z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej

KD stymulowano archeonami halofilnymi, superantygenem SEB lub archeonami halofilnymi w obecności superantygenu SEB jak opisano w podrozdziałach III.2.9. oraz III.2.10.; układy badane umieszczono na szkiełkach hodowlano-mikroskopowych ThermoScientific[™] Nunc[™] Lab-Tek[™] ChamberSlide[™] i inkubowano według opisu w podrozdziałach III.2.9. oraz III.2.10. W celu wykrycia polimerazy poli(ADP-rybozy)-2 (PARP-2; EC 2.4.2.30; markera jednoniciowych peknieć DNA), fosfo-H2AX(Ser139; markera dwuniciowych pęknięć DNA) oraz β-tubuliny i aktyny (barwionej falloidyną znakowana rodamina) KD najpierw utrwalono 15 min. w roztworze 4% paraformaldehydu w PBS, a następnie inkubowano 1 godz. w mieszaninie blokującej (10% surowicy końskiej, 1% BSA, 0,02% azydku sodu, PBS) w temperaturze pokojowej w celu zminimalizowania ryzyka niespecyficznego wiązania przeciwciał. W kolejnym etapie, KD inkubowano przez noc w komorze wilgotnej (4°C) z odczynnikami: PARP-2, fosfo-H2AX, przeciwciałami króliczymi pierworzędowymi przeciwko β-tubulinie oraz falloidyną znakowaną rodaminą. Komórki dendrytyczne przepłukano trzykrotnie PBS/0,2% Triton X-100, a następnie inkubowano 1 godz. w ciemności w temperaturze pokojowej z przeciwciałami drugorzędowymi: kozimi anty-króliczymi skoniugowanymi z AlexaFluor 488 (dla β-tubuliny i PARP-2) oraz kozimi anty-króliczymi, skoniugowanymi z AlexaFluor 555 (dla fosfo-H2AX). KD przepłukano trzykrotnie PBS/0,2% Triton X-100 oraz jednokrotnie PBS. DNA w komórkach dendrytycznych wykryto poprzez dobarwienie prób DAPI (0,1 mg/ml, 5 min. w ciemności dla PARP-2) lub jodkiem propidyny (0,2 µg/ml, 5 min. w ciemności dla fosfo-H2AX). Obserwacje przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Axio.Imager.A1 wyposażonego w filtr B-2A ($\lambda = 450-490$ nm) dla AlexaFluor 488 oraz w filtr G-2A ($\lambda = 518$ nm) dla AlexaFluor 555 i jodku propidyny. Ilościowej analizy zdjęć KD dokonano za pomocą funkcji pomiaru poziomu fluorescencji (measure) osobno dla DAPI i jodku propidyny (dla DNA) oraz fluorochromów AlexaFluor 488 (dla β-tubuliny i PARP-2) i AlexaFluor 555 (dla fosfo-H2AX) w poszczególnych komórkach, z wykorzystaniem programu ImageJ. Wizualizację wyników przeprowadzono przy użyciu programu Photoshop CS5. Wyniki uzyskano we współpracy z dr hab. Dorotą Rybaczek, prof. UŁ z Katedry Cytofizjologii UŁ.

III.2.16. Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych komórek dendrytycznych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej

Do oceny ekspresji receptorów powierzchniowych wykorzystano hodowlę KD stymulowanych archeonami halofilnymi, superantygenem SEB lub archeonami halofilnymi w obecności superantygenu SEB jak opisano w sekcjach III.2.9. oraz III.2.10. Po stymulacji KD całą zawartość studzienek zebrano i odwirowano (350 x g, 10 min., 4°C), a płytki umieszczono w 4°C i inkubowano 30 min. Następnie, zawartość studzienek zebrano i odwirowano jak wyżej. Studzienki zostały trzykrotnie przepłukane zimnym PBS z dodatkiem EDTA. Osad KD zawieszono w PBS doprowadzając zawiesinę komórek do gęstości 1x10⁶/ml.

KD zostały wybarwione z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych opisanych w podrozdziale III.1.11. dodawanymi w objętości 3 μl. Próbę kontrolną stanowiły komórki niebarwione przeciwciałami. Sposób barwienia zaprezentowano na Rycinie 7 [Ryc. 7.].



Ryc. 7. Schemat barwienia komórek dendrytycznych (KD) stymulowanych archeonami halofilnymi, superantygenem SEB, lub archeonami halofilnymi w obecności superantygenu SEB. FITC - izotiocyjanian fluoresceiny, PE – fikoerytryna

Do probówek z mieszaniną odpowiednich przeciwciał dodano po 100 µl zawiesiny KD (1x10⁶ komórek/ml), próby dokładnie wymieszano, a następnie inkubowano 30 min. w 4°C w ciemności. Po inkubacji próby dwukrotnie odwirowano (450 x g, 10 min. w temperaturze 4°C) przepłukując zimnym PBS w objętości 2 ml. Osad zawieszono w 100 µl zimnego roztworu PBS. Próby poddano pomiarowi przy pomocy cytometru przepływowego BD LSRII w Pracowni Cytometrii Wydziału BiOŚ UŁ.

III.2.17. Schemat analizy ekspresji receptorów powierzchniowych na powierzchni komórek dendrytycznych

Dane z cytometru przepływowego analizowano z wykorzystaniem programu FlowJo. Analizę ekspresji receptorów powierzchniowych (CD86, CD80, HLA-DR, CD83, CD40, TLR2, TLR4, DC-SIGN) rozpoczynano od ustawienia bramek (ang. *gate*) na próbie izotypowej oraz na próbie barwionej, biorąc pod uwagą wielkość (ang. *forward-scattered light*, FSC) oraz ziarnistość (ang. *side-scattered light*, SSC) komórek. W dalszym etapie analizowano poziom ekspresji danego receptora na powierzchni badanych KD oraz odsetek KD wykazujących ekspresję tego receptora. Schemat analizy ekspresji receptorów na powierzchni KD przedstawiono na Rycinie 8 [Ryc. 8.].





Ryc. 8. Schemat analizy ekspresji receptorów na powierzchni KD a) KD zebrane w "bramce" na podstawie ich wielkości (FSC) oraz ziarnistości (SSC); b) ustawienie "krzyża" czyli specyficznej ekspresji badanego receptora na podstawie niespecyficznej fluorescencji próby izotypowej; c) histogram przedstawiający ekspresję przykładowego receptora (próba badana) oraz niespecyficzna fluorescencja na powierzchni komórek (izotyp); d) sposób obliczenia wartości ekspresji danego receptora na podstawie parametru MFI (ang. Mean Fluorescence Intensity; średnia intensywność fluorescencji) oraz % gated - procent komórek w "bramce"

III.2.18. Ilościowe oznaczanie cytokin za pomocą testów ELISA

Poziom cytokin w supernatantach KD stymulowanych według opisu w podrozdziałach III.2.9. oraz III.2.10. lub ko-hodowli KD z autologicznymi limfocytami T CD4⁺, autologicznymi limfocytami T dziewiczymi (CD4+ CD45RA+) lub autologicznymi limfocytami T pamięci (CD4⁺CD45RO⁺), (podrozdział III.2.12.) oceniano z wykorzystaniem testów ELISA (Diaclone, Immuniq Polska). Wszystkie testy wykonano zgodnie z instrukcjami producenta testów. W pierwszym etapie płytki zostały opłaszczone przeciwciałami wychwytującymi przeciwko badanym cytokinom (IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17A, TNF- α oraz IFN- γ), a następnie inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia płytki płukano buforem do płukania (PBS/0,05% Tween 20) w celu usuniecia niezwiązanych przeciwciał. Wolne miejsca na płytce blokowano 2 godz. w temperaturze 20°C w ciemności buforem do blokowania (PBS/5%BSA; 150 µl/studzienkę). Po inkubacji płytki płukano buforem do płukania oraz nanoszono po 50 µl standardu oraz seryjnych rozcieńczeń standardu badanej cytokiny przygotowanych w buforze do rozcieńczeń (PBS/1%BSA). Nanoszono również po 50 µl prób badanych (nierozcieńczonych, rozcieńczonych 10x, rozcieńczonych 100x). W przypadku IL-10 po tym etapie następowała 1 godz. inkubacja w temperaturze pokojowej, a następnie dodawano swoiste dla IL-10 biotynylowane przeciwciała. W przypadku IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17A, TNF- α oraz IFN- γ do studzienek dodawano swoiste dla tych cytokin biotynylowane przeciwciała (25 µl/studzienkę). W każdym doświadczeniu zastosowano kontrole:

- K1 (50 µl standardu, brak biotynylowanych przeciwciał, 25 µl buforu do rozcieńczeń)
 kontrola jakości standardu
- K2 (25 µl biotynylowanych przeciwciał, brak standardu, 50 µl buforu do rozcieńczeń)
 kontrola biotynylowanych przeciwciał
- K3 (brak standardu i biotynylowanych przeciwciał, 75 µl buforu do rozcieńczeń)
 kontrola buforu do rozcieńczeń

Po inkubacji w 20°C w ciemności płytki płukano buforem do płukania i dodawano do studzienek roztwór streptawidyny znakowanej peroksydazą chrzanową (HRP) w buforze do streptawidyny (PBS/1%BSA/0,1% Tween20). Po 30 min. inkubacji w 20°C w ciemności płytki płukano buforem do płukania i dodawano do studzienek TMB, a następnie płytki

ponownie inkubowano w ciemności. W celu przerwania reakcji enzymatycznej do studzienek dodano 1M H₂SO₄ w objętości 50 μ l. Wartość absorbancji odczytano przy długości fali λ = 450 nm. Na podstawie wyników otrzymanych z naniesionego standardu swoistego dla danej cytokiny wyznaczano krzywe kalibracyjne, gdzie na osi X naniesiono stężenie badanej cytokiny, a na osi Y wartość absorbancji. Z przekształcenia równania funkcji liniowej otrzymano wzór, z którego obliczano stężenie cytokin w próbach badanych:

$$x = \frac{y-b}{a}$$
, gdzie

- x stężenie badanej cytokiny [pg/ml]
- y wartość absorbancji
- b współczynnik przecięcia prostej z osią Y
- a współczynnik przecięcia prostej z osią X

W przypadku oceny poziomu IL-23 w supernatantach KD (Diaclone, Immuniq Polska) wykorzystano gotową płytkę opłaszczoną przeciwciałami przeciwko IL-23 oraz zablokowaną przez producenta testu. W pierwszym etapie nanoszono po 100 μ l prób badanych (nierozcieńczonych, rozcieńczonych 10x oraz rozcieńczonych 100x) lub seryjnych rozcieńczeń wzorca rekombinowanej ludzkiej IL-23, a następnie po 50 μ l biotynylowanych przeciwciał przeciwko IL-23. Dodatkowo, ustawiono kontrole K1, K2 oraz K3 jak opisano powyżej. Po 2 godz. inkubacji w ciemności w temperaturze 20°C, płytkę przepłukano trzykrotnie buforem do płukania, dodano 100 μ l roztworu streptawidyny-HRP i inkubowano w ciemności w temperaturze 20°C, 30 min. Po inkubacji płytkę przepłukano trzykrotnie buforem do płukania, dodano 100 μ l TMB i inkubowano płytkę 15 min. w ciemności, a następnie zablokowano reakcję enzymatyczną poprzez dodanie 100 μ l 1M H₂SO₄. Wartość absorbancji odczytano przy długości fali λ = 450 nm. Stężenie IL-23 w próbach badanych oceniono z wykorzystaniem krzywej wzorcowej według metody opisanej powyżej. Zestaw ELISA firmy Diaclone pozwala na oznaczenie poziomu ludzkiej cytokiny IL-23 w zakresie stężeń: 20 pg/ml – 5000 pg/ml.

W Tabeli 4 [Tabela 4.] zebrano informacje dotyczące zakresu stężenia badanych cytokin możliwych do wykrycia z wykorzystaniem opisanych wyżej komercyjnych testów.

Badana cytokina	Minimalne stężenie badanej	Maksymalne stężenie badanej
	cytokiny możliwe do wykrycia	cytokiny możliwe do wykrycia
IL-10	5 pg/ml	400 pg/ml
IL-12p40	20 pg/ml	2000 pg/ml
IL-12p70	2,2 pg/ml	200 pg/ml
IL-13	1,5 pg/ml	100 pg/ml
IL-17A	2,3 pg/ml	100 pg/ml
TNF-α	8 pg/ml	800 pg/ml
IFN-γ	5 pg/ml	400 pg/ml
IL-23	20 pg/ml	5000 pg/ml

Tabela 4. Minimalne oraz maksymalne stężenie badanych cytokin możliwe do wykrycia w teście ELISA

III.2.19. Ocena cyklu komórkowego komórek dendrytycznych metodą cytometrii przepływowej

Po stymulacji komórek dendrytycznych archeonami halofilnymi, superantygenem SEB lub archeonami halofilnymi w obecności SEB (podrozdziały III.2.9. oraz III.2.10.) zebrano supernatanty pohodowlane, a następnie dodano do studzienek 1 ml zimnego EDTA i inkubowano 10 min. w temperaturze 4°C. Komórki zebrano z wykorzystaniem użyciu jałowych skrobaków, a następnie odwirowano (350 x g, 10 min., 4°C). W kolejnym etapie usunięto nadsącz, a osady zawieszono w 1 ml zimnego PBS i ponownie odwirowano (350 x g, 10 min., 4°C), następnie osady zawieszono w 100 µl zimnego PBS i przeniesiono do eppendorfów zawierających 1 ml 70% roztworu wodnego etanolu o temperaturze -20°C. Zawiesinę komórek dendrytycznych wstrzyknięto w objętości 100 µl pod alkohol cały czas mieszając próbki na mieszadle typu vortex i odwirowano (20000 x g, 10 min., 4°C). Osady zawieszono w 0,5 ml roztworu A (RNA-azy z jodkiem propidyny), a następnie inkubowano 30 min. w temperaturze 37°C w ciemności. Po zakończeniu inkubacji dokonano pomiarów z wykorzystaniem cytometru przepływowego BD LSRII w Pracowni Cytometrii Wydziału BiOŚ UŁ. Analizę cyklu komórkowego przeprowadzono z wykorzystaniem programu FlowJo we współpracy z dr Pauliną Sicińską z Katedry Biofizyki Skażeń Środowiska UŁ.

III.2.20. Ocena KD ulegających apoptozie lub nekrozie metodą cytometrii przepływowej

Po stymulacji komórek dendrytycznych archeonami halofilnymi, superantygenem SEB lub archeonami halofilnymi w obecności SEB (podrozdziały III.2.9. oraz III.2.10.) zebrano podłoże pohodowlane, a następnie dodano do studzienek 1 ml zimnego EDTA i inkubowano 10 min. w temperaturze 4°C. Komórki zebrano z wykorzystaniem użyciu jałowych skrobaków do komórek, a następnie odwirowano (350 x g, 10 min., 4°C). Osad zawieszono w 1 ml zimnego PBS i odwirowano (350 x g, 10 min., 4°C). W ostatnim etapie osady zawieszono w 100 µl 1% roztworu aneksyny. Do każdej probówki dodano 5 µl FITC oraz 5 µl jodku propidyny, dokładnie wymieszano oraz wykonano cztery kontrole:

- Kontrola 1: 100 µl komórek + 400 µl 1% roztworu aneksyny
- Kontrola 2: 100 µl komórek + 5 µl FITC + 10% alkohol
- Kontrola 3: 100 µl komórek + 5 µl PI + 70% zimny alkohol
- Kontrola 4: 100 μ l komórek + 5 μ l FITC + 5 μ l PI + 10% alkohol

Wszystkie próby inkubowano 15 min. w ciemności, w temperaturze 4°C. Po zakończeniu inkubacji dokonano pomiarów z wykorzystaniem cytometru przepływowego BD LSRII w Pracowni Cytometrii Wydziału BiOŚ UŁ. Wyniki analizowano wykorzystując oprogramowanie FlowJo, we współpracy z dr Pauliną Sicińską z Katedry Biofizyki Skażeń Środowiska UŁ.

III.2.21. Analiza statystyczna wyników

Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu Statistica 13 (StatSoft) oraz oprogramowania GraphPad 7 (Prism). Do analizy danych zawartych w pracy wykorzystano statystyki opisowe – średnia arytmetyczna oraz odchylenie standardowe (SD). Normalność rozkładu zmiennych oceniano testem Kołmogorowa-Smirnowa. W celu oceny różnic między dwoma średnimi użyto nieparametrycznego testu U Manna–Whitneya. W przypadku analizy obejmującej porównanie więcej niż dwóch średnich, zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Różnice między średnimi uznawano za istotne statystycznie przy wartości $p \le 0,05$.

IV. Wyniki

IV.1. Charakterystyka oddziaływania archeonów halofilnych Hrd. rudnickae lub N. salaciae z ludzkimi komórkami dendrytycznymi [Wyniki oryginalne, nieopublikowane].

IV.1.1. Ocena obecności archeonów halofilnych wewnątrz KD

Zbadano zdolność wnikania archeonów halofilnych (Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae) do komórek dendrytycznych z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Analiza zdjęć mikroskopowych z użyciem programu ImageJ pozwoliła na jednoznaczne odróżnienie archeonów, które znajdowały się wewnątrz KD od tych, które były poza nimi oraz na zliczenie liczby obu populacji (parametr określany jako "prominencja"). KD stymulowano według metody opisanej w podrozdziale III.2.9., a następnie barwiono bromkiem etydyny oraz oranżem akrydyny według metody opisanej w podrozdziale III.2.13. Kontrole ujemną stanowiły KD niestymulowane archeonami halofilnymi. Po 24 godz. stymulacji zaobserwowano obecność archeonów halofilnych (Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae) wewnątrz KD, zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym. Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający obecność archeonów halofilnych wewnątrz cytoplazmy oraz jądra komórkowego KD przedstawiono na Rycinie 9 [Ryc. 9.]. Wyniki zaprezentowano w postaci średniej liczby wniknięć, definiowanej jako obecność archeonów halofilnych w jądrze komórkowym [Ryc. 10A] lub cytoplazmie [Ryc. 10B]. Średnią liczbę drobnoustrojów w komórce oceniono zliczając każdorazowo 2500 KD. Wykazano, iż 24 godz. stymulacja KD Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae skutkowała istotnym nasileniem liczby wniknięć archeonów halofilnych do wnętrza jądra komórkowego oraz cytoplazmy KD w porównaniu do komórek niestymulowanych (p<0,0001).



Ryc. 9. Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający obecność Hrd. rudnickae 64, Hrd, rudnickae 66 lub N. salaciae w jądrze komórkowym oraz cytoplazmie komórek dendrytycznych (KD). Zielone, fluorescencyjne punkty (zaznaczone białą strzałką) – archeony halofilne; kolor niebieski – jądro komórkowe (n); kolor jasno zielony - cytoplazma. AO – oranż akrydyny, EB – bromek etydyny, KD – komórki dendrytyczne niestymulowane. Skala wielkości = 10 μm.



Ryc. 10. Liczba wniknięć archeonów halofilnych (Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae) w jądrze komórek dendrytycznych (KD) (A) oraz cytoplazmie (B). Dane przedstawiono w postaci średniej \pm odchylenie standardowe. **** $p \leq 0,0001$; minimum 100 zliczeń dla każdego układu, eksperyment powtórzono 4-krotnie (n=4.)

IV.1.2. Ocena stopnia kondensacji i fragmentacji chromatyny KD stymulowanych archeonami halofilnymi

W kolejnym etapie badań sprawdzono, czy stymulacja KD archeonami halofilnymi (Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae) skutkuje zmianami w kondensacji oraz fragmentacji chromatyny komórek dendrytycznych. W tym celu KD stymulowano 24 godz. archeonami halofilnymi według metod opisanych w podrozdziałach III.2.9. i III.2.10., a następnie wybarwiono DAPI (III.2.14). Barwienie komórek z wykorzystaniem DAPI umożliwiło ocenę mikroskopowa jądra komórkowego. DAPI wiażąc się z dwuniciowym DNA pozwala zaobserwować zwiększoną konsensację chromatyny jądrowej oraz stopień fragmentacji chromatyny. Silniej upakowana chromatyna oznacza słabszą ekspresję genów (trudniejszy dostęp czynników transkrypcyjnych do sekwencji nukleotydów), natomiast fragmentacja chromatyny oznacza jej uszkodzenie. Ponadto, doświadczeniu analizowano cytoszkielet KD z wykorzystaniem przeciwciał w monoklonalnych przeciwko ludzkiej β-tubulinie. Zarówno w ocenie stopnia kondensacji chromatyny, jak i procentu fragmentacji chromatyny KD, kontrolę negatywną stanowiły KD niestymulowane, natomiast kontrolę pozytywną KD stymulowane superantygenem SEB (enterotoksyna B S. aureus). Fragmentacje chromatyny oceniono na podstawie fluorescencji jadra komórkowego z wykorzystaniem DAPI, gdzie słabsza fluorescencja wskazywała na zwiększoną fragmentację chromatyny. Niższy poziom fluorescencji oznaczał również mniejszą kondensację chromatyny. Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający kondensację i fragmentację chromatyny przedstawiono na Rycinie 11 [Ryc. 11.]. W wyniku 24 godz. stymulacji KD archeonami halofilnymi, nie zaobserwowano istotnych zmian w stopniu kondensacji chromatyny wewnątrz komórek dendrytycznych w porównaniu do komórek niestymulowanych [Ryc. 11.; 12A], a także w procencie fragmentacji chromatyny KD stymulowanych archeonami halofilnymi, w porównaniu do komórek niestymulowanych [Ryc. 11.; 12B]. Po stymulacji KD SEB nie zaobserwowano istotnych zmian w stopniu kondensacji chromatyny KD w porównaniu do komórek niestymulowanych [Ryc. 11.; Ryc. 12A), natomiast zaobserwowano istotnie wyższy procent fragmentacji chromatyny KD stymulowanych SEB w porównaniu do komórek niestymulowanych (p = 0.0286) [Ryc. 11.; Ryc. 12B].



Ryc. 11. Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający komórki dendrytyczne (KD) niestymulowane, stymulowane Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae wybarwione przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko β -tubulinie (A) oraz komórki barwione DAPI (B). Panel "merge" (C) – połączone obrazy ze wszystkich znaczników. KD – komórki dendrytyczne niestymulowane (kontrola negatywna); SEB – kontrola pozytywna. Skala wielkości = 10 µm.



Ryc. 12. Stopień kondensacji oraz procent fragmentacji chromatyny komórek dendrytycznych (KD) niestymulowanych, stymulowanych Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae. A) Stopień kondensacji chromatyny KD; B) Procent fragmentacji chromatyny KD. Dane przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe. * p < 0,05; n=4; KD – komórki dendrytyczne niestymulowane.

IV.1.3. Ocena obecności jednoniciowych pęknięć DNA w KD stymulowanych archeonami halofilnymi

W celu zbadania wpływu archeonów halofilnych na powstawanie jednoniciowych pęknięć DNA, KD stymulowano 24 godz. archeonami halofilnymi (Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae) zgodnie z metoda opisana w podrozdziałach III.2.9. i III.2.10., a następnie dokonano detekcji PARP-2 według metody opisanej w podrozdziale III.2.15. Wykorzystany w tej technice PARP-2 jest enzymem, który przyłącza się do jednoniciowych pęknięć w DNA. Dzięki wykorzystaniu techniki immunocytochemicznej z użyciem skoniugowanych z fluorochromem przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko PARP-2, identyfikowano DNA, w którym obecne były jednoniciowe pęknięcia. KD niestymulowane stanowiły kontrole negatywną, natomiast KD stymulowane superantygenem SEB stanowiły kontrolę pozytywną. Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający KD z jednoniciowymi pęknięciami DNA przedstawiono na Rycinie 13 [Ryc. 13.] - rycina ta przedstawia panel SSBs (ang. single-strand breaks, jednoniciowe pęknięcia DNA, znacznik – PARP-2), panel DNA (jądro komórkowe barwione DAPI w celu zlokalizowania DNA jądrowego), panel "Actin" (białko cytoszkieletu, aktyna, wybarwione



rodaminą 123) oraz panel połączony (ang. *merged*), gdzie obrazy ze wszystkich znaczników

Ryc. 13. Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający jednoniciowe uszkodzenia DNA w komórkach dendrytycznych. KD – komórki dendrytyczne niestymulowane (kontrola negatywna); Hrd. rudnickae 66, Hrd. rudnickae 64, N. salaciae – KD stymulowane wybranymi szczepami archeonów halofilnych; SEB – KD stymulowane superantygenem SEB (kontrola pozytywna).

A – merged, połączone obrazy ze wszystkich znaczników. (B) SSBs– jednoniciowe uszkodzenia DNA; PARP-2 – enzym wykrywający jednoniciowe uszkodzenia DNA (jasnozielone punkty w panelu SSBs, białą strzałką zaznaczono jednoniciowe uszkodzenia DNA); (C) DAPI– barwnik DNA (niebieski); (D) Actin, aktyna wybarwiona Rhodamine 123 (czerwony);
E - połączone obrazy ze wszystkich znaczników (obraz powiększony). Skala wielkości = 10 μm

Przeanalizowano dwa parametry świadczące o obecności jednonicowych uszkodzeń DNA – indeks fluorescyjnego znakowania (% komórek wykazujących jednoniciowe pęknięcia DNA) [Ryc. 14A] oraz średnią intensywność fluorescencji (parametr informujący o liczbie jednoniciowych pęknięć DNA w jednej komórce – im większa ilość SSBs tym bardziej

intensywna fluorescencja) [Ryc. 14B]. Stymulacja KD *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* nie spowodowała istotnych zmian w odsetku komórek dendrytycznych wykazujących jednoniciowe uszkodzenia DNA [Ryc. 14A]. Nie zaobserwowano również istotnego wzrostu liczby jednoniciowych pęknięć w pojedynczej KD [Ryc. 14B]. W KD stymulowanych SEB (kontrola pozytywna) wykazano istotny wzrost indeksu fluorescencyjnego znakowania (p = 0,0286) [Ryc. 14A] i istotnie wyższą średnią intensywność fluorescencji (p < 0,0001) [Ryc. 14B] w porównaniu do KD niestymulowanych [Ryc. 14.].



Ryc. 14. Jednoniciowe pęknięcia DNA w komórkach dendrytycznych (KD) stymulowanych archeonami halofilnymi. A) Indeks fluorescencyjnego znakowania (odsetek komórek wykazujących jednoniciowe pęknięcia DNA), n=4; B) Średnia intensywność fluorescencji w pojedynczej KD, minimum 8 zliczeń, eksperyment wykonano 4-krotnie. Dane przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe. * $p \le 0,05$; **** $p \le 0,0001$; KD – komórki dendrytyczne niestymulowane, SEB – superantygen S. aureus.

IV.1.4. Ocena obecności dwuniciowych pęknięć DNA w KD stymulowanych archeonami halofilnymi

W celu zbadania wpływu archeonów halofilnych na powstawanie dwuniciowych pęknięć DNA (ang. *double-strand breaks*, DSB) KD stymulowano 24 godz. archeonami halofilnymi (*Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae*) według opisu w podrozdziałach III.2.9. i III.2.10., a następnie oceniono, metodą immunocytochemiczną, fosforylowaną w pozycji Ser139 formę histonu H2AX (fosfo-H2AX; H2AXS139ph; marker dwuniciowych pęknięć DNA) według metody opisanej w podrozdziałe III.2.15. Miejsca przyłączenia fosfo-H2AX do DNA zobrazowano z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej, dzięki

zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromem skierowanych przeciwko fosfo-H2AX, co umożliwia wykrycie dwuniciowych uszkodzeń DNA. KD niestymulowane stanowiły kontrolę negatywną, natomiast KD stymulowane superantygenem SEB stanowiły kontrolę pozytywna.



Ryc. 15. Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający dwuniciowe uszkodzenia DNA w komórkach dendrytycznych. KD – komórki dendrytyczne niestymulowane (kontrola negatywna); Hrd. rudnickae 66, Hrd. rudnickae 64, N. salaciae – KD stymulowane wybranymi szczepami archeonów halofilnych; SEB – KD stymulowane superantygenem SEB (kontrola pozytywna).

A – merged, połączone obrazy ze wszystkich znaczników. (B) DSBs– dwuniciowe uszkodzenia DNA; H2AXS139ph – enzym wykrywający dwuniciowe uszkodzenia DNA (jasnoczerwone punkty w panelu DSBs, białą strzałką zaznaczono dwuniciowe uszkodzenia DNA); (C) DAPI– barwnik DNA (niebieski); (D) B-tubulin, 6-tubulina wybarwiona AlexaFluour488 – przeciwciała monoklonalne skoniugowane z AlexaFluor 488 (zielony); E - połączone obrazy ze wszystkich znaczników (obraz powiększony). Skala wielkości = 10 μm Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający KD z dwuniciowymi pęknięciami DNA przedstawiono na Rycinie 15 [Ryc. 15.] – rycina przedstawia panel DSBs (znacznik – H2AXS139ph), panel DNA (jądro komórkowe barwione DAPI w celu zlokalizowania DNA jądrowego), panel β -tubulin (białko cytoszkieletu, β -tubulina, wybarwione przeciwciałami monoklonalnymi skoniugowanymi z AlexaFluor 488) oraz panel *"merged"*, gdzie fluorescencja wszystkich znaczników została nałożona komputerowo.

Przeanalizowano dwa parametry świadczące o obecności dwuniciowych uszkodzeń DNA – indeks fluorescencyjnego znakowania (% komórek wykazujących dwuniciowe pęknięcia DNA) [Ryc. 16A] oraz średnią intensywność fluorescencji (parametr informujący o liczbie dwuniciowych pęknięć DNA w jednej komórce tj. im więcej DSBs – tym bardziej intensywne świecenie/fluorescencja) [Ryc. 16B]. Stymulacja KD wybranymi szczepami archeonów halofilnych nie spowodowała istotnych zmian w odsetku komórek dendrytycznych wykazujących dwuniciowe uszkodzenia DNA [Ryc. 16A]. Nie zaobserwowano również istotnego wzrostu liczby dwuniciowych pęknięć w pojedynczej KD [Ryc. 16B]. Wykazano istotny wzrost indeksu fluoroscencyjnego znakowania (p = 0,0286) oraz średniej intensywność fluorescencji (p < 0,0001) w KD stymulowanych SEB, w porównaniu do KD niestymulowanych [Ryc. 16.].



Ryc. 16. Dwuniciowe pęknięcia DNA w komórkach dendrytycznych (KD) stymulowanych archeonami halofilnymi. A) Indeks fluorescencyjnego znakowania (odsetek komórek wykazujących dwuniciowe pęknięcia DNA), n=4; B) Średnia intensywność fluorescencji w pojedynczej KD, minimum 20 zliczeń, eksperyment wykonano 4-krotnie. Dane przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe. * $p \le 0,05$; **** $p \le 0,0001$; KD – komórki niestymulowane, SEB – superantygen S. aureus.

IV.1.5. Analiza cyklu komórkowego KD stymulowanych archeonami halofilnymi

W kolejnym etapie pracy zbadano cykl komórkowy KD stymulowanych archeonami halofilnymi - *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae*. W tym celu, KD stymulowano 24 godz. archeonami halofilnymi według opisu w podrozdziałach III.2.9. oraz III.2.10., a następnie przenalizowano cykl komórkowy oznaczony według metody opisanej w podrozdziale III.2.19. z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Barwienie komórek jodkiem propidyny umożliwiło ocenę ilościową zawartości DNA w komórce w określonych fazach cyklu komórkowego

Analizie poddano 4 fazy cyklu komórkowego:

- Fazę subG1 faza charakterystyczna dla komórek apoptotycznych
- Fazę G1 (ang. *gap*, przerwa) faza wzrostu komórek, synteza m.in. białek strukturalnych i enzymów
- Faza S (ang. *synthesis*, synteza) faza, w której dochodzi do replikacji DNA oraz syntezy histonów
- Faza G2 faza syntezy białek wrzeciona podziałowego oraz składników błony komórkowej

Analiza wyników, w której wykorzystano oprogramowanie FlowJo, pozwoliła na ocenę odsetka KD w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Jak przedstawiono na Rycinie 17 [Ryc. 17.], stymulacja KD archeonami halofilnymi nie spowodowała istotnych zmian w cyklu komórkowym w fazach: sub-G1 [Ryc. 17A], G1 [Ryc. 17B], S [Ryc. 17C] oraz G2 [Ryc. 17D]. Z kolei stymulacja KD superantygenem SEB skutkowała istotnym wzrostem odsestka komórek w fazie sub-G1 (p = 0,0286) [Ryc. 17A] oraz w fazie S (p = 0,0095) [Ryc. 17C].



Ryc. 17. Odsetek komórek dendrytycznych (KD) stymulowanych archeonami halofilnymi w poszczególnych fazach cyklu komórkowego – faza subG1 (A), G1 (B), S (C) oraz G2 (D) ocenionych z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Dane przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe. * $p \le 0,05$; ** $p \le 0,01$. Liczba niezależnych eksperymentów n = 7; KD – komórki niestymulowane, SEB – superantygen S. aureus.

IV.1.6. Ocena odsetka KD stymulowanych archeonami halofilnymi będących w stanie apoptozy lub nekrozy

W ostatnim etapie realizacji pierwszego celu szczegółowego oceniono wpływ archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* na proces apoptozy bądź nekrozy KD. Komórki dendrytyczne stymulowano 24 godz. według opisów w podrozdziałach III.2.9. oraz III.2.10., a następnie oceniono odsetek KD w stanie apoptozy lub nekrozy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej według opisu w podrozdziałe III.2.20. W badaniach wykorzystano komercyjny zestaw składający się z aneksyny V znakowanej FITC oraz jodku propidyny. Jodek propidyny wnika do wnętrza komórki przez uszkodzoną błonę komórkową, a następnie wiąże się z kwasami nukleinowymi, natomiast Aneksyna V wiąże się specyficznie z fosfatydyloseryną, która w komórkach ulegających apoptozie przemieszcza się z wewnętrznej na zewnętrzną stronę błony komórkowej. Dzięki barwieniu z wykorzystaniem obu znaczników można rozróżnić trzy populacje komórek:

- komórki niebarwiące się żadnym związkiem komórki żywe
- komórki barwiące się jodkiem propidyny komórki w stanie nekrozy
- komórki barwiące się aneksyną V oraz jodkiem propidyny komórki w stanie apoptozy

Na Rycinie 18 [Ryc. 18.] przedstawiono:

- Odsetek KD niebarwiących się żadnym związkiem komórki żywe [Ryc. 18A]
- Odsetek KD wybarwionych aneksyną V i jodkiem propidyny komórki w stanie apoptozy [Ryc. 18B]
- Odsetek KD barwiących się jedynie jodkiem propidyny komórki w stanie nekrozy [Ryc. 18C]

KD niestymulowane stanowiły kontrolę negatywną, natomiast KD stymulowane superantygenem SEB stanowiły kontrolę pozytywną. W wyniku stymulacji KD archeonami halofilnymi nie zaobserwowano istotnego wzrostu odsetka komórek w stanie apoptozy [Ryc. 18B] lub nekrozy [Ryc. 18C]. Odsetek komórek żywych nie uległ istotnej zmianie w stosunku do komórek stymulowanych i wynosił około 92% [Ryc. 18A]. Stymulacja KD superantygenem SEB skutkowała istotnym wzrostem odsetka komórek w stanie apoptozy (p = 0,0203) [Ryc. 18B]. Reprezentatywny "dot-blot" komórek niestymulowanych lub stymulowanych SEB przedstawiono na Rycinie 18D [Ryc. 18D].



Ryc. 18. Odsetek komórek dendrytycznych (KD) niestymulowanych, stymulowanych Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66, N. salaciae lub SEB (A) żywych; (B) w stanie apoptozy; (C) w stanie nekrozy; (D) reprezentatywny dot-blot przedstawiający komórki niestymulowane (kontrola negatywna) lub stymulowane SEB (kontrola pozytywna). Dane przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe. * $p \le 0,05$. Liczba niezależnych eksperymentów n = 6; KD – komórki niestymulowane, SEB – superantygen S. aureus, FITC - Izotiocyjanian fluoresceiny.

IV.2. Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych stymulowanych archeonami halofilnymi *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* oraz wytwarzania wybranych cytokin [Publikacja 2 oraz wyniki oryginalne, nieopublikowane]

IV.2.1. Określenie optymalnej proporcji archeonów halofilnych użytych do stymulacji KD [Publikacja 2]

KD stymulowano według metody opisanej w podrozdziale III.2.9. Oceniono ekspresję receptorów CD86, CD80, CD83 i CD40 na powierzchni KD stymulowanych *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* w proporcji MOI (ang. *multiplicity of infection*) 0.1; MOI 1 oraz MOI 10, z wykorzystaniem cytometrii przepływowej na podstawie opisu w podrozdziałach III.2.16. oraz III.2.17. Parametr MOI oznacza stosunek stymulatora (w tym przypadku – archeonów halofilnych) do komórek (KD pochodzenia monocytarnego). Zbadano również poziom IL-10, TNF- α oraz IL-12p40 produkowanych przez KD stymulowane różną wartością MOI archeonów halofilnych, z wykorzystaniem testów ELISA według opisu w podrozdziałe III.2.18. Nie wykazano istotnych różnic między MOI 0.1; 1 oraz MOI 10 na poziomie ekspresji receptorów CD86, CD80, CD83, CD40 oraz produkcji cytokin IL-10, TNF- α i IL-12p40. Do dalszych badań wybrano MOI 1 [Publikacja 2; Supplementary Figure 1 oraz Supplementary Figure 2].

IV.2.2. Ekspresja receptorów powierzchniowych na KD stymulowanych archeonami halofilnymi [Publikacja 2]

KD stymulowano według metody opisanej w podrozdziale III.2.9. Oceniono ekspresję receptorów powierzchniowych CD86, CD80, CD83, CD40, HLA-DR, DC-SIGN, TLR2 oraz TLR4 na powierzchni KD stymulowanych *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* (MOI 1) z wykorzystaniem cytometrii przepływowej według opisu w podrozdziałach III.2.16. oraz III.2.17. Na podstawie parametru MFI (ang. *Mean Fluorescent Intensity*, średnia intensywność fluorescencji) wykazano istotnie wyższą ekspresję receptorów CD86 oraz CD80 na powierzchni KD stymulowanych *Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* w porównaniu do komórek niestymulowanych [Publikacja 2; Figure 1A]. Zaobserwowano również istotnie wyższy odsetek KD

wykazujących ekspresję receptorów CD86, CD80 oraz CD83 stymulowanych *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* w porównaniu do komórek niestymulowanych. Jednocześnie, nie wykazano istotnych różnic w ekspresji receptorów CD40, HLA-DR, DC-SIGN, TLR2 oraz TLR4 na KD stymulowanych *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* w porównaniu do komórek niestymulowanych [Publikacja 2; Figure 1B, Supplementary Figure 3, Supplementary Figure 4].

IV.2.3. Produkcja cytokin przez KD stymulowane archeonami halofilnymi [Publikacja 2]

KD stymulowano według opisu w podrozdziale III.2.9. Oceniono produkcję cytokin TNF- α , IL-12p40, IL-12p70, IL-23 oraz IL-10 przez KD stymulowane *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* (MOI 1) z wykorzystaniem testów ELISA, jak opisano w podrozdziale III.2.18. Zaobserwowano istotnie wyższą produkcję TNF- α , IL-12p40 oraz IL-10 przez KD stymulowane *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* w porównaniu do komórek niestymulowanych. Nie zaobserwowano istotnych różnic w intensywności produkcji IL-12p70 oraz IL-23 przez KD stymulowane halofilami w porównaniu do komórek niestymulowanych. [Publikacja 2; Figure 2, Supplementary Figure 5].

IV.2.4. Porównanie zdolności archeonów halofilnych, w formie żywych drobnoustrojów lub lizatów komórkowych, do stymulacji KD [Wyniki oryginalne, nieopublikowane]

Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w poprzednich etapach pracy, postanowiono zbadać, czy jedynie archeony w formie żywej są zdolne do efektywnej stymulacji KD, czy też podobne właściwości będą posiadały antygeny archeonów zawarte w lizacie komórkowym. W pierwszym etapie oceniono skuteczność lizy archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae.* Archeony halofilne przygotowano oraz poddano lizie według metody opisanej w podrozdziale III.2.2. Obecność żywych drobnoustrojów w lizacie komórkowym sprawdzono poprzez wysiew na płynne podłoże HBM i pomiar gęstości optycznej wobec hodowli archeonów halofilnych nie poddanych lizie jak opisano w podrozdziale III.2.1. oraz III.2.2. Wartość OD badanych hodowli mierzono w określonych punktach czasowych: 0 godz. (w momencie przeniesienia lizatu do podłoża HBM), 24 godz.,

48 godz., 72 godz. przy długości fali $\lambda = 600$ nm. Rycina 19 [Ryc. 19.] przedstawia wartości OD lizatów archeonów halofilnych oraz hodoli żywych drobnoustrojów. Nie wykazano istotnego wzrostu wartości OD lizatu archeonów halofilnych, co świadczy o wysokiej skuteczności ich lizy wodą destylowaną. Jednocześnie, w hodowli archeonów halofilnych nie poddanych lizie wykazano wzrost wartości OD, co świadczyło o ich żywotności i zdolności do wzrostu.



Ryc. 19. Ocena skuteczności metody lizy archeonów halofilnych wodą destylowaną. Wzrost wartości OD (λ =600nm) w czasie oznacza przyrost biomasy drobnoustrojów. Wynik przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe. Liczba niezależnych eksperymentów n = 3.

Następnie, KD stymulowano 24 godz. zawiesiną żywych archenów halofilnych (*Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae*) według metody opisanej w podrozdziale III.2.9. lub lizatem archeonów halofilnych przygotowanym jak opisano w podrozdziale III.2.2. Następnie oceniono ekspresję receptorów powierzchniowych (CD86, CD80 i CD83) z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (III.2.16. i III.2.17.) oraz produkcję cytokin (IL-12p40, IL-10, TNF-α) w teście ELISA (III.2.18.). Receptory CD86 oraz CD80 są receptorami synapsy immunologicznej na powierzchni KD; receptory te biorą

udział w prezentacji antygenu limfocytom T. Podwyższona ekspresja receptora CD83 powiązana jest z dojrzewaniem KD. Badane cytokiny należą do cytokin prozapalnych (IL-12p40), przeciwzapalnych (IL-10) lub plejotropowych (TNF-α), co pozwoliło na zbadanie szerokiego spektrum odpowiedzi KD na archeony halofilne. Kontrolę ujemną stanowiły KD niestymulowane archeonami halofilnymi. Na Rycinie 20 [Ryc. 20.] przedstawiono ekspresję receptorów powierzchniowych (CD86, CD80, CD83) na powierzchni KD stymulowanych archeonami halofilnymi na podstawie wartości: MFI [Ryc. 20A] oraz odsetka komórek wykazujących ekspresję danego receptora [Ryc. 20B]. Nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji receptorów powierzchniowych (CD86, CD80 oraz CD83) w wyniku stymulacji KD zawiesina żywych archeonów halofilnych lub lizatem archeonów halofilnych na podstawie parametru MFI [Ryc. 20A], oraz odsetka komórek wykazujących ekspresję danego receptora [Ryc. 20B]. Na Rycinie 21 przedstawiono produkcję cytokin (IL-12p40, IL-10 oraz TNF-α) przez KD stymulowane archeonami halofilnymi [Ryc. 21.]. Nie zaobserwowano istotnych różnic w intensywności produkcji IL-12p40, IL-10 i TNF-α między KD stymulowanymi żywymi archeonami halofilnymi lub lizatem archeonów halofilnych. Zaobserwowano nasiloną ekspresję receptorów CD86, CD80 i CD83 oraz wyższą produkcję cytokin IL-12p40, IL-10 i TNF-α przez KD stymulowane Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae, w porównaniu do niestymulowanych KD. Ze względu, iż eksperyment powtórzono trzykrotnie (w dwóch powtórzeniach na płytce), wyniki nie osiągnęły istotności statystycznej.



Ryc. 20. Ekspresja receptorów CD86, CD80 oraz CD83 na powierzchni KD stymulowanych żywymi archeonami halofilnymi lub lizatem archeonów halofilnych. A) MFI (ang. Mean Fluorescent Intensity, średnia intensywność fluorescencji) receptorów CD86, CD80 i CD83 na powierzchni KD. B) Odsetek KD wykazujących ekspresję receptora CD86, CD80 lub CD83. Kontrolę stanowiły komórki niestymulowane (KD). Dane przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe. Liczba niezależnych eksperymentów n = 3, nie przeprowadzono analizy statystycznej wyników.



Ryc. 21. Produkcja cytokin (IL-12p40, IL-10 oraz TNF- α) przez KD stymulowane żywymi archeonami halofilnymi lub ich lizatem. Kontrolę stanowiły komórki niestymulowane (KD). Dane przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe. Liczba niezależnych eksperymentów n = 3, nie przeprowadzono analizy statystycznej wyników.

IV.3. Ocena odpowiedzi cytokinowej limfocytów T CD4⁺ w ko-hodowlach z komórkami dendrytycznymi stymulowanymi archeonami halofilnymi *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* [Publikacja 2]

IV.3.1. Produkcja IFN-γ oraz IL-13 w ko-hodowli autologicznych limfocytów T CD4⁺ z KD stymulowanymi archeonami halofilnymi

Limfocyty T, poprzez produkcję określonych cytokin, są w stanie odpowiadać w zróżnicowany sposób na antygeny prezentowane przez KD. W doświadczeniu wykorzystano cytokiny charakterystyczne dla odpowiedzi odpornościowej typu Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-13) oraz Th17 (IL-17A). W celu oceny zdolności KD do prezentowania antygenów archeonów halofilnych limfocytom T CD4⁺, KD stymulowano według metod opisanych w podrozdziałach III.2.9., III.2.11. oraz III.2.12. Następnie dodawano zawiesinę autologicznych limfocytów T i oceniono produkcję cytokin IFN- γ , IL-13 oraz IL-17A z wykorzystaniem testów ELISA (III.2.18.). Wykazano istotnie wyższą produkcję IFN- γ oraz IL-13 w ko-hodowli komórek dendrytycznych stymulowanych *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae*. w porównaniu do komórek niestymulowanych, nie zaobserwowano jednak istotnych różnic w produkcji IL-17a [Publikacja 2; Figure 3, Supplementary Figure 6].

IV.3.2. Produkcja IFN-γ i IL-13 w ko-hodowli autologicznych limfocytów T dziewiczych CD4⁺ lub autologicznych limfocytów T pamięci CD4⁺ z KD stymulowanymi archeonami halofilnymi

KD wraz z autologicznymi limfocytami T CD4⁺ dziewiczymi (CD4⁺ CD45RA⁺) oraz limfocytami T CD4⁺ pamięci (CD4⁺ CD45RO⁺) stymulowano według metod opisanych w podrozdziałach III.2.9., III.2.11. oraz III.2.12. Limfocyty dziewicze oraz limfocyty pamięci, z racji wykazywanych różnic (m.in. ekspresja innych receptorów dla chemokin oraz różnych cząsteczek adhezyjnych) odpowiadają w różny sposób na antygeny prezentowane przez KD. Oceniono produkcję IFN-γ oraz IL-13 w ko-hodowli KD stymulownych *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* (MOI 1) z autologicznymi limfocytami dziewiczymi lub limfocytami pamięci z wykorzystaniem testów ELISA (III.2.18.). Wykazano istotnie wyższą produkcję IFN-γ w ko-hodowli KD stymulowanych *Hrd.* *rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* z limfocytami T CD4⁺ dziewiczymi w porównaniu do hodowli z KD niestymulownymi, nie zaobserwowano jednak istotnych różnic w produkcji IL-13 [Publikacja 2; Figure 4]. Nie zaobserwowano również istotnego nasilenia produkcji IFN-γ oraz IL-13 w ko-hodowli KD stymulowanymych *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* z limfocytami T CD4⁺ pamięci w porównaniu, do komórek niestymulowanych [Publikacja 2; Figure 4].

Frontiers | Frontiers in Immunology





Halophilic Archaea Halorhabdus Rudnickae and Natrinema Salaciae Activate Human Dendritic Cells and Orient T Helper Cell Responses

Krzysztof T. Krawczyk¹, Camille Locht^{1,2} and Magdalena Kowalewicz-Kulbat^{1*}

¹ Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland, ² Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR9017 – CIIL – Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France

Halophilic archaea are procaryotic organisms distinct from bacteria, known to thrive in hypersaline environments, including salt lakes, salterns, brines and salty food. They have also been identified in the human microbiome. The biological significance of halophiles for

human health has rarely been examined. The interactions between halophilic archaea and human dendritic cells (DCs) and T cells have not been identified so far. Here, we show for

the first time that the halophilic archaea Halorhabdus rudnickae and Natrinema salaciae

activate human monocyte-derived DCs, induce DC maturation, cytokine production and

autologous T cell activation. In vitro both strains induced DC up-regulation of the cell-

surface receptors CD86, CD80 and CD83, and cytokine production, including IL-12p40,

IL-10 and TNF- α , but not IL-23 and IL-12p70. Furthermore, autologous CD4⁺ T cells

produced significantly higher amounts of IFN-y and IL-13, but not IL-17A when co-

cultured with halophile-stimulated DCs in comparison to T cells co-cultured with

unstimulated DCs. IFN-y was almost exclusively produced by naïve T cells, while IL-13

was produced by both naïve and memory CD4⁺ T cells. Our findings thus show that

halophilic archaea are recognized by human DCs and are able to induce a balanced

cytokine response. The immunomodulatory functions of halophilic archaea and their

potential ability to re-establish the immune balance may perhaps participate in the

Keywords: halophilic archaea, Halorhabdus rudnickae, Natrinema salaciae, dendritic cells, T cells

OPEN ACCESS

Edited by: Esther Christina De Jong,

Academic Medical Center, Netherlands

Reviewed by:

Lei Jin, University of Florida, United States Jalil Mehrzad, University of Tehran, Iran

*Correspondence:

Magdalena Kowalewicz-Kulbat magdalena.kowalewicz@ biol.uni.lodz.pl

Specialty section:

This article was submitted to Microbial Immunology, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: 11 December 2021 Accepted: 28 April 2022 Published: 26 May 2022

Citation:

Krawczyk KT, Locht C and Kowalewicz-Kulbat M (2022) Halophilic Archaea Halorhabdus Hudnickae and Natrinema Salaciae Activate Human Dendritic Cells and Orient T Helper Cell Responses. Front. Immunol. 13:83635. doi: 10.3389/immu.2022.833635

Archaea represent a separate domain of life, with unique genetic and biochemical features, distinct from Eukaryotes and bacteria (1, 2). Initially, archaea were described as extremophiles – organisms able to live in extreme environmental conditions, ranging from artificial solar salterns, to natural brines in coastal and submarine pools and salt mines, high/low temperature, pressure, dryness, radiation, pH, concentration of heavy metals or salinity. Halophiles are the habitants of hypersaline environments and possess the unique cellular enzymatic machinery, involved in balancing the

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

1

beneficial effects of halotherapies.

INTRODUCTION

osmotic stress, allowing them to thrive in high salinity. A "Salt-in" strategy based on accumulating concentrations of KCl equal to those of NaCl and the presence of specific halophilic enzymes play a key role in their survival (3).

Salt-rich environments are the basis of halotherapy, a treatment where patients inhale air from pollutants-free saltmines (4). Halotherapy may have a beneficial effect on the quality of life of asthmatics (5). Polish salt-mines, where halotherapy is performed, are health resorts in Bochnia and Wieliczka (6). However, in addition to salt-saturated air, the air of these mines also contain various micro-organisms, including halophilic Archaea (7–9), such as *Halorhabdus rudnickae*, isolated from the Wieliczka salt-mine (9).

Archaeal species, including halophiles, have also been identified in the human microbiome (10). They have been detected in human stool samples (11) and in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease patients (12). However, so far, no pathogenic strain of halophiles has been identified. While the interactions of other types of Archaea, such as Methanoarchaea, with innate immune cells have been studied in mice and humans (13–15), until now there are no reports describing the interaction between halophiles and human immune cells.

As dendritic cells (DCs) are the prime professional antigenpresenting cells (16), which link innate and adaptive immunity (16, 17) and control T-cell responses by the delivery of costimulatory signals and cytokines (18), we examined here the effect of the halophilic archaeal strains *Hrd. rudnickae* 64, *Hrd. rudnickae* 66 and *Natrinema salaciae* on human monocytederived DCs (DCs) and T cells. We examined the expression of surface markers on DCs and the cytokine production by DCs, as well as by autologous CD4⁺ T cells, naïve CD45RA⁺CD4⁺ T and memory CD45RO⁺CD4⁺T cells, co-cultured with halophilestimulated DCs. The main conclusion of this paper is that the two studied species of halophilic archaeons are recognized by human DCs and are able to induce a balanced Th1/Th2 cytokine response.

RESULTS

Halophilic Archaea Induced Expression of CD86, CD80 And CD83 On Human DCs

To determine the effect of halophilic archaea on human DCs the cells were stimulated with *Hrd. rudnickae* 64, *Hrd. rudnickae* 66 or *N. salaciae* at MOIs of 1:1 ($1x10^6$ DCs: $1x10^6$ archaea) for 24h. Expression of surface markers was evaluated by flow cytometry. In preliminary experiments we have tested different MOI, 0.1:1, 1:1 and 1:10 and found that for most markers the MOI of 1:1 was the most appropriate (**Supplementary Figures S1, S2**), with respect to both the fluorescence intensity and frequency. In all subsequent experiments we therefore used the MOI of 1:1. Stimulation with *Hrd. rudnickae* 64, *Hrd. rudnickae* 66 or *N. salaciae* resulted in significantly increased expression of CD86 cells (**Supplementary Figure S3** and **Figure 1A**). Incubation of

the DCs with these halophiles also resulted in a significantly increased percentage of DCs expressing CD86 and CD80 in comparison to non-stimulated cells (Figure 1B). DCs stimulated with halophilic archaea also showed significantly higher percentage of cells expressing CD83 than unstimulated cells (Figure 1B), while there was a trend only for increased mean fluorescence intensity (Figure 1A). In contrast to these surface markers, DCs stimulated with the halophiles did not appear to increase the expression of CD40 (Figure 1). As expected for the controls, DCs stimulated with *E. coli* LPS significantly increased the expression of all four surface markers [data not shown]. No significant changes in HLA-DR, DC-SIGN, TLR2 and TLR4 expression on DCs stimulated with halophilic archaea was observed (Supplementary Figure S4).

DC Stimulated With Halophilic Archaea Produced IL-12p40, IL-10 and TNF- α but Not IL-23 and IL-12p70

To investigate further the effect of DCs stimulation with *Hrd. rudnickae* 64, *Hrd. rudnickae* 66 or *N. salaciae*, cytokines levels were measured by ELISA. After 24h of stimulation with halophilic archaea at a MOI of 1:1, cytokine secretion was measured by ELISA in duplicates. Stimulated DCs showed significantly higher production of IL-12p40, IL-10 and TNF- α than unstimulated cells (**Figure 2**), but did not induce IL-23, no IL-12p70 production (**Supplementary Figure S5**). For all analyzed cytokines, stimulation with *E. coli* LPS resulted in significantly higher production than unstimulated cells [data not shown].

Autologous CD4⁺ T Cells Co-cultured With Halophilic Archaea-Stimulated DCs Produced IFN-γ and IL-13

As DCs are able to orient the immune responses towards Th1, Th2 or Th17 profiles, we investigated whether the DCs stimulated by the halophilic archaea may orient the T cell responses preferably to one or the other profile. Therefore, autologous CD4⁺ T cells were co-cultured with the stimulated DCs, and the production of IFN- γ , IL-13 and IL-17A, as a Th1, Th2 and Th17 cytokine representative, respectively, in the DC-T cell co-cultures were determined. DCs were thus stimulated for 24h with *Hrd. rudnickae* 64, *Hrd. rudnickae* 66 or *N. salaciae* at MOIs of 1:1. Autologous CD4⁺ T cells were then added in a 1:10 ratio (1x10⁵ DCs: 1x10⁶ CD4⁺ T cells). This ratio was chosen based on previous studies using different stimuli in our laboratory (19) and by others (20–22). After 96h of co-culture the cytokine levels were measured by ELISA in duplicates.

Autologous CD4⁺ T cells produced significantly higher amounts of both IFN- γ and IL-13 (**Figure 3**) in response to *Hrd. rudnickae* 64-, *Hrd. rudnickae* 66- or *N. salaciae*-stimulated DCs in comparison to T cells co-cultured with unstimulated DCs but did not stimulate IL-17A production (**Supplementary Figure S6**). As expected, for all analyzed cytokines, stimulation with *E. coli* LPS resulted in significantly higher production of these cytokines than for control cells (data not shown).

2





Naïve but not Memory T Cells Produced IFN-γ When Co-Cocultured With Halophile-Stimulated DCs

To determine whether the IFN- γ and IL-13 cytokine responses came from naïve or from memory CD4⁺ T cells, DCs were stimulated for 24h with *Hrd. rudnickae* 64, *Hrd. rudnickae* 66 or *N. salaciae*, and autologous naïve or memory CD4⁺ T cells were then added in a 1:10 ratio. After 96h of co-culture the cytokine levels were determined by ELISA in duplicates.

As shown in **Figure 4**, naïve $CD4^+T$ cells co-cultured with halophile-stimulated DCs were the main $CD4^+T$ cell subsets producing significantly higher amounts of IFN- γ in comparison to T cells incubated with unstimulated DCs. Only minimal amounts of IFN- γ were produced by memory $CD4^+T$ cells cocultured with halophile-stimulated DCs, and no significant differences were observed compared to memory CD4⁺ T cells co-cultured with non-stimulated DCs (**Figure 4**). For IL-13 a trend of increased production was noted by both naïve and memory CD4⁺ T cells, which, however, did not reach statistically significance compared to co-cultures with untreated DCs.

DISCUSSION

The human body is exposed to halophilic archaea present in environments such as salt mines, in the human intestine and on skin (23, 24), as well as in salty food, including salted fish, ham and sausages (25). In this study we focused on the effect of two



Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

3





halophilic archaeal species, *Hrd. rudnickae* and *N. salaciae* on the human immune system. Both halophilic species activated DCs by the upregulation of the surface markers CD80, CD86 and CD83, while CD40, HLA-DR and DC-SIGN and TLR 2 and 4 were not upregulated by *in vitro* incubation of the DCs with these halophilic species. Furthermore, both species triggered the secretion of IL-12p40, IL-10 and TNF- α , suggesting a balanced immune activation. IL-23 was not induced by the two halophilic species.



FIGURE 4 | Cytokine secretion by nave and memory CU4 1 cells cocultured with halophile-stimulated DCs. Secretion of IFN- γ and IL-13 by human naive (left panels) and memory (right panels) T cells following 96 h coculture with *Hrd. rudnickae* 64-, *Hrd. rudnickae* 66- or *N. salaciae*-pulsed autologous DCs (ratio DCs/T cells, 1:10) was measured in duplicates by ELISA. Data shown represent the means ± SD of 7 donors. Statistical analyses were performed using the Mann–Whitney U test for unpaired data. **p < 0.01 versus control (unstimulated DC).

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

4

May 2022 | Volume 13 | Article 833635

Since the two halophiles induced IL-10 by human DCs their effect may be anti-inflammatory, which is consistent with halotherapy having a beneficial effect for asthmatics (5), patients with chronic bronchitis, chronic obstructive bronchopneumopathy (4) and cystic fibrosis (26). It has also been proposed as an adjunct to conventional treatment of sub-obstructive adenotonsillar syndrome (27). By their immunoregulatory properties halophilic archaea may thus potentially contribute to the anti-inflammatory processes during halotherapy. Although this study was performed on species found in either a salt mine (*Hrd. rudnickae*) or the Mediterranean Sea (*N. salaciae*), the fact that they induce the same type of immune activation, although representing distinct genera, suggests that our observations may be broadly applicable to halophilic archaea.

Immunomodulatory properties of halophilic archaea have so far not yet been investigated, but phylogenetically closely related Methanobacteriales have been shown to also activate the mammalian immune system. Methanospera stadtmanii was found to trigger the accumulation of myeloid DCs in aerosolexposed mice, while another methanogenic archaeal species, Methanobrevibacter smithii, was less potent in inducing myeloid DCs accumulation in the airways (13). Cytokine responses and surface marker expression were not measured in that study. However, a subsequent study showed that both species were able to induce the release the TNF- α by human PBMCs in vitro, but M. stadtmanii induced a four-fold higher response than M. smithii (14). Interestingly, M. stadtmanii was also isolated with a higher prevalence from stools of inflammatory bowel disease patients than of controls, unlike M. smithii, which was isolated at similar frequencies in both groups, suggesting a potential role of M. stadtmanii in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Increased TNF-a and IL-1ß secretion by human DCs stimulated with M. stadtmanii over M. smithii was confirmed by Bang et al. (15). In addition, these authors analysed the DC expression of CD86 and found that the expression of this surface marker was higher on DCs stimulated with M. stadtmanii than with M. smithii. The

production of IL-10 induced by these archaea was not investigated. In contrast to these studies, we did not detect differences between the two species studied here with respect to DC activation. Furthermore, halophilic archaea have not been associated so far with any disease manifestation, possibly because of their ability to induce a balanced pro- and anti-inflammatory innate response, as shown here. On the other hand, halophilic archaea have been detected in human samples much less frequently than methanogenic archaea, which may be one of the reasons why the former have attracted less attention than the later. Nevertheless, halophilic archaea have been isolated from biopsies and faecal samples of inflammatory bowel disease patients (12). However, they have also been detected in intestine of healthy subjects (25, 28), although a recent study showed that halophilic archaea are more frequently present in stool samples from colorectal cancer patients than in healthy subjects (29).

Since DCs are crucial for the induction of adaptive immune responses and are key players in the orientation of T cell responses, we also investigated whether the activation of human DCs by halophilic archaea may have a downstream effect on T cells. When autologous CD4+ T cells were cocultured with Hrd. rudnickae- or N. salaciae-activated DCs, both IFN-y and IL-13 expression was induced, indicating a mixed Th1 and Th2 activation. In this study we have used the autologous T cells that were frozen during DC differentiation and thawed before incubation with the DCs rather than freshly isolated T cells. We had to use frozen and thawed T cells because it was legally not possible to bleed the donors again six days after the initial blood draw. We tested the viability of the T cells after freezing and thawing by trypan blue exclusion, although this method does not inform about apoptosis or functionality of the T cells. However, the fact that the frozen/ thawed T cells secrete Th1- and Th2-type cytokines indicates that they remained functional after the freezing/thawing cycle. Although similar studies have not been performed with other archaea yet, Blais-Lecours et al. (13) have previously shown that the number of lymphocytes were elevated in the bronchiolar lavage fluids of mice intranasally instilled with M. smithii or M. stadtmanae in a dose-dependent manner. These lymphocytes were essentially CD4⁺ T cells and CD19⁺ B cells. Both methanogenic archaea also induced antigen-specific IgG in the serum of these mice. Serum IgG against M. smithii, as well as against other methanogenic archaea, such as Methanobrevibacter oralis, were also detected in human patients with periodontitis (30), indicating that they are also immunogenic in humans. This was later confirmed by a study showing that inflammatory bowel disease patients that had detectable levels of M. stadtmanae in their stool, as evidenced by qPCR, also mounted specific serum IgG responses against this microorganism (14). This was not the case in patients for which M. smithii had been identified in their stools, again showing a difference in the two methanogenic archaea. However, T cell responses have not been investigated in this study. In our study, like for the DC activation, we found no significant differences in the CD4⁺ T cell responses between Hrd. rudnickae and N. salaciae. Both induced a comparable level

of Th1 and Th2 responses by the T cells co-cultured with the halophile-stimulated DCs. The IFN- γ was almost exclusively produced by naïve T cells, while IL-13 might be produced by both naïve and memory CD4⁺ T cells.

To our knowledge, this is the first report on the effect of halophilic archaea on the maturation of human DCs and the subsequent orientation of CD4+ T cells. However, archaeosomes, which are unique liposomes composed of specific lipid extracts from halophilic archaea, almost exclusively from Halobacterium salinarum, have been produced and assessed as vaccine vehicles against various pathogens [for a recent review see (31)]. These liposomes have been shown to induce both antibody and T cell responses to the passenger antigens, implying that halophile compounds can activate antigen-presenting cells and trigger adaptive immunity. The ligands that trigger DC activation have not been identified yet. Archaea do not produce LPS and lack murein in the cell wall, but, instead, produce unusual ether lipids that do not engage TLR4 or TLR2. However, archaeal RNA may be a potent inducer of the TLR8- or TLR7-dependent NLRP3 inflammasome, as has been shown for M. stadtmaniae (32). It remains to be seen whether this also applies to halophilic archaea. In our study we have not characterized the compounds that may be responsible for the observed effects, which needs further analyses to identify potential DC ligands. Therefore, the mechanism used by halophilic archaea to activate DCs is not yet known and awaits identification of these ligands, which is currently being pursued in our laboratory.

Archaea are generally not considered as pathogenic organisms, although methanogenic archaea have been linked to various human diseases, such as colon cancer, inflammatory bowel disease and periodontitis (33). However, so far there has been no conclusive evidence that they may be causative agents of human diseases, and it is unlikely that they are bona fide pathogens (34). Instead, they rather seem to be part of the normal microbiota (35) and may even exert positive effects in the gastro-intestinal tract, by serving as a hydrogen sink (36).

In contrast to methanogenic archaea, halophilic archaea have only rarely been associated with disease in humans. A recent study with colorectal cancer patients found enrichment of halophilic archaea and depletion of methanogenic archaea in their stool compared healthy controls (29). However, this enrichment was concurrent with an enrichment of *Bacteroides fragilis*, a known oncogenic bacterium (37), and it remains to be determined whether archaea dysbiosis in favor of certain halophilic species contributes to the pathogenesis of colorectal cancer. On the other hand, beneficial effects of halophilic archaea have been illustrated and it has been proposed that they may be used to improve the safety and quality of salted fish, by decreasing the risk of histamine poisoning (38).

Much work needs thus to be done in order to determine the effects of halophilic archaea in human health and disease. Although essentially classified as extremophiles, halophilic archaea may also survive and replicate in mesophilic conditions, such as the human gut and skin. The fact that they can promote a balanced Th1/Th2 and pro-/anti-inflammatory immune response, as shown here for two species from different genera, suggests a

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

5
potential for these organisms to re-establish the immune balance in patients suffering from immune dysfunction, such as inflammatory diseases, including allergic asthma.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Halophilic Archaea

Hrd. rudnickae 64 (WSM-64^T=DSM29498^T), Hrd. rudnickae 66 (WSM-66=DSM29499) and N. salaciae ($DSM 25055^{T}$) were kindly provided by Dr. Luciana Albuquerque and Prof. Milton S. da Costa from the University of Coimbra, Portugal (9, 39). Hrd. rudnickae strains are red pigmented, non-motile coccishaped Gram-negative facultative anaerobes with optimum growth at 40°C in 20% NaCl. The major polar lipids are phosphatidylglycerol (PG2), phosphatidylglycerol phosphate methyl ester (PGP-Me) and sulfated diglycosyl diether (S-DGD). Menaguinone MK-8 was the major respiratory guinone (9). N. salaciae is a Gram-negative, pleomorphic, non-motile procaryotic microorganism with optimal growth at 45°C in 15-20% NaCl. The major polar lipids are phosphatidylglycerol (PG1 and PG2), phosphatidylglycerol phosphate methyl ester (PGP-Me) and mannose-2,6-dissulfate $(1 \rightarrow 2)$ -glucose glycerol diether (S2 -DGD) (39). Halophilic strains were cultivated in 100 mL of Halobacteria medium (HBM) (5 g/L yeast extract, 5 g/L casamino acids, 1 g/L Na-glutamate, 2 g/L KCl, 3 g/L Na3citrate, 20 g/L MgSO₄ x 7 H₂O, 36 mg/L FeCl₂ x 4 H₂O, 360 ng/L MnCl2 x 4 H2O) in 300 mL Erlenmeyer flasks. Hrd. rudnickae 64 and Hrd. rudnickae 66 were grown in halophilic medium with 20% of NaCl at 37°C for 48h, while N. salaciae was grown in halophilic medium with 15% of NaCl at 45°C for 48h.

Growth of halophilic cultures was monitored by the optical density measurements at 600 nm (OD_{600}), and colony-forming unit numbers were determined by growth on HBM with 2% agar. For DC stimulation, archaea from 48h cultures at logarithmic growth were harvested. Halophiles were centrifuged at 4°C for 15 min at 4,500 x g. The pellets were washed by transferring them to new tubes, resuspended in 10 mL of 4°C PBS and centrifuged at 4°C for 15 min at 4,500 x g. Finally, cells were resuspended in complete RPMI.

CD14⁺ and CD14⁻ Cell Purification From PBMCs by Magnetic Cell Sorting

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from anonymized, commercially available buffy coats of 7 healthy human blood donors (Regional Blood Donation Station, Lodz, Poland). The cells were diluted in PBS without Mg^{2+} and Ca^{2+} , layered on a Ficoll-Paque PLUS, centrifuged 1,100 x g at 20°C for 30 min, collected and washed in cRPMI-1640 medium as described (40). Human blood monocytes were purified from PBMCs by positive immunomagnetic separation using antihuman CD14⁺ MACS Microbeads (Miltenyi Biotech, Germany) as described (19). Human CD4⁺ T cells were isolated from the CD14⁻ fraction by positive immunomagnetic separation on a LS column using anti-human CD4 MACS Microbeads (Miltenyi Biotech, Germany) in accordance with

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

6

May 2022 | Volume 13 | Article 833635

manufacturer specifications. CD4⁺ cells were frozen in freezing medium (45% cRPMI-1640, 45% FCS, 10% DMSO) and stored in -80°C until further use, as described (41). Frozen CD4⁺ T cells were used, as we had to wait for the generation of DCs by incubation of monocytes with GM-CSF and IL-4 during 6 days to be able to use autologous DCs and CD4⁺ T cells from the same donor at the same day. After thawing of the T cells, viability was assessed by trypan blue exclusion staining.

Generation of Human DCs

The monocytes were suspended in RPMI-1640 supplemented with 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 2 mM Lglutamine (Gibco, Grand Island, NY) and enriched with 10% (v/v) FCS (heat inactivated; Cambrex, Belgium) (complete RPMI-1640, cRPMI-1640). The density was adjusted to 1×10^6 cells/ml and the cells were seeded into 6-well flat-bottom plates (Falcon) and cultured for 6 days at 37°C, 5% CO₂ in cRPMI-1640 medium in the presence of 10 ng/ml IL-4 and 25 ng/ml GM-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN) to allow cells to differentiate into DCs. The mean percentages of DCs obtained from monocytes isolated from buffy coats was 54.69%.

DC Stimulation

Immature DCs at a density of 1×10^6 cells/mL were incubated for 24 h (37°C, 5% CO₂) with 1×10^6 cells *Hrd. rudnickae* 64, *Hrd. rudnickae* 66 or *N. salaciae.* Lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* O55:B5 (1 µg/mL) (Sigma) was used as a positive control, while DCs in cRPMI-1640 medium alone represented the negative control. Collected supernatants of the cultures were tested for IL-10, TNF- α , IL-12p40, IL-12p70 and IL-23 by ELISA using Diaclone's kit (Immuniq, Zory, Poland). Detection sensitivities were: 5 pg/mL for IL-10, 8 pg/mL for TNF- α , 2.2 pg/ml for IL-12p70 and 20 pg/mL for IL-12p40 and IL-23.

DC Surface Marker Analysis by Flow Cytometry

To determine the expression of DCs surface markers, the stimulated and unstimulated DCs were harvested from the 6well plates using PBS/2mM EDTA, then washed in PBS and stained for 30 min. at 4°C with the following mAb (BectonDickinson): fluorescein isothiocyanate (FITC)conjugated anti-CD86, (FITC)-conjugated anti-CD40, (FITC)conjugated anti-DC-specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin(DC-SIGN), (FITC)-conjugated anti-HLA-DR, or phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD80, (PE)conjugated anti-CD83, (PE)-conjugated anti-TLR2, (PE)conjugated anti-TLR4. An irrelevant isotype-matched mAb was used as control. Living cells were gated using forward and side scatter properties (FSC/SSC) and then using the specific markers indicated above. Data were analyzed using the FACS LSRII (BD) and FlowJo software. A minimum of 5,000 events was collected. Compensations were calculated using BD Compbeads with the automatic compensation program. Data are expressed as percentage of cells expressing the marker (% gated) and the mean fluorescence intensities (MFI), representing the molecular densities on the cell surface for each marker, after subtraction of the isotype control. The gating strategy and exemplary dot plots

Co-Culture of DCs and Autologous CD4⁺ T Lymphocytes

The frozen CD4⁺ T lymphocytes were thawed and co-cultured with the autologous antigen-stimulated DCs at a ratio of 1x10⁶ DCs to 1x10⁷ T cells for 96h at 37°C with 5% CO₂. Collected supernatants were tested for IFN- γ , IL-17A, and IL-13, production by ELISA using commercially available Diaclone's kit (Immuniq, Zory, Poland). Detection sensitivities were: 5 pg/mL for IFN- γ , 2.3 pg/ml for IL-17A and 1.5 pg/mL for IL-13.

Naive and Memory CD4⁺ T Cell Isolation

Naïve CD45RA⁺CD4⁺ T cells and memory CD45RO⁺CD4⁺ T cells were isolated from the eluted CD14⁻ cell fraction by using a naïve CD4⁺ T cell isolation kit and a memory CD4⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec), respectively, as described (19). Both cell fractions (purity>95%) were frozen at -80°C in freezing medium (45% cRPMI-1640, 45% FCS, 10% DMSO), as described (41), until used.

Co-Culture of DCs and Autologous Naive and Memory CD4⁺ T Cells

The frozen naïve CD45RA⁺CD4⁺ T cells and memory CD45RO⁺CD4⁺ T lymphocytes were thawed and co-cultured with the autologous halophile-stimulated DCs at a ratio of 1×10^6 DCs to 1×10^7 T cells for 96h at 37°C with 5% CO₂. Collected supernatants were tested for IFN- γ , and IL-13 production by ELISA using commercially available Diaclone's kit (Immuniq, Zory, Poland).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 7 and STATISTICA 12.0 PL program. Data are expressed as mean ± SD. Differences between samples were analyzed by the analysis of variance Kruskal-Wallis non-parametric test and Mann-Whitney U test. *p* values ≤0.05 were considered significant.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethics Committee at the University of Lodz, Poland (3/KBBN-UŁ/II/2017). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, MK-K and CL. Funding acquisition, KK and MK-K. Performed the experiments, KK and MK-K. Analyzed the data, MK-K, KK and CL. Contributed reagents/materials, KK, MK-K. Writing—original draft preparation, MK-K, CL and KK. Writing—review and editing, MK-K, CL. All authors reviewed and accepted the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the National Science Centre grant no 2017/27/N/NZ6/02850 awarded to KK and Visiting Research Fellow "Initiative of Excellence - Research University (IDUB) project, University of Lodz 2021 awarded to CL.

ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank Prof. Milton S da Costa and Dr Luciana Albuquerque (University of Coimbra, Portugal) for providing archaeal strains. Halophilic archaeons strains were cultured using the equipment from the Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022. 833635/full#supplementary-material

Supplementary Figure 1 | CD86, CD80, CD83 and CD40 expression on human DCs stimulated with helphilic archaea at various MOI. Human DCs from blood donors were stimulated for 24h either with *Hrd. rudnickae* 64, *Hrd. rudnickae* 66 or *N. salaciae* (MOI 0.1:1, 1:1, 1:10) or were left unstimulated (DC). Fluorescence intensity is expressed as MFI (cnce for each donor) of CD86, CD80, CD83 and CD40 surface expression on DC from which the MFI obtained with an isotype-matched antibody was subtracted (**A**), and the percentages of positive cells with CD86, CD80, CD83 and CD40 expression on the DC surface was calculated (**B**). Data shown represent the means ± SD of 3 healthy independent donors.

Supplementary Figure 2 | L-10, TNF-α, L-12p40 production by DCs stimulated with halophilic archaea at various MOI. Human DCs were stimulated either with *Hrd. nuclickae* 64, *Hrd. nuclickae* 66 or *N.* salaciae (MOI 0.1:1, 1:1, 1:10) or were left unstimulated DC; for 24h. The levels of IL-10, TNF-α, IL-12p40 secretion by stimulated DCs were measured in duplicates by ELISA. Data shown represent the means ± SD of 3 donors.

Supplementary Figure 3 | Surface marker CD86, CD80, CD83 and CD40 expression on human DCs stimulated with halophilic archaea. Human DCs from a healthy blood donor were stimulated for 24h either with *Hrd. rudnickae* 64, *Hrd. rudnickae* 66, *N. salaciae* or were left unstimulated (DC). Histograms represent the surface expression of CD86, CD80, CD83 and CD40 on DCs for one representative donor.

Supplementary Figure 4 | Surface marker HLA-DR, DC-SIGN, TLR2 and TLR4 expression on human DCs stimulated with halophilic archaea. Human DCs from blood donors were stimulated for 24h either with *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 or N. sałaciae* or were left unstimulated (DC). Fluorescence intensity is expessed

7

May 2022 | Volume 13 | Article 833635

REFERENCES

- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc Natl Acad Sci U.S.A. (1990) 87:4576–9. doi: 10.1073/pnas.87.12.4576
- Bang C, Schmitz RA. Archaea Associated With Human Surfaces: Not to be Underestimated. *FEMS Microbiol Rev* (2015) 39:631–48. doi: 10.1093/femsre/ fuv010
- Edbeib MF, Wahab RA, Huyop F. Halophiles: Biology, Adaptation, and Their Role in Decontamination of Hypersaline Environments. World J Microbiol Biotechnol (2016) 32:135. doi: 10.1007/s11274-016-2081-9
- Rashleigh R, Smith SM, Roberts NJ. A Review of Halotherapy for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis (2014) 9:239–46. doi: 10.2147/COPD.S57511
- Crisan-Dabija R, Sandu IG, Popa IV, Scripcariu DV, Covic A, Burlacu A. Halotherapy-An Ancient Natural Ally in the Management of Asthma: A Comprehensive Review. *Healthc (Basel)* (2021) 9:1604. doi: 10.3390/ healthcare9111604
- Zajac J, Bojar I, Helbin J, Kolarzyk E, Owoc A. Salt Caves as Simulation of Natural Environment and Significance of Halotherapy. Ann Agric Environ Med (2014) 21:124–7.
- Gorny RL, Fraczek K, Ropek DR. Size Distribution of Microbial Aerosols in Overground and Subterranean Treatment Chambers at Health Resorts. J Environ Health Sci Eng (2020) 18:1437–50. doi: 10.1007/s40201-020-00559-9
- Gębarowska E, Pusz W, Kucińska J, Kita W. Comparative Analysis of Airborne Bacteria and Fungi in Two Salt Mines in Poland. Aerobiol (Bologna) (2018) 34:127–38. doi: 10.1007/s10453-017-9502-6
- Albuquerque L, Kowalewicz-Kulbat M, Drzewiecka D, Staczek P, d'Auria G, Rossello-Mora R, et al. Halorhabdus Rudnickae Sp. Nov., A Halophilic Archaeon Isolated From a Salt Mine Borehole in Poland. Syst Appl Microbiol (2016) 39:100-5. doi: 10.1016/j.syapm.2015.12.004
 Cavicchioli R, Archaea-timeline of the Third Domain. Nat Rev Microbiol
- Cavicchioli R. Archaea-timeline of the Third Domain. Nat Rev Microbiol (2011) 9:51–61. doi: 10.1038/nrmicro2482
- Khelaifia S, Caputo A, Andrieu C, Cadoret F, Armstrong N, Michelle D, et al. Genome Sequence and Description of *Haloferax Massiliense* Sp. Nov., A New Halophilic Archaeon Isolated From the Human Gut. *Extremophiles* (2018) 22:485–98. doi: 10.1007/s00792-018-1011-1
- Oxley AP, Lanfranconi MP, Würdemann D, Ott S, Schreiber S, McGenity TJ, et al. Halophilic Archaea in the Human Intestinal Mucosa. *Environ Microbiol* (2010) 12:2398–410. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02212.x
- Blais Lecours P, Duchaine C, Tailléfer M, Tremblay C, Veillette M, Cormier Y, et al. Immunogenic Properties of Archaeal Species Found in Bioaerosols. *PloS One* (2011) 6:e23326. doi: 10.1371/journal.pone.0023326
 Blais Lecours P, Marsolais D, Cormier Y, Berberi M, Haché C, Bourdages R,
- Blais Lecours P, Marsolais D, Cormier Y, Berberi M, Haché C, Bourdages R, et al. Increased Prevalence of Methanosphaera Stadtmanae in Inflammatory Bowel Diseases. PloS One (2014) 9:e87734. doi: 10.1371/journal.pone.0087734
 Bang C, Weidenbach K, Gutsmann T, Heine H, Schmitz RA. The Intestinal
- Bang C, Weidenbach K, Gutsmann T, Heine H, Schmitz RA. The Intestinal Archaea Methanosphaera Stadtmanae and Methanobrevibacter Smithii Activate Human Dendritic Cells. PloS One (2014) 9:e99411. doi: 10.1371/ journal.pone.0099411
- Gardner A, de Mingo Pulido A, Ruffell B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. Front Immunol (2020) 11:924. doi: 10.3389/ fimmu.2020.00924
- Klechevsky E. Functional Diversity of Human Dendritic Cells. Adv Exp Med Biol (2015) 850:43–54. doi: 10.1007/978-3-319-15774-0_4

8

Supplementary Figure 6 | IL-17A secretion by CD4⁺ T cells co-cultured with halophile-stimulated DCs. Secretion of IL-17A by human CD4⁺ T cells following 96 h co-culture with *Hrd. rudnickae* 64-, *Hrd. rudnickae* 66- or *N. salaciae*-pulsed autologous DCs (ratio DCs:T cells, 1:10) was measured in duplicates by ELISA. Data shown represent the means ± SD of 7 donors.

Supplementary Figure 7 | Gating strategy for human DCs based on FSC/SSC criteria. Unstimulated DCs from blood donors were gated based on the forward (FSC) and side (SSC) scatter measurements (A). Exemplary dot-plots showing human DCs stimulated for 24h with *Hrd. rudnickae* 64 and stained for CD86-FITC (B) or CD80-PE (C) are shown for one representative donor.

- Waisman A, Lukas D, Clausen BE, Yogev N. Dendritic Cells as Gatekeepers of Tolerance. Semin Immunopathol (2017) 39:153–63. doi: 10.1007/s00281-016-0583-z.
- Kowalewicz-Kulbat M, Szpakowski P, Locht C, Biet F, Kaplonek P, Krawczyk KT, et al. Tuberculin Skin Test Reaction is Related to Memory, But Not Naive CD4(+) T Cell Responses to Mycobacterial Stimuli in BCG-Vaccinated Young Adults. *Vaccine* (2018) 36:4566–77. doi: 10.1016/ j.vaccine.2018.05.068
- Yang SH, Yu CL Yang YH, Yang YH. The Immune-Modulatory Effects of a Mixed Herbal Formula on Dendritic Cells and CD4+ T Lymphocytes in the Treatment of Dust Mite Allergy Asthma and Parennial Allergic Rhinitis. J Asthma (2016) 53:446–51. doi: 10.3109/02770903.2015.1104692
- Messmer D, Ignatius R, Santisteban C, Steinman RM. The Decreased Replicative Capacity of Simian Immunodeficiency Virus SIVmac239Delta (nef) is Manifest in Cultures of Immature Dendritic Cellsand T Cells. J Virol (2000) 74:2406–13. doi: 10.1128/JVI.74.5.2406-2413.2000
- Ratajczak C, Duez C, Grangette C, Pochard P, Tonnel A-B, Pestel J. Impact of Lactic Acid Bacteria on Dendritic Cells From Allergic Patients in an Experimental Model of Intestinal Epithelium. J BioMed Biotechnol (2007) 2007;71921. doi: 10.1155/2007/71921
- Huler J, Latimer AM, Henley JB, Rountree NR, Fierer N, Lucky A, et al. A Jungle in There: Bacteria in Belly Buttons are Highly Diverse, But Predictable. *PloS One* (2012) 7:e47712. doi: 10.1371/journal.pone.0047712
- Caporaso JG, Lauber CL, Costello EK, Berg-Lyons D, Gonzalez A, Stombaugh J, et al. Moving Pictures of the Human Biome. *Genome Biol* (2011) 12:R50. doi: 10.1186/gb-2011-12-5-r50
- Lee HS. Diversity of Halophilic Archaea in Fermented Foods and Human Intestines and Their Application. J Microbiol Biotechnol (2013) 23:1645–53. doi: 10.4014/jmb.1308.08015
- Achkar MA, Geller DE, Slaney AP, Layish DT. Halotherapy in Patients With Cystic Fibrosis: A Pilot Study. Intl J Respir Pulm Med (2015) 2:1. doi: 10.23937/2378-3516/1410009
- Gelardi M, Iannuzzi L, Greco Miani A, Cazzaniga S, Naldi L, De Luca C, et al. Double-Blind Placebo-Controlled Randomized Clinical 'Irial on the Efficacy of Aerosal in the Treatment of Sub-Obstructive Adenotonsillar Hypertrophy and Related Diseases. Int J Pediatr Otorhinolaryngol (2013) 77:1818–24. doi: 10.1016/j.ijporl.2013.08.013
- Kim JY, Whon YW, Lim MY, Kim YB, Kim N, Kwon MS, et al. The Human Gut Archaeome: Identification of Diverse Haloarchaea in Korean Subjects. *Microbiome* (2020) 8:114. doi: 10.1186/s40168-020-00894-x
- Coker OO, Wu WKK, Wong SH, Sung JJY, Yu J. Altered Gut Archaea Composition and Interaction With Bacteria are Associated With Colorectal Cancer. *Gastroenterology* (2020) 159:1459–70. doi: 10.1053/j.gastro. 2020.06.042
- Yamabe K, Maeda H, Kokeguchi S, Tanimoto I, Sonoi N, Asakawa S, et al. Distribution of Archaea in Japanese Patients With Periodontitis and Humoral Immune Response to the Components. *FEMS Microbiol Lett* (2008) 287:69– 75. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01304.x
- Adamiak N, Krawczyk KT, Locht C, Kowalewicz-Kulbat M. Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development. Front Immunol (2021) 12:746235. doi: 10.3389/fimmu.2021.746235
- Vierbuchen T, Bang C, Rosigkeit H, Schmitz RA, Heine H. The Human-Associated Archaeon Methanosphaera Stadtmanae is Recognized Through its RNA and Induces TLR8-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation. Front Immunol (2017) 8:1535. doi: 10.3389/fimmu.2017.01535

May 2022 | Volume 13 | Article 833635

- Borrel G, Brugère JF, Gribaldo S, Schmitz RA, Moissl-Eichinger C. The Host-Associated Archaeome. Nat Rev Microbiol (2020) 18:622–36. doi: 10.1038/ s41579-020-0407-y
- 34. Aminov RI. Role of Archaea in Human Disease. Front Cell Infect Microbiol (2013) 3:42. doi: 10.3389/fcimb.2013.00042
- Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human Gut Microbiome Viewed Across Age and Geography. Nature (2013) 486:222–7. doi: 10.1038/nature11053
- Chaudhary PP, Conway PL, Schlundt J. Methanogens in Humans: Potentially Beneficial or Harmful for Health. *Appl Microbiol Biotechnol* (2018) 102:3095– 104. doi: 10.1007/s00253-018-8871-2
- Haghi F, Goli E, Mirzaei B, Zeighami H. The Association Between Fecal Enterotoxigenic B. Fragilis Colorectal Cancer BMC Cancer (2019) 19:879. doi: 10.1186/s12885-019-6115-1
- Aponte M, Blaiotta G, Francesca N, Moschetti G. Could Halophilic Archaea Improve the Traditional Salted Anchovies (*Engraulis Encrasicholus L.*) Safety and Quality? *Lett Appl Microbiol* (2010) 51:697–703. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02956.x
- Albuquerque L, Taborda M, La Cono V, Yakimov M, da Costa MS. Natrinema Salaciae Sp. Nov., a Halophilic Archaeon Isolated From the Deep, Hypersaline Anoxic Lake Medee in the Eastern Mediterranean Sea. Syst Appl Microbiol (2012) 35:368–73. doi: 10.1016/j.syapm.2012.06.005
- Mohammadi A, Mehrzad J, Mahmoudi M, Schneider M, Haghparast A. Effect of Culture and Maturation on Human Monocyte-Derived Dendritic Cell

Surface Markers, Necrosis and Antigen Binding, Biotech&Histochem (2015) 90:445-52. doi: 10.3109/10520295.2015.1017536

 Pochard P, Hammad H, Ratajczak C, Charbonnier-Hatzfeld AS, Just N, Tonnel AB, et al. Direct Regulatory Immune Activity of Lactic Acid Bacteria on Der P 1-Pulsed Dendritic Cells From Allergic Patients. J Allergy Clin Immunol (2006) 116:198–204. doi: 10.1016/j.jaci.2005.02.037

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Krawczyk, Locht and Kowalewicz-Kulbat. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Frontiers in Immunology | www.frontiersin.org

May 2022 | Volume 13 | Article 833635

9



Supplementary Figure 1. CD86, CD80, CD83 and CD40 expression on human DCs stimulated with halophilic archaea at various MOI. Human DCs from blood donors were stimulated for 24h either with Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 or N. salaciae (MOI 0.1:1, 1:1, 1:10) or were left unstimulated (DC). Fluorescence intensity is expressed as MFI (once for each donor) of CD86, CD80, CD83 and CD40 surface expression on DC from which the MFI obtained with an isotype-matched antibody was subtracted (A), and the percentages of positive cells with CD86, CD80, CD83 and CD40 expression on the DC surface was calculated (B). Data shown represent the means ± SD of 3 healthy dependent donors.



Supplementary Figure 2. IL-10, TNF- α , IL-12p40 production by DCs stimulated with halophilic archaea at various MOI. Human DCs were stimulated either with Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 or N. salaciae (MOI 0.1:1, 1:1, 1:10) or were left unstimulated (DC) for 24h. The levels of IL-10, TNF- α , IL-12p40 secretion by stimulated DCs were measured in duplicates by ELISA. Data shown represent the means \pm SD of 3 donors.



Supplementary Figure 3. Surface marker CD86, CD80, CD83 and CD40 expression on human DCs stimulated with halophilic archaea. Human DCs from a healthy blood donor were stimulated for 24h either with Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66, N. salaciae or were left unstimulated (DC). Histograms represent the surface expression of CD86, CD80, CD83 and CD40 on DCs for one representative donor.



Supplementary Figure 4. Surface marker HLA-DR, DC-SIGN, TLR2 and TLR4 expression on human DCs stimulated with halophilic archaea. Human DCs from blood donors were stimulated for 24h either with Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 or N. salaciae or were left unstimulated (DC). Fluorescence intensity is expessed as MFI (once for each donor) of HLA-DR, DC-SIGN, TLR2 and TLR4 surface expression on DC from which the MFI obtained with an isotype-matched antibody was subtracted (A), and the percentages of positive cells with HLA-DR, DC-SIGN, TLR2 and TLR4 expression on the DC surface was calculated (B). Data shown represent the means ± SD of 7 healthy independent donors.



Supplementary Figure 5. IL-23 and IL-12p70 secretion by DCs stimulated with halophilic archaea. Human DCs were stimulated either with Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 or N. salaciae or were left unstimulated (DC) for 24h. The levels of IL-23, IL-12p70 secretion by stimulated DCs were measured in duplicates by ELISA. Data shown represent the means \pm SD of 7 donors.



Supplementary Figure 6. IL-17A secretion by CD4⁺ T cells co-cultured with halophile-stimulated DCs. Secretion of IL-17A by human CD4⁺ T cells following 96 h co-culture with Hrd. rudnickae 64-, Hrd. rudnickae 66- or N. salaciae-pulsed autologous DCs (ratio DCs:T cells, 1:10) was measured in duplicates by ELISA. Data shown represent the means ± SD of 7 donors.



Supplementary Figure 7. Gating strategy for human DCs based on FSC/SSC criteria. Unstimulated DCs from blood donors were gated based on the forward (FSC) and side (SSC) scatter measurements (A). Exemplary dot-plots showing human DCs stimulated for 24h with Hrd. rudnickae 64 and stained for CD86-FITC (B) or CD80-PE (C) are shown for one representative donor.

IV.4. Ocena właściwości protekcyjnych archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* wobec komórek dendrytycznych, przeciwko genotoksycznemu działaniu enterotoksyny B *S. aureus* (SEB) jako superantygenu. [Wyniki oryginalne, nieopublikowane]

IV.4.1. Ocena stopnia kondensacji oraz fragmentacji chromatyny w jądrze KD w wyniku stymulacji SEB

Enterotoksyna B S. aureus jest silnym superantygenem, powodującym m.in. niespecyficzną aktywację limfocytów T oraz uszkodzenia komórek dendrytycznych. W rozdziale IV.1. wykazano, iż w KD stymulowanych SEB dochodziło do uszkodzenia DNA manifestującego się: istotnym zwiększeniem stopnia fragmentacji chromatyny, obecnością SSBs i DSBs, akumulacją komórek w fazach subG1 i S cyklu komórkowego oraz istotnie wyższym odsetkiem komórek w stanie apoptozy. W związku z powyższym, w kolejnym etapie pracy postanowiono sprawdzić, czy obecność archeonów halofilnych w hodowli KD może zapobiegać uszkodzeniu DNA tych komórek przez SEB. W tym celu, KD stymulowano archeonami halofilnymi (Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae) w środowisku SEB jak opisano w podrozdziałach III.2.9. oraz III.2.10. Stopień kondensacji odsetek fragmentacji chromatyny KD oceniono według oraz opisu w podrozdziałach III.2.14. oraz IV.1.2. Kontrolę negatywną stanowiły KD niestymulowane, natomiast pozytywną KD stymulowane superantygenem SEB. Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający stopień kondensacji oraz procent fragmentacji chromatyny KD w środowisku SEB przedstawiono na Rycinie 22 [Ryc. 22.]. Po 24 godz. stymulacji nie zaobserwowano istotnych różnic w stopniu kondensacji chromatyny wewnątrz KD w porównaniu do komórek niestymulowanych [Ryc. 23A]. Wykazano natomiast istotnie wyższy procent fragmentacji chromatyny KD stymulowanych SEB w porównaniu do komórek niestymulowanych (p = 0.0286). W komórkach stymulowanych archeonami halofilnymi w obecności SEB stopień fragmentacji chromatyny był istotnie niższy w porównaniu do komórek stymulowanych SEB (p = 0.0286 [Ryc. 23B].

KD stymulowane



Ryc. 22. Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający komórki dendrytyczne (KD) niestymulowane, stymulowane SEB lub stymulowane Hrd. rudnickae 64 (Hrd64), Hrd. rudnickae 66 (Hrd66) lub N. salaciae w obecności superantygenu SEB wybarwione przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko β-tubulinie (A) oraz komórki barwione DAPI (B). Panel "merge" (C) – połączone obrazy ze wszystkich znaczników. KD – komórki niestymulowane, kontrola negatywna; SEB – kontrola pozytywna. Skala wielkości = 10 μm.



Ryc. 23. Stopień kondensacji (A) oraz procent fragmentacji chromatyny (B) komórek dendrytycznych (KD) niestymulowanych, stymulowanych SEB lub stymulowanych Hrd. rudnickae 64 (Hrd64), Hrd. rudnickae 66 (Hrd66) lub N. salaciae (Nsal) w obecności superantygenu SEB. Dane przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe. * p < 0,05; Liczba niezależnych eksperymentów n = 4, KD – komórki niestymulowane.

IV.4.2. Ocena protekcyjnego działania archeonów halofilnych przed jednoniciowymi pęknięciami DNA w KD wywołanymi przez SEB

KD stymulowano 24 godz. archeonami halofilnymi (*Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae*) w środowisku SEB, według opisu w podrozdziałach III.2.9. i III.2.10., a następnie znakowano PARP-2 (III.2.15. i IV.1.3.). KD niestymulowane stanowiły kontrolę negatywną, natomiast KD stymulowane superantygenem SEB stanowiły kontrolę pozytywną. Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający KD z jednoniciowymi pęknięciami DNA w środowisku SEB przedstawiono na Rycinie 24 [Ryc. 24.].



Ryc. 24. Reprezentatywny obraz mikroskopowy przedstawiający jednoniciowe uszkodzenia DNA w KD. KD – komórki dendrytyczne niestymulowane (kontrola negatywna); Hrd. rudnickae 66/SEB, Hrd. rudnickae 64/SEB, N. salaciae/SEB – KD stymulowane wybranymi szczepami archeonów halofilnych w środowisku superantygenu SEB; SEB – KD stymulowane superantygenem SEB (kontrola pozytywna).

A – merged, połączone obrazy ze wszystkich znaczników. (B) SSBs– jednoniciowe uszkodzenia DNA; PARP-2 – enzym wykrywający jednoniciowe uszkodzenia DNA (jasnozielone punkty w panelu SSBs, białą strzałką zaznaczono jednoniciowe uszkodzenia DNA); (C) DAPI– barwnik DNA (niebieski); (D) Actin, aktyna wybarwiona Rhodamine 123 (czerwony); E - połączone obrazy ze wszystkich znaczników (obraz powiększony). Miara wielkości = 10 μm.

W wyniku stymulacji, nastąpił istotny wzrost odsetka komórek dendrytycznych wykazujących jednoniciowe pęknięcia DNA (p = 0,0286) [Ryc. 25A] oraz istotny wzrost średniej intensywności fluorescencji markera PARP-2 wewnątrz KD (p < 0,0001) [Ryc. 25B] w wyniku stymulacji KD SEB, w porównaniu do komórek niestymulowanych. Zaobserwowano istotny spadek odsetka komórek dendrytycznych wykazujących jednoniciowe pęknięcia DNA (p = 0,0286) [Ryc. 25A] oraz istotne obniżenie średniej intensywności fluorescencji PARP-2 wewnątrz KD [Ryc. 25B], w wyniku stymulacji KD archeonami halofilnymi w środowisku SEB, w porównaniu do komórek stymulowanych jedynie SEB (p < 0,001).



Ryc. 25. Jednoniciowe pęknięcia DNA w komórkach dendrytycznych (KD) niestymulowanych, stymulowanych SEB lub stymulowanych archeonami halofilnymi w środowisku SEB. A) Indeks fluorescencyjnego znakowania (odsetek komórek wykazujących jednoniciowe pęknięcia DNA), n=4; B) Średnia intensywność fluorescencji w pojedynczej KD, minimum 20 zliczeń, eksperyment wykonano 4-krotnie. Dane przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe. * $p \le 0,05$; *** $p \le$ 0,001; **** $p \le 0,0001$; Hrd. rudnickae 64 (Hrd64), Hrd. rudnickae 66 (Hrd66) lub N. salaciae (Nsal) – KD stymulowane wybranymi gatunkami archeonów halofilnych w obecności superantygenu SEB.

IV.4.3. Ocena protekcyjnego działania archeonów halofilnych przed dwuniciowymi pęknięciami DNA w KD wywołanymi przez SEB

KD stymulowano 24 godz. archeonami halofilnymi (*Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae*) w środowisku superantygenu SEB (III.2.9. i III.2.10.), a następnie wykrywano histon fosfo-H2AX (H2AXS139ph) jak opisano w podrozdziałach III.2.15. i IV.1.4. KD niestymulowane stanowiły kontrolę negatywną, natomiast KD stymulowane superantygenem SEB stanowiły kontrolę pozytywną. Reprezentatywny obraz mikroskopowy

przedstawiający KD w środowisku SEB z dwuniciowymi pęknięciami DNA przedstawiono na Rycinie 26 [Ryc. 26.].





A – merged, połączone obrazy ze wszystkich znaczników. (B) DSBs– dwuniciowe uszkodzenia DNA; H2AXS139ph – enzym wykrywający dwuniciowe uszkodzenia DNA (jasnoczerwone punkty w panelu DSBs, białą strzałką zaznaczono dwuniciowe uszkodzenia DNA); (C) DAPI– barwnik DNA (niebieski); (D) B-tubulin, 6-tubulina wybarwiona AlexaFluour488 – przeciwciała monoklonalne skoniugowane z AlexaFluor 488 (zielony); E - połączone obrazy ze wszystkich znaczników (obraz powiększony). Miara wielkości = 10 μm.

W wyniku stymulacji KD superantygenem SEB zaobserwowano istotny wzrost odsetka komórek dendrytycznych wykazujących dwuniciowe pęknięcia DNA (p = 0,0286) [Ryc. 27A] oraz istotny wzrost średniej intensywności fluorescencji fosfo-H2AX wewnątrz KD (p<0,0001) [Ryc. 27B] w wyniku stymulacji KD superantygenem SEB, w porównaniu do komórek niestymulowanych. Zaobserwowano istotny spadek odsetka komórek dendrytycznych wykazujących dwuniciowe pęknięcia DNA (p = 0,0286) [Ryc. 27A] oraz istotne obniżenie średniej intensywności fluorescencji fosfo-H2AX wewnątrz KD [Ryc. 27B] w wyniku stymulacji KD archeonami halofilnymi w środowisku SEB, w porównaniu do komórek stymulowanych jedynie SEB (p<0,0001).



Ryc. 27. Dwuniciowe pęknięcia DNA w komórkach dendrytycznych (KD) niestymulowanych, stymulowanych superantygenem SEB lub archeonami halofilnymi w środowisku superantygenu SEB. A) Indeks fluorescencyjnego znakowania (odsetek komórek wykazujących dwuniciowe pęknięcia DNA), n=4; B) Średnia intensywność fluorescencji w pojedynczej KD, minimum 20 zliczeń, eksperyment wykonano 4-krotnie. Dane przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe. * $p \le 0,05$; **** $p \le 0,0001$; Hrd. rudnickae 64 (Hrd64), Hrd. rudnickae 66 (Hrd66) lub N. salaciae (Nsal) – KD stymulowane wybranymi gatunkami archeonów halofilnych w obecności superantygenu SEB; KD – komórki niestymulowane.

IV.4.4. Analiza cyklu komórkowego KD stymulowanych archeonami halofilnymi w środowisku SEB

Oceniono zmiany w cyklu komórkowym KD stymulowanych archeonami halofilnymi - *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* w środowisku superantygenu SEB. KD stymulowano 24 godz. według opisu w podrozdziałach III.2.9. oraz III.2.10., a następnie przenalizowano cykl komórkowy (III.2.19. i IV.1.5.). KD niestymulowane stanowiły kontrolę negatywną, natomiast KD stymulowane superantygenem SEB stanowiły kontrolę pozytywną.

Po 24 godz. stymulacji zaobserwowano istotny wzrost odsetka KD stymulowanych SEB w fazie subG1 [Ryc. 28A] oraz w fazie S [Ryc. 28C] w porównaniu do komórek niestymulowanych (p<0,05). Nie wykazano istotnych różnic w procencie komórek dendrytycznych w fazach G1 oraz G2 cyklu komórkowego w wyniku stymulacji SEB w porównaniu do komórek niestymulowanych [Ryc. 28B, Ryc. 28D].

Odsetek KD stymulowanych halofilami w środowisku SEB w fazie subG1 (p = 0,0286) [Ryc. 28A] oraz w fazie S (p = 0,0286) [Ryc. 28C] był istotnie niższy w porównaniu do komórek stymulowanych jedynie SEB. Nie zaobserwowano istotnych różnic w procencie



KD w fazach G1 oraz G2 cyklu komórkowego w wyniku stymulacji archeonami halofilnymi w obecności SEB w porównaniu do komórek niestvmulowanych [Ryc. 28B, Ryc. 28D].

Ryc. 28. Odsetek komórek dendrytycznych (KD) niestymulowanych, stymulowanych superantygenem SEB lub stymulowanych archeonami halofilnymi w środowisku SEB w poszczególnych fazach cyklu komórkowego – faza subG1 (A), G1 (B), S (C) oraz G2 (D). Dane przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe. * $p \le 0,05$. Liczba niezależnych eksperymentów n = 7, Hrd. rudnickae 64 (Hrd64), Hrd. rudnickae 66 (Hrd66) lub N. salaciae (Nsal) – KD stymulowane wybranymi gatunkami archeonów halofilnych w obecności superantygenu SEB, KD – komórki niestymulowane.

IV.4.5. Ocena apoptozy lub nekrozy KD stymulowanych archeonami halofilnymi w środowisku superantygenu SEB

Celem tej części pracy było sprawdzenie, czy archeony halofilne chronią KD przed działaniem cytotoksycznym SEB przejawiającym się kierowaniem komórek na drogę apoptozy lub nekrozy. Zbadano wpływ stymulacji KD archeonami halofilnymi *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* w środowisku SEB na proces apoptozy bądź nekrozy KD. Komórki stymulowano 24 godz. według opisu

w podrozdziałach III.2.9. oraz III.2.10., a następnie oceniono apoptozę lub nekrozę (III.2.20 i IV.1.6.).

KD niestymulowane stanowiły kontrolę negatywną, natomiast KD stymulowane superantygenem SEB stanowiły kontrolę pozytywną. Zaobserwowano istotny wzrost odsetka KD w stanie apoptozy po stymulacji SEB w porównaniu do komórek niestymulowanych (p<0,01) [Ryc. 29B]. Ponadto, wykazano istotny spadek odsetka KD stymulowanych halofilami w środowisku SEB w stanie apoptozy w porównaniu do KD stymulowanych jedynie SEB (p<0,05) [Ryc. 29B]. Nie wykazano istotnych różnic w odsetku żywych KD [Ryc. 29A] oraz w odsetku KD w stanie nekrozy [Ryc. 29C].



Ryc. 29. Odsetek komórek dendrytycznych (KD) niestymulowanych, stymulowanych superantygenem SEB lub archeonami halofilnymi w obecności SEB - (A) żywych; (B) w stanie apoptozy; (C) w stanie nekrozy. Dane przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe. * $p \le 0,05$; ** $p \le 0,01$. Liczba niezależnych eksperymentów n = 6. Hrd. rudnickae 64 (Hrd64), Hrd. rudnickae 66 (Hrd66) lub N. salaciae (Nsal) – KD stymulowane wybranymi gatunkami archeonów halofilnych w obecności superantygenu SEB, KD – komórki niestymulowane.

IV.5. Ocena wpływu archeonów halofilnych, *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae*, na zdolność tworzenia synapsy immunologicznej oraz aktywacji limfocytów T CD4+ przez komórki dendrytyczne w środowisku SEB. [Wyniki oryginalne, nieopublikowane]

IV.5.1. Ekspresja receptorów na powierzchni KD stymulowanych archeonami halofilnymi w obecności SEB

Oceniono ekspresję receptorów powierzchniowych (CD86, CD80, CD83, CD40, HLA-DR, TLR2, TRL4 i DC-SIGN) na powierzchni KD stymulowanych Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae (MOI 1) w środowisku z lub bez SEB (III.2.9 i III.2.10.), z wykorzystaniem cytometrii przepływowej jak opisano w podrozdziałach III.2.16., III.2.17. oraz IV.2.2. Kontrolę pozytywną stanowiły KD stymulowane SEB, natomiast KD niestymulowane stanowiły kontrolę negatywną. Na podstawie MFI wykazano istotne nasilenie ekspresji receptorów CD86, CD80 oraz CD83 na powierzchni KD stymulowanych Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae w obecności SEB w porównaniu do komórek niestymulowanych [Ryc. 30A]. Wykazano również istotnie wyższy odsetek KD wykazujących ekspresję receptorów CD86, CD80 oraz CD83 stymulowanych Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66 lub N. salaciae w środowisku SEB w porównaniu do komórek niestymulowanych [Ryc 30B]. Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptorów CD40, HLA-DR, TLR2, TLR4 i DC-SIGN na KD niestymulowanych wobec komórek stymulowanych [Ryc. 30.]. Ponadto, nie wykazano różnic statystycznie znamiennych pomiędzy ekspresją wszystkich badanych receptorów na KD stymulowanych jedynie SEB w porównaniu do KD stymulowanych jednocześnie halofilami i SEB [Ryc. 30.].





Ryc. 30. Ekspresja receptorów CD86, CD80, CD83, CD40 oraz HLA-DR, TLR2, TLR4 i DC-SIGN na powierzchni komórek dendrytycznych (KD) niestymulowanych, stymulowanych SEB lub archeonami halofilnymi w środowisku SEB. A) MFI (ang. Mean Fluorescent Intensity, średnia intensywność fluorescencji) receptorów CD86, CD80, CD83, CD40 oraz HLA-DR, TLR2, TLR4 i DC-SIGN na powierzchni KD. B) Odsetek KD wykazujących ekspresję receptora CD86, CD80, CD83, CD40 oraz HLA-DR, TLR2, TRL4 i DC-SIGN. Dane przedstawione jako średnia \pm odchylenie standardowe. * $p \le 0,05$; ** $p \le 0,01$; *** $p \le$ 0,001. Liczba niezależnych eksperymentów n = 7, Hrd. rudnickae 64 (Hrd64), Hrd. rudnickae 66 (Hrd66) lub N. salaciae (Nsal) – KD stymulowane wybranymi gatunkami archeonów halofilnych w obecności superantygenu SEB, KD – komórki niestymulowane.

IV.5.2. Produkcja cytokin przez KD stymulowane archeonami halofilnymi w środowisku SEB

KD stymulowano według metody opisanej w podrozdziale III.2.9. Oceniono ilościowo cytokiny IL-12p40, IFN- γ , IL-10 oraz TNF- α wytwarzane przez KD stymulowane *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* (MOI 1) w środowisku superantygenu SEB z wykorzystaniem testów ELISA (III.2.18. oraz IV.2.4.). Kontrolę pozytywną stanowiły KD stymulowane SEB, natomiast KD niestymulowane stanowiły kontrolę negatywną. Wykazano istotnie wyższą produkcję IL-12p40, IFN- γ , IL-10 oraz TNF- α przez KD stymulowane *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* w obecności SEB, w porównaniu do komórek niestymulowanych (p<0,05) [Ryc. 31.]. Nie wykazano istotnych różnic, pomiędzy nasileniem wytwarzania cytokin przez KD stymulowane jedynie SEB w porównaniu do KD stymulowanych halofilami i SEB [Ryc. 31.].



Ryc. 31. Produkcja IL-12p40, IFN- γ , IL-10 oraz TNF- α przez komórki dendrytyczne (KD) niestymulowane, stymulowane SEB lub archeonami halofilnymi w środowisku SEB. Dane przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe. * $p \le 0,05$; ** $p \le 0,01$; Liczba niezależnych eksperymentów n = 7, Hrd. rudnickae 64 (Hrd64), Hrd. rudnickae 66 (Hrd66) lub N. salaciae (Nsal) – KD stymulowane wybranymi gatunkami archeonów halofilnych w obecności superantygenu SEB, KD – komórki niestymulowane.

IV.5.3. Produkcja cytokin w ko-hodowli KD stymulowanych archeonami halofilnymi w środowisku superantygenu SEB z autologicznymi limfocytami T CD4⁺

KD, jak poprzednio, hodowano z autologicznymi limfocytami T CD4⁺ (III.2.9., III.2.11. oraz III.2.12.). Oceniono intensywność produkcji cytokin IL-12p40, IFN-γ, TNF-α, IL-10 oraz IL-13 w ko-hodowli KD stymulowanych *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. sala*ciae (MOI 1) w środowisku SEB z autologicznymi limfocytami T CD4⁺ z wykorzystaniem testów ELISA (III.2.18. oraz IV.3.1.). Kontrolę pozytywną stanowiły KD stymulowane SEB, natomiast KD niestymulowane stanowiły kontrolę negatywną. Wykazano istotnie nasiloną produkcję IL-12p40, IFN-γ, TNF-α, IL-10 oraz IL-13 w kohodowlach autologicznych limfocytów T CD4⁺ z KD stymulowanymi *Hrd. rudnickae 64, Hrd. rudnickae 66* lub *N. salaciae* w obecności SEB, w porównaniu do komórek niestymulowanych (p < 0,01) [Ryc. 32.]. Nie zaobserwowano istotnych różnic w wytwarzaniu cytokin między komórkami stymulowanymi jedynie SEB w porównaniu do komórek stymulowanych jednocześnie halofilami i SEB [Ryc. 32.].



Ryc. 32. Intensywność produkcji IL-12p40, IFN- γ , IL-10, TNF- α oraz IL-13 w ko-hodowli komórek dendrytycznych (KD) niestymulowanych, stymulowanych superantygenem SEB lub archeonami halofilnymi w środowisku SEB z autologicznymi limfocytami T CD4⁺. Dane przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe. ** $p \le 0,01$; *** $p \le 0,001$; Liczba niezależnych eksperymentów n = 7, Hrd. rudnickae 64 (Hrd64), Hrd. rudnickae 66 (Hrd66) lub N. salaciae (Nsal) – KD stymulowane wybranymi gatunkami archeonów halofilnych w obecności superantygenu SEB, KD – komórki niestymulowane.

V. Podsumowanie wyników uzyskanych w ramach realizacji celów szczegółowych pracy doktorskiej

1. Charakterystyka oddziaływania archeonów halofilnych Hrd. rudnickae lub N. salaciae z ludzkimi komórkami dendrytycznymi.

Wykazano:

- zdolność archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae* oraz *N. salaciae* do wnikania do wnętrza cytoplazmy oraz jądra komórkowego KD pochodzenia monocytarnego
- brak istotnych zmian w stopniu kondensacji oraz fragmentacji chromatyny KD w wyniku stymulacji archeonami halofilnymi
- brak indukcji jedno- oraz dwuniciowych pęknięć DNA w KD stymulowanych *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae*
- brak negatywnego wpływu szczepów *Hrd. rudnickae* oraz *N. salaciae* na przebieg cyklu komórkowego KD
- brak indukcji apoptozy lub nekrozy KD w wyniku stymulacji archeonami halofilnymi *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae*

2. Ocena ekspresji receptorów powierzchniowych na komórkach dendrytycznych stymulowanych archeonami halofilnymi Hrd. rudnickae lub N. salaciae oraz wytwarzania wybranych cytokin

Wykazano:

- istotne nasilenie ekspresji receptorów CD86 i CD80 na powierzchni KD oraz istotny wzrost odsetka komórek wykazujących ekspresję receptorów CD86, CD80, CD83 w wyniku stymulacji KD *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae*
- istotne nasilenie wytwarzania TNF-α, IL-12p40 oraz IL-10 przez KD stymulowane archeonami halofilnymi
- brak istotnych różnic w efektach stymulacji KD żywymi archeonami halofilnymi, lub lizatem tych drobnoustrojów

3. Ocena odpowiedzi cytokinowej limfocytów T CD4⁺ w ko-hodowlach z komórkami dendrytycznymi stymulowanymi archeonami halofilnymi Hrd. rudnickae lub N. salaciae

Wykazano:

- istotnie nasiloną produkcję IFN-γ oraz IL-13 w ko-hodowlach KD stymulowanych archeonami halofilnymi *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* z autologicznymi limfocytami T CD4⁺
- istotnie nasiloną produkcję IFN-γ w ko-hodowlach KD stymulowanych *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* z autologicznymi dziewiczymi limfocytami T CD4⁺, ale nie limfocytami T CD4⁺ pamięci

4. Ocena właściwości protekcyjnych archeonów halofilnych Hrd. rudnickae lub *N. salaciae wobec komórek dendrytycznych, przeciwko genotoksycznemu działaniu enterotoksyny B S. aureus (SEB) jako superantygenu.*

Wykazano:

- istotny spadek fragmentacji chromatyny w komórkach dendrytycznych stymulowanych *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* w środowisku SEB, w porównaniu do komórek dendrytycznych traktowanych tylko SEB
- istotne zmniejszenie liczby jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA w KD stymulowanych *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* w środowisku SEB, w porównaniu do KD traktowanych jedynie SEB
- istotny spadek odsetka komórek wykazujących blok w fazie subG1 oraz S cyklu komórkowego w hodowli KD stymulowanych archeonami halofilnymi (*Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae*) w środowisku SEB, w porównaniu do hodowli tylko z SEB
- istotny spadek odsetka komórek apoptotycznych w hodowlach KD stymulowanych archeonami halofilnymi *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae*, w obecności SEB, w porównaniu do hodowli z samym SEB

5. Ocena wpływu archeonów halofilnych, Hrd. rudnickae lub N. salaciae, na zdolność tworzenia synapsy immunologicznej oraz aktywacji limfocytów T przez KD w środowisku SEB

Wykazano:

- istotnie nasiloną ekspresję receptorów CD86, CD80 oraz CD83 na powierzchni KD stymulowanych SEB, w porównaniu do KD niestymulowanych, oraz brak zmian w ekspresji receptorów po wprowadzeniu do hodowli archeonów halofilnych
- brak istotnego wpływu archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* na produkcję IL-12p40, IL-10, TNF-α oraz IFN-γ przez KD stymulowane SEB
- brak istotnego wpływu archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* na wytwarzanie IL-10, IL-12p40, IL-13, TNF-α oraz IFN-γ przez autologiczne limfocyty T CD4⁺ w ko-hodowli z KD stymulowanymi SEB.

Wnioski końcowe:

- Szczepy archeonów halofilnych *Hrd. rudnickae* i *N. salaciae* istotnie nasiliły aktywność komórek dendrytycznych w zakresie tworzenia synapsy z limfocytami T, regulowania ich rozwoju poprzez wydzielane cytokiny oraz utrzymywania zrównoważonej odpowiedzi cytokinowej efektorowych limfocytów T CD4⁺ na antygeny archeonów halofilnych i powstawania limfocytów pamięci.
- 2. Archeony halofilne hamowały działanie genotoksyczne superantygenu SEB S. aureus. Działanie ochronne archeonów halofilnych wyrażało się zachowaniem struktury chromatyny oraz ochroną DNA KD przed uszkodzeniem. Archeony halofilne nie hamowały stymulowanego przez SEB wydzielania cytokin przez KD i limfocyty T oraz nie osłabiały sygnałów aktywacji w synapsie immunologicznej.
- 3. Zaobserwowane w modelu *in vitro* właściwości archeonów halofilnych, jako bezpiecznych stymulatorów komórek dendrytycznych zdolnych do pobudzania limfocytów T do zrównoważonej odpowiedzi odpornościowej, pozwalają sugerować przydatność tych drobnoustrojów w opracowywaniu modeli eksperymentalnych zmierzających do wyjaśnienia mechanizmu komórkowego leżącego u podstaw korzystnego oddziaływania haloterapii jako leczenia wspomagającego choroby układu oddechowego.

VI. Dyskusja

Od wielu lat sól wykorzystywana jest w medycynie w formie haloterapii, której podstawą jest inhalacja aerozolu solnego w kontrolowanych warunkach) [84], czy speleoterapii (forma leczenia obejmująca przebywanie w naturalnych jaskiniach i grotach solnych) [85], jako terapii pomocniczych w leczeniu schorzeń układu oddechowego, np. astmy, czy mukowiscydozy [86, 87]. Korzystny efekt soli na zdrowie człowieka po raz pierwszy opisał w 1843 roku polski lekarz Feliks Boczkowski, który zauważył iż wśród górników pracujących w Kopalni Soli w Wieliczce nie ma przypadków astmy [88]. To, czy obserwowane korzystne efekty powyższych terapii są wynikiem jedynie oddziaływania aerozolu solnego, czy też udział w tym mogą mieć archeony halofilne – drobnoustroje zdolne do życia w ekstremalnym środowisku zawierającym wysokie stężenie chlorku sodu [89], pozostaje wciąż niewyjaśnione.

Archeony halofilne przez wiele lat były tematem zainteresowań głównie mikrobiologii środowiskowej oraz biotechnologii przemysłowej, dzięki między innymi zdolności do wytwarzania wielu rodzajów enzymów (lipazy, esterazy czy proteazy) opornych na specyficzne warunki środowiskowe [42, 90]. Z kolei w medycynie wykorzystywane są karotenoidy (pełniące funkcję antyoksydantów) [30], jak również pęcherzyki gazowe i archeosomy, które znalazły zastosowanie jako nośniki antygenów szczepionkowych [44]. Wykazano również, że metabolity niektórych gatunków archeonów halofilnych indukowały apoptozę komórek nowotworowych [91, 92]. Stawiana jest też hipoteza, iż archeony moga stwarzać warunki do rozwoju drobnoustrojów chorobotwórczych, powodujących m.in.: ropnie mieśniowe [93], zapalenie pochwy [94], paradontoze [95], czy zapalenie płuc [7], choć dotychczas nie wykazano, aby same archeony były chorobotwórcze dla człowieka [7]. Biorac pod uwagę coraz szersze zastosowanie archeonów halofilnych w medycynie, ich obecność w otoczeniu człowieka, np. w soli drogowej [96], soli kuchennej [97, 98], czy słonym, fermentowanym jedzeniu [31], a także fakt, iż są komponentem mikrobiomu jelita, (m.in. Haloferax massiliensis [26, 99], czy przedstawiciele rodziny Halobacteriaceae, [28]) stawiane są pytania, czy drobnoustroje te wchodzą w interakcje z komórkami układu odpornościowego człowieka i jakie są tego efekty.

W rozwoju procesów odpornościowych kluczową rolę odgrywają komórki dendrytyczne (KD), jako profesjonalne komórki prezentujące antygeny limfocytom i regulujące

efektorowe właściwości tych komórek. Rodzaj inicjowanej odpowiedzi odpornościowej ustala się podczas prezentacji antygenu przez KD i zależy od fenotypu tej komórki w synapsie immunologicznej oraz produkowanych cytokin, które determinują proliferację i różnicowanie się limfocytów. Prezentowana praca stanowi pierwsze doniesienie naukowe opisujące wpływ archeonów halofilnych na komórki układu odpornościowego człowieka. W pracy oceniono bezpieczeństwo archeonów halofilnych jako stymulatorów KD, oraz ich zdolność do aktywacji komórek odpornościowych, a także właściwości ochronne halofili w środowisku superantygenu – enterotoksyny B *Staphylococcus aureus* (SEB).

W pracy wykorzystano dwa gatunki archeonów halofilnych – *Halorhabdus rudnickae* (szczepy WSM-64T oraz WSM-66T) [39], oraz *Natrinema salaciae* MDB25T [40], pochodzące z odległych pod względem geograficznym środowisk. Oba gatunki reprezentują klasę *Halobacteria*, lecz należą do osobnych rzędów, odpowiednio: *Halobacteriales* lub *Natrialbales. Hrd. rudnickae* wyizolowano z obecnie nieeksploatowanego złoża "Barycz", należącego do Kopalni Soli w Wieliczce [39], natomiast *N. salaciae* z solanki Jeziora Medee, położonego na głębokości 3050 m. w basenie Morza Śródziemnego [40]. Zastosowanie dwóch odmiennych genetycznie gatunków archeonów halofilnych, pochodzących z odległych od siebie środowisk, pozwoliło sprawdzić, czy profil wzbudzanej halofilami odpowiedzi odpornościowej będzie podobny dla obu gatunków, czy też różny.

W pierwszej części pracy oceniono *in vitro* właściwości archeonów halofilnych, *Hrd. rudnickae* oraz *N. salaciae*, w kontekście ich "cyto-bezpieczeństwa", jako stymulatorów KD. Wykazano, iż oba szczepy wnikały do wnętrza KD, zarówno do cytoplazmy, jak i jądra komórkowego, jakkolwiek poznanie mechanizmu wnikania archeonów halofilnych do KD wymaga dalszych badań. W badaniach nad archeonami metanogennymi, *Methanosphaera stadtmanae* (DSM 3091) i *Methanobrevibacter smithii* (DSM 861), wykazano, że dzieje się to na drodze fagocytozy [100]. W przytoczonym badaniu [100] oraz w niniejszej pracy wykorzystano niedojrzałe komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego, które posiadają silniejsze zdolności fagocytarne niż komórki dojrzałe [101]. Beng i wsp [100] wykazali, iż archeony metanogenne nie wnikały do komórek nabłonka jelita grubego Caco-2, nie wykazywały zatem właściwości immunogennych.

W kolejnych badaniach postanowiono sprawdzić czy archeony halofilne, Hrd. rudnickae oraz N. salaciae po wniknięciu do KD, nie wykazują działania genotoksycznego. Z wykorzystaniem metod mikroskopii fluorescencyjnej oceniono fragmentację chromatyny oraz obecność jedno- (SSB) i dwuniciowych (DSB) pęknięć DNA. Z kolei za pomocą cytometrii przepływowej oceniono cykl komórkowy KD, a także procent komórek w stanie apoptozy bądź nekrozy. Fragmentacja chromosomalnego DNA spowodowana przez jednooraz dwuniciowe pęknięcia DNA, może prowadzić do apoptozy, bądź wtórnie do nekrozy komórki [102]. Brak naprawy SSB i DSB DNA w komórkach człowieka może prowadzić do rozwoju wielu schorzeń m.in. nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych, niepłodności, niedoborów odporności czy mikrocefalii [103]. Oprócz czynników fizycznych i chemicznych (m.in. promieniowanie jonizujące, cisplatyna, etopozyd czy epirubicyna) [103], DSB mogą być wywołane również przez czynniki biologiczne, w tym drobnoustroje: Pseudomonas aeruginosa, Chlamydia trachomatis, Haemophilus ducreyi, Escherichia coli, Helicobacter pylori lub ich komponenty m.in. toksyny ExoS Ps. aeruginosa czy toksyna CDT produkowana m.in. przez E.coli czy H. ducreyi [104]. W literaturze opisano również czynniki zarówno chemiczne (cefarantyna [105], ksantohumol [106] czy kladrybina [107]), jak i mikrobiologiczne (wirus Epstein-Barr [108], prątki Mycobacterium bovis oraz M. bovis Bacillus Calmette-Guérin [109]), które powodowały fragmentację chromosomalnego DNA w komórkach dendrytycznych. W prezentowanych badaniach nie wykazano fragmentacji chromosomalnego DNA, czy indukcji SSB oraz DSB DNA po stymulacji KD archeonami halofilnymi, Hrd. rudnickae oraz N. salaciae, co wskazuje na brak działania genotoksycznego tych drobnoustrojów. W ostatnim etapie I celu badań sprawdzono wpływ archeonów halofilnych na przebieg cyklu komórkowego KD z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Taki wpływ udokumentowano w przypadku bakterii chorobotwórczych (m.in.: E.coli. Campylobacter *Mycobacterium* ulcerans Yersinia spp., czy pseudotuberculosis), gdzie cyklomoduliny hamowały cykl komórkowy limfocytów B, limfocytów T, fibroblastów, makrofagów, czy komórek nabłonka [110]. Cyklomodulina CDT uniemożliwiała przejście w cyklu komórkowym z fazy G2 w fazę M, co w konsekwencji prowadziło do zahamowania mitozy i proliferacji komórek [110], z kolei cyklomodulina FIP produkowana przez Fusobacterium nucleatum powodowała akumulacje limfocytów B i T w fazie G1, co osłabiało odpowiedź komórek na antygeny [110]. Ponadto wykazano iż, poprzez indukcję apoptozy komórek nabłonka, zahamowanie proliferacji limfocytów T, spadek produkcji defensyn czy zahamowanie syntezy białek, cyklomoduliny nasilały adhezję patogenów do komórek gospodarza [111]. Wyniki najnowszych badań wskazują, iż antygeny bakteryjne rozpoznane przez KD mogą odpowiadać za niewłaściwy przebieg mitozy w KD, hamować proces kario- i cytokinezy prowadząc ostatecznie do akumulacji centrosomów i bloku w fazie G1 [112]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wskazują, iż *Hrd. rudnickae* oraz *N. salaciae* nie wpływały na cykl komórkowy KD. Badane gatunki archeonów halofilnych po wniknięciu do KD nie uszkadzały DNA i nie indukowały apoptozy czy nekrozy, co wskazuje iż stanowiły w prezentowanym modelu eksperymentalnym bezpieczny stymulator KD. **Podsumowując ten etap pracy należy podkreślić zdolność wnikania archeonów halofilnych** *Hrd. rudnickae* **oraz** *N. salaciae* **do jądra i cytoplazmy KD oraz brak uszkodzenia DNA, co pozostaje w związku z prawidłowym cyklem komórkowym i brakiem oznak apoptozy czy nekrozy w komórkach poddanych działaniu archeonów halofilnych.**

Biorac pod uwagę powyższe wyniki, w kolejnym etapie pracy oceniono zdolność archeonów halofilnych do efektywnego pobudzania procesów zachodzących w synapsie immunologicznej KD z limfocytami. W dostępnej literaturze jest zaledwie kilka prac poświęconych interakcjom archeonów metanogennych Ζ komórkami układu odpornościowego. W pracy Bang i wsp. wykazano, iż gatunki Methanosphaera stadtmanae (DSM 3091), Methanobrevibacter smithii (DSM 861) oraz Methanomassiliicoccus luminyensis, wchodzące w skład ludzkiego mikrobiomu, stymulowały KD do produkcji TNF-α oraz IL-1β. [100, 113]. Ponadto, zaobserwowano nasilenie ekspresji receptorów CD86 i CD197 na powierzchni KD stymulowanych M. stadtmanae, lecz nie M. smithii w porównaniu do komórek niestymulowanych [100]. O ile w pracach Bang i wsp [100, 113] autorzy skupili się jedynie na badaniu ekspresji receptorów CD86 oraz CD197 (CCR7), w niniejszej pracy zbadano fenotyp KD z uwzględnieniem receptorów należacych do grupy receptorów rozpoznających wzorce - PRR (TLR2 oraz TLR4); receptora DC-SIGN charakterystycznego dla komórek dendrytycznych; ekspresję cząsteczek kostymulujacych CD86, CD80, CD40 oraz receptora HLA-DR. Receptory te są zaangażowane w przekazywanie antygenowo-swoistego sygnału aktywacji limfocytom T. W prezentowanej pracy nie wykazano istotnych zmian w ekspresji receptorów TLR2 i TLR4 na KD stymulowanych archeonami halofilnymi w porównaniu do komórek niestymulowanych, co może być spowodowane brakiem LPS oraz mureiny w ścianie komórkowej archeonów [114]. W innych nieopublikowanych badaniach własnych wykazano, iż ekspresja TLR4 na powierzchni KD nasila się eskpozycji na LPS *E.coli*. W pracy nie badano innych receptorów z rodziny TLR, choć jak wykazali Vierbuchen i wsp. [115] archeony metanogenne (*M. stadtmanae*) były rozpoznawane przez komórki układu odpornościowego głównie przez receptor TLR8, oraz słabiej przez TLR7. Jednakże zaangażowanie tych receptorów wykazano odnotowano jedynie na komórkach linii BLaER 1 wywodzących się od limfocytów B przekształconych w komórki podobne do monocytów na drodze mutacji z pomocą systemu *CRISPR/Cas9*. Komponentem *M. stadtmanae* rozpoznawanym przez komórki BLaER 1 był RNA, lecz nie DNA [115]. Biorąc pod uwagę, iż receptory TLR7 oraz TLR8 są zaangażowane w rozpoznawanie pojedynczych nukleotydów oraz krótkich oligonukleotydów zarówno RNA wirusów czy bakterii [115], mechanizm rozpoznawania z udziałem tych receptorów nie jest specyficzny wyłącznie dla archeonów metanogennych.

Stymulacja KD Hrd. rudnickae lub N. salaciae skutkowała istotnym nasileniem ekspresji receptorów CD86 jak i CD80 oraz zwiększeniem odsetka KD wykazujących ekspresję receptora CD83. W przypadku pozostałych receptorów nie stwierdzono znamiennych różnic w ich ekspresji w stosunku do komórek niestymulowanych. Ekspresja receptora CD83 nasila się wraz z dojrzewaniem KD. Receptor ten odgrywa istotną rolę w pobudzaniu limfocytów T CD4⁺, zwłaszcza limfocytów T pamięci [69, 116]. Wykazany w badaniach wysoki odsetek stymulowanych archeonami halofilnymi KD wykazujących ekspresję receptorów CD86, CD80 i CD83, w porównaniu do KD niestymulowanych wskazuje, iż komórki dendrytyczne dojrzewały w wyniku kontaktu z archeonami halofilnymi. Z kolej produkcja cytokin, zarówno o charakterze pro- (TNF-α, IL-12p40), jak i przeciwzapalnym (IL-10) przez KD stymulowane archeonami halofilnymi wskazuje na ich zdolność do wzbudzania zrównoważonej odpowiedzi cytokinowej. Szczególnie obecność IL-10, która posiada właściwości regulatorowe, wydaje się być istotna z punktu widzenia możliwości wyciszania procesów zapalnych towarzyszacych astmie alergicznej, czy mukowiscydozie, które są wskazaniem do zastosowania haloterapii. Z kolei brak wytwarzania IL-23 pozostawał w związku z osłabioną odpowiedzią limfocytów T pamięci na antygeny archeonów halofilnych prezentowane przez KD, w porównaniu do limfocytów T dziewiczych.

Choć IL-23 jest cytokiną blisko spokrewnioną z IL-12, której podstawową funkcją jest polaryzacja odpowiedzi limfocytów dziewiczych CD45RA zdolnych do produkcji IFN-γ, to IL-23 pobudza produkcję interferonu i proliferację głównie limfocytów pamięci CD45RO [117]. Badania Vanden i wsp. [118] potwierdziły brak wpływu IL-23 na dziewicze nieaktywowane limfocyty T; jedynie limfocyty dziewicze aktywowane przeciwciałami monoklonalnymi anty-CD3 i anty-CD28 odpowiadały na IL-23 silną produkcją IFN-y, IL-10 i IL-17. W prezentowanych badaniach limfocyty dziewicze nie były wcześniej aktywowane przeciwciałami monoklonalnymi, a zatem znikoma aktywność limfocytów pamięci w odpowiedzi na stymulację archeonami halofilnymi prezentowanymi przez KD, przy braku IL-23 uwalnianej przez KD, pozostaje w zgodzie w obserwacjami innych autorów [118]. Biorąc pod uwagę kluczowe znaczenie KD w rozwoju odpowiedzi adaptacyjnej swoistej i zdolność tych komórek do polaryzacji limfocytów T w kierunku Th1 lub Th2, postanowiono sprawdzić, czy archeony halofilne prezentowane przez KD limfocytom będą pobudzały limfocyty T, i jeśli tak, to który profil tej odpowiedzi będzie znaczący. Wykazano, iż autologiczne limfocyty T CD4⁺ w ko-hodowli z KD stymulowanymi Hrd. rudnickae lub N. salaciae, produkowały zarówno IFN-γ (cytokina Th1), jak i IL-13 (cytokina Th2). Uzyskany wynik podkreśla zdolność archeonów halofilnych do wzbudzania obu typów odpowiedzi cytokinowej. Wobec braku doniesień z udziałem innych szczepów archeonów halofilnych w modelu ko-hodowli KD z limfocytami, na tym etapie wiedzy trudno porównać uzyskane wyniki z pracami innych autorów. Jedynie badania Blais-Lecours i wsp. [119] wykazały wzrost liczby limfocytów w popłuczynach oskrzelowych myszy, którym donosowo podawano archeony metanogenne (M. smithii oraz M. stadtmanae). Wykazano, iż dominującą subpopulacją były limfocyty T CD4⁺ oraz limfocyty B CD19⁺. Ponadto, oba szczepy archeonów metanogennych indukowały produkcję antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgG, które wykryto w surowicach immunizowanych myszy. Obecność przeciwciał klasy IgG przeciwko M. smithii, oraz Methanobrevibacter oralis opisano także u pacjentów z zapaleniem ozebnej [120], co wskazuje, iż archeony metanogenne posiadają właściwości immunogenne. W innych badaniach wykazano, iż drobnoustroje M. stadtmanae obecne w kale pacjentów z zapaleniem jelita indukowały powstawanie antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgG [121]. W tym samym badaniu, nie wykazano u pacjentów przeciwciał przeciwko M. wskazuje na smithii, co zróżnicowanie procesów odpornościowych w odniesieniu do różnych szczepów archeonów metanogennych występujących w jelicie. W powyższych przytoczonych badaniach nie analizowano jednak odpowiedzi limfocytów T. W zrealizowanych w prezentowanej pracy badaniach nie wykazano, ani na poziomie KD, ani limfocytów T istotnych różnic w odpowiedzi tych komórek na stymulację różnymi gatunkami archeonów halofilnych, *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae.* Podsumowując ten etap badań wykazano, iż stymulacja KD pochodzenia monocytarnego archeonami halofilnymi *Hrd. rudnickae* lub *N. salaciae* skutkowała dojrzewaniem KD, co przejawiało się nasiloną ekspresją receptorów powierzchniowych CD86, CD80, CD83 oraz nasiloną produkcją cytokin (TNF-α, IL-10, IL-12p40) przez te komórki. Ponadto, autologiczne limfocyty T o fenotypie CD4⁺, w odpowiedzi na stymulację archeonami halofilnymi prezentowanymi przez KD, produkowały zarówno cytokiny profilu Th1 (IFN- γ) jak i Th2 (IL-13) co świadczy o pewnej równowadze w zakresie wydzielanych cytokin pro- i przeciwzapalnych.

ostatnim etapie badań zastosowano model samych komórek dendrytycznych W traktowanych enterotoksyna B S. aureus, lub takich komórek w ko-hodowli z limfocytami T. Enterotoksyna B S. aureus indukuje silną reakcję zapalną [122, 123]. W niniejszej pracy wykazano również jej silne właściwości genotoksyczne, których skutkiem była fragmentacja chromatyny, pęknięcia DNA, a także apoptoza KD. Ponadto, wykazano, iż stymulowane SEB KD charakteryzowały się istotnym nasileniem ekspresji receptorów CD86, CD80 oraz CD83 co świadczyło o ich dojrzewaniu, oraz produkcją cytokin IL-12p40, IL-10, TNF- α i IFN- γ . Badania na modelu KD, wykazały, iż SEB aktywując receptor TLR2, ale nie TLR4 indukował dojrzewanie komórek oraz różnicowanie dziewiczych limfocytów T w kierunku odpowiedzi Th2 [124]. Wyniki w prezentowanej pracy doktorskiej wskazujące na brak istotnych różnic w ekspresji receptorów TLR2 i TLR4 na powierzchni stymulowanych SEB KD, w odniesieniu do komórek niestymulowanych, pozostaja w zgodzie z wynikami pracy zaprezentowanymi w 2006 r. przez zespół Mandron i wsp. [124]. Inni badacze wykazali również silne działanie superantygenu SEB, manifestujące się m.in. wydzielaniem cytokin (np. IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 i IL-8) przez komórki monojądrzaste (PBMC), a także przez fibroblasty, komórki nabłonka oraz śródbłonka [78, 125, 126]. Zaobserwowano również, iż SEB indukuje apoptoze różnych linii komórkowych, m.in. THP-1 [127-130].

W badaniach własnych wykazano, iż stymulacja KD SEB w stężeniu 1 µg/ml skutkowała fragmentacją chromosomalnego DNA, indukcją pęknięć SSB oraz DSB w DNA, kumulacją KD w fazach sub-G1 oraz S cyklu komórkowego, a także istotnie zwiększonym procentem KD w stanie apoptozy. W dalszej części badań postanowiono sprawdzić, czy powyższe niekorzystne procesy w KD wywołane SEB moga być zneutralizowane przez archeony halofilne. Wykazano, iż 24 godz. stymulacja KD archeonami halofilnymi, Hrd. rudnickae lub N. salaciae, skutkowała: zmniejszeniem fragmentacji DNA, spadkiem liczby pęknięć SSB lub DSB, istotnie niższym odsetkiem komórek apoptotycznych oraz przywróceniem właściwego przebiegu cyklu komórkowego w porównaniu do komórek stymulowanych jedynie SEB. W kolejnych badaniach wykazano, iż KD stymulowane SEB charakteryzowały się istotnie podwyższoną ekspresją receptorów powierzchniowych (CD86, CD80, CD83) oraz istotnie nasiloną produkcją cytokin (IL-10, IFN-γ, TNF-α i IL-12p40) niż komórki niestymulowane. Jak zaznaczono powyżej, Mandron i wsp. [124] wykazali, iż ludzkie KD pochodzenia monocytarnego po stymulacji superantygenem SEB charakteryzuja się istotnie wyższą ekspresją receptorów CD86, CD83 oraz CD54, co według autorów wskazuje na aktywację KD. Jednocześnie, KD stymulowane SEB produkowały IFN-γ, TNF-α, IL-10 oraz IL-2 wydajniej niż komórki niestymulowane, nie wykazano natomiast nasilenia wytwarzania IL-4, IL-5 i IL-12p70 [124]. Mandron i wsp w swoich badaniach wykorzystali SEB w stężeniu 0,1 µg/ml [124], natomiast w niniejszej pracy wykorzystano SEB w stężeniu 1 μg/ml, co mogło mieć wpływ na pewne różnice w uzyskanych wynikach. Stymulacja superantygenem SEB KD i autologicznych limfocytów T CD4⁺, prowadziła do istotnie nasilonej produkcji cytokin przez limfocyty T CD4+ (IFN-γ, IL-13, IL-10, IL-12p40 oraz TNF-α), w porównaniu do hodowli bez SEB. Podobnie jak w hodowli samych komórek dendrytycznych, tak i w ko-hodowli KD z autologicznymi limfocytami T CD4⁺, obecność archeonów halofilnych, Hrd. rudnickae lub N. salaciae, nie wpłynęła istotnie na ekspresję receptorów powierzchniowych i nie powstrzymała "burzy cytokinowej" wywołanej SEB. Obecność archeonów halofilnych w hodowli samych KD lub KD i limfocytów T środowisku SEB nie neutralizowała działania SEB na poziomie ekspresji receptorów PRR oraz synapsy immunologicznej, jak również na poziomie cytokin uwalnianych przez KD i autologiczne limfocyty T CD4⁺. Wyniki tej części pracy po raz pierwszy wskazują na zdolność archeonów halofilnych do osłabiania uszkodzenia DNA i w konsekwencji zapobiegania

apoptozie komórek dendrytycznych wywołanych obecnością silnego stymulatora, jakim jest superantygen SEB. Jakkolwiek niezbędne są dalsze badania, których celem będzie, między innymi, wyjaśnienie mechanizmu działania ochronnego halofili na poziomie DNA KD. Wiedza ta może przyczynić się do opracowywania innych modeli eksperymentalnych, które dostarcza wiedzy na temat możliwego znaczenia "prozdrowotnego" archeonów halofilnych w warunkach zapalenia wywołanego obecnością drobnoustrojów chorobotwórczych, a także zrozumienia mechanizmów korzystnego działania haloterapii oraz speleoterapii w leczeniu astmy, alergii czy przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. Jak zauważają Beamon i wsp. [131], problemem w rekomendacji speleoterapii jest duża zmienność jaskiń oraz grot solnych, co uniemożliwia ekstrapolacje wyników uzyskanych w jednym miejscu na cały szereg innych obiektów. W ostatnich latach obserwowany jest wzrost liczby doniesień dotyczących halo- oraz speleo-terapii. Jedną z takich prac jest publikacja autorstwa Metel i wsp. [85], która wskazuje na pozytywny efekt rehabilitacji oddechowej połaczonej z wizytami w podziemnych komorach soli w kopalni soli w "Wieliczce" na parametry ogólnej sprawności osób w podeszłym wieku (zakres wieku 65-77 lat). Ograniczeniem tej pracy była mała grupa osób poddana badaniu (22 osoby obu płci) oraz brak grupy kontrolnej – osób poddanych rehabilitacji oddechowej bez speleoterapii [85], Innym ciekawym badaniem jest praca autorstwa Bar-Yoseph i wsp. [132], oceniająca wpływ haloterapii jako formy leczenia astmy u dzieci. Wykazano, iż stosowanie halogeneratora (urządzenia wytwarzającego aerozol) poprawia zarówno parametry oddechowe oraz komfort życia pacjentów [132]. Korzystne efekty speleoterapii oraz haloterapii są tłumaczone jako wypadkowa działań NaCl zawartego w powietrzu jak m.in. redukcja obrzęku dróg oddechowych i poprawa oczyszczania śluzowo-rzęskowego, dzięki aktywności przeciwdrobnoustrojowej jonów Na⁺ [84]. Jednakże, obecność drobnoustrojów halofilnych, szczególnie archeonów, nie została do tej pory zbadana w kontekście roli tych drobnoustrojów w powyższych terapiach.

Niniejsza praca doktorska, oprócz nowatorskiego spojrzenia na rolę archeonów halofilnych jako stymulatorów komórek układu odpornościowego człowieka, posiada pewne ograniczenia, które stwarzają przesłanki do dalszych badań w przyszłości. Badania te powinny być nakierowane na poszukiwanie ligandów archeonów halofilnych, które są rozpoznawane przez komórki układu odpornościowego. Ponadto, warto byłoby

przeprowadzić badania z udziałem szczepów archeonów halofilnych wchodzących w skład mikrobiomu człowieka, co mogłoby wykazać czy drobnoustroje te są tolerogenne czy immunogenne. Na etapie wykonywania eksperymentalnej części badań niniejszej rozprawy doktorskiej niemożliwe było pozyskanie takich szczepów ze względu na brak dostępnych metod ich pozyskania z kolekcji światowych. Kolejnym ważnym wyzwaniem byłoby kompleksowe poznanie mechanizmów, za pomocą których odbywa się rozpoznawanie archeonów halofilnych przez układ odpornościowy. Sprawdzenie w tym kontekście innych komórek immunokompetentnych, jak chociażby monocyty, makrofagi, komórki tuczne czy granulocyty, a także reakcji archeonów halofilnych z komórkami nabłonka górnych dróg oddechowych, biorąc pod uwagę, iż są to komórki, które jako jedne z pierwszych kontaktują się z archeonami halofilnymi podczas inhalacji wziewnej. Ważnym proponowanym rozwinięciem badań nad interakcjami archeonów halofilnych z komórkami odpornościowym gospodarza i barierą nabłonka dróg oddechowych, byłoby wykorzystanie odpowiednich modeli zwierzęcych, albowiem brak jest obecnie jakichkolwiek dowodów naukowych informacji na temat tych interakcji i ich skutków *in vivo*.

Podsumowując unikalny wymiar badań uzyskanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, wykazano po raz pierwszy na świecie, iż środowiskowe archeony halofilne aktywują *in vitro* komórki odpornościowe człowieka jakimi są komórki dendrytyczne oraz limfocyty T. Dostarczono również wiedzy na temat immunogennych właściwości gatunku *Hrd. rudnickae*, wyizolowanego z miejsca w którym stosowana jest w Polsce haloterapia. Wskazano także na pewne właściwości archeonów halofilnych chroniące komórki dendrytyczne przed uszkodzeniami DNA wywołanymi superantygenem SEB, jakkolwiek potwierdzenie tych przypuszczeń, opartych na uzyskanych wynikach, wymaga dalszych badań.

VII. 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 przepływowej, 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 nasilona ekspresja 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 leczenie 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.

VIII. 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 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.

IX. Bibliografia

- Hug LA, Baker BJ, Anantharaman K, Brown CT, Probst AJ, Castelle CJ, et al. A new view of the tree of life. Nat Microbiol. 2016;1:16048. Epub 2016/08/31. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.48. PubMed PMID: 27572647.
- Cavicchioli R. Archaea--timeline of the third domain. Nat Rev Microbiol. 2011;9(1):51-61. Epub 2010/12/07. doi: 10.1038/nrmicro2482. PubMed PMID: 21132019.
- Whittaker RH. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. Science. 1969;163(3863):150-60. Epub 1969/01/10. doi: 10.1126/science.163.3863.150. PubMed PMID: 5762760.
- Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(11):5088-90. Epub 1977/11/01. doi: 10.1073/pnas.74.11.5088. PubMed PMID: 270744; PubMed Central PMCID: PMCPMC432104.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(12):4576-9. Epub 1990/06/01. doi: 10.1073/pnas.87.12.4576. PubMed PMID: 2112744; PubMed Central PMCID: PMCPMC54159.
- Baker BJ, De Anda V, Seitz KW, Dombrowski N, Santoro AE, Lloyd KG. Diversity, ecology and evolution of Archaea. Nat Microbiol. 2020;5(7):887-900. Epub 2020/05/06. doi: 10.1038/s41564-020-0715-z. PubMed PMID: 32367054.
- Borrel G, Brugère JF, Gribaldo S, Schmitz RA, Moissl-Eichinger C. The hostassociated archaeome. Nat Rev Microbiol. 2020;18(11):622-36. Epub 2020/07/22. doi: 10.1038/s41579-020-0407-y. PubMed PMID: 32690877.
- Efenberger M, Brzezińska-Błaszczyk E, Wódz K. [Archaeons--still unknown microorganisms]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2014;68:1452-63. Epub 2014/12/23. doi: 10.5604/17322693.1131697. PubMed PMID: 25531709.
- 9. **Rodrigues-Oliveira T**, Belmok A, Vasconcellos D, Schuster B, Kyaw CM. Archaeal S-Layers: Overview and Current State of the Art. Front Microbiol. 2017;8:2597. Epub

2018/01/10. doi: 10.3389/fmicb.2017.02597. PubMed PMID: 29312266; PubMed Central PMCID: PMCPMC5744192.

- Albers SV, Jarrell KF. The archaellum: how Archaea swim. Front Microbiol. 2015;6:23. Epub 2015/02/24. doi: 10.3389/fmicb.2015.00023. PubMed PMID: 25699024; PubMed Central PMCID: PMCPMC4307647.
- Lyu Z, Shao N, Akinyemi T, Whitman WB. Methanogenesis. Curr Biol. 2018;28(13):R727-r32. Epub 2018/07/11. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.021. PubMed PMID: 29990451.
- Cavicchioli R, Curmi PM, Saunders N, Thomas T. Pathogenic archaea: do they exist? Bioessays. 2003;25(11):1119-28. Epub 2003/10/28. doi: 10.1002/bies.10354. PubMed PMID: 14579252.
- Leigh JA, Albers SV, Atomi H, Allers T. Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales. FEMS Microbiol Rev. 2011;35(4):577-608. Epub 2011/01/27. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00265.x. PubMed PMID: 21265868.
- Efenberger M, Wódz K, Brzezińska-Błaszczyk E. [Archaea--the significant inhabitants of human microbiome]. Przegl Lek. 2014;71(6):346-51. Epub 2014/10/28. PubMed PMID: 25344977.
- Ng SY, Zolghadr B, Driessen AJ, Albers SV, Jarrell KF. Cell surface structures of archaea. J Bacteriol. 2008;190(18):6039-47. Epub 2008/07/16. doi: 10.1128/jb.00546-08. PubMed PMID: 18621894; PubMed Central PMCID: PMCPMC2546794.
- Albers SV, Jarrell KF. The Archaellum: An Update on the Unique Archaeal Motility Structure. Trends Microbiol. 2018;26(4):351-62. Epub 2018/02/18. doi: 10.1016/j.tim.2018.01.004. PubMed PMID: 29452953.
- 17. Kim KW. Electron microscopic observations of prokaryotic surface appendages. J Microbiol. 2017;55(12):919-26. Epub 2017/12/08. doi: 10.1007/s12275-017-7369-4. PubMed PMID: 29214488.
- Albers SV, Meyer BH. The archaeal cell envelope. Nat Rev Microbiol. 2011;9(6):414-26. Epub 2011/05/17. doi: 10.1038/nrmicro2576. PubMed PMID: 21572458.

- Dominguez-Bello MG, Godoy-Vitorino F, Knight R, Blaser MJ. Role of the microbiome in human development. Gut. 2019;68(6):1108-14. Epub 2019/01/24. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317503. PubMed PMID: 30670574; PubMed Central PMCID: PMCPMC6580755.
- Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. Antonie Van Leeuwenhoek. 2020;113(12):2019-40. Epub 2020/11/03. doi: 10.1007/s10482-020-01474-7. PubMed PMID: 33136284.
- Fendrihan S, Legat A, Pfaffenhuemer M, Gruber C, Weidler G, Gerbl F, et al. Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. Rev Environ Sci Biotechnol. 2006;5(2-3):203-18. Epub 2006/08/01. doi: 10.1007/s11157-006-0007-y. PubMed PMID: 21984879; PubMed Central PMCID: PMCPMC3188376.
- 22. Gaci N, Borrel G, Tottey W, O'Toole PW, Brugère JF. Archaea and the human gut: new beginning of an old story. World J Gastroenterol. 2014;20(43):16062-78. Epub 2014/12/05. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.16062. PubMed PMID: 25473158; PubMed Central PMCID: PMCPMC4239492.
- 23. Koskinen K, Pausan MR, Perras AK, Beck M, Bang C, Mora M, et al. First Insights into the Diverse Human Archaeome: Specific Detection of Archaea in the Gastrointestinal Tract, Lung, and Nose and on Skin. mBio. 2017;8(6). Epub 2017/11/16. doi: 10.1128/mBio.00824-17. PubMed PMID: 29138298; PubMed Central PMCID: PMCPMC5686531.
- Probst AJ, Auerbach AK, Moissl-Eichinger C. Archaea on human skin. PLoS One. 2013;8(6):e65388. Epub 2013/06/19. doi: 10.1371/journal.pone.0065388. PubMed PMID: 23776475; PubMed Central PMCID: PMCPMC3680501.
- Chaudhary PP, Conway PL, Schlundt J. Methanogens in humans: potentially beneficial or harmful for health. Appl Microbiol Biotechnol. 2018;102(7):3095-104. Epub 2018/03/03. doi: 10.1007/s00253-018-8871-2. PubMed PMID: 29497795.
- Khelaifia S, Raoult D. Haloferax massiliensis sp. nov., the first human-associated halophilic archaea. New Microbes New Infect. 2016;12:96-8. Epub 2016/07/14. doi: 10.1016/j.nmni.2016.05.007. PubMed PMID: 27408734; PubMed Central PMCID: PMCPMC4919280.

- 27. Nam YD, Chang HW, Kim KH, Roh SW, Kim MS, Jung MJ, et al. Bacterial, archaeal, and eukaryal diversity in the intestines of Korean people. J Microbiol. 2008;46(5):491-501. Epub 2008/11/01. doi: 10.1007/s12275-008-0199-7. PubMed PMID: 18974948.
- Oxley AP, Lanfranconi MP, Würdemann D, Ott S, Schreiber S, McGenity TJ, et al. Halophilic archaea in the human intestinal mucosa. Environ Microbiol. 2010;12(9):2398-410. Epub 2010/05/05. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02212.x. PubMed PMID: 20438582.
- 29. **Cui H-L**, Dyall-Smith ML. Cultivation of halophilic archaea (class Halobacteria) from thalassohaline and athalassohaline environments. Marine Life Science & Technology. 2021;3(2):243-51. doi: 10.1007/s42995-020-00087-3.
- Giani M, Garbayo I, Vílchez C, Martínez-Espinosa RM. Haloarchaeal Carotenoids: Healthy Novel Compounds from Extreme Environments. Mar Drugs. 2019;17(9). Epub 2019/09/11. doi: 10.3390/md17090524. PubMed PMID: 31500208; PubMed Central PMCID: PMCPMC6780574.
- Lee HS. Diversity of halophilic archaea in fermented foods and human intestines and their application. J Microbiol Biotechnol. 2013;23(12):1645-53. Epub 2013/09/11. doi: 10.4014/jmb.1308.08015. PubMed PMID: 24018967.
- 32. Dyall-Smith ML, Pfeiffer F, Klee K, Palm P, Gross K, Schuster SC, et al. Haloquadratum walsbyi: limited diversity in a global pond. PLoS One. 2011;6(6):e20968. Epub 2011/06/28. doi: 10.1371/journal.pone.0020968. PubMed PMID: 21701686; PubMed Central PMCID: PMCPMC3119063.
- 33. Schubert BA, Lowenstein TK, Timofeeff MN, Parker MA. Halophilic Archaea cultured from ancient halite, Death Valley, California. Environ Microbiol. 2010;12(2):440-54. Epub 2009/10/21. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02086.x. PubMed PMID: 19840101.
- Stan-Lotter H, Fendrihan S. Halophilic Archaea: Life with Desiccation, Radiation and Oligotrophy over Geological Times. Life (Basel). 2015;5(3):1487-96. Epub 2015/08/01. doi: 10.3390/life5031487. PubMed PMID: 26226005; PubMed Central PMCID: PMCPMC4598649.

- Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A, Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. FEMS Microbiol Rev. 2018;42(3):353-75. Epub 2018/03/13. doi: 10.1093/femsre/fuy009. PubMed PMID: 29529204.
- Engel MB, Catchpole HR. A microprobe analysis of inorganic elements in Halobacterium salinarum. Cell Biol Int. 2005;29(8):616-22. Epub 2005/07/13. doi: 10.1016/j.cellbi.2005.03.024. PubMed PMID: 16009572.
- 37. DasSarma S, DasSarma P. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use.
 Curr Opin Microbiol. 2015;25:120-6. Epub 2015/06/13. doi: 10.1016/j.mib.2015.05.009. PubMed PMID: 26066288; PubMed Central PMCID: PMCPMC4729366.
- Loukas A, Kappas I, Abatzopoulos TJ. HaloDom: a new database of halophiles across all life domains. J Biol Res (Thessalon). 2018;25:2. Epub 2018/05/26. doi: 10.1186/s40709-017-0072-0. PubMed PMID: 29796383; PubMed Central PMCID: PMCPMC5957262.
- Albuquerque L, Kowalewicz-Kulbat M, Drzewiecka D, Staczek P, d'Auria G, Rossello-Mora R, et al. Halorhabdus rudnickae sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a salt mine borehole in Poland. Syst Appl Microbiol. 2016;39(2):100-5. Epub 2016/01/11. doi: 10.1016/j.syapm.2015.12.004. PubMed PMID: 26749115.
- Albuquerque L, Taborda M, La Cono V, Yakimov M, da Costa MS. Natrinema salaciae sp. nov., a halophilic archaeon isolated from the deep, hypersaline anoxic Lake Medee in the Eastern Mediterranean Sea. Syst Appl Microbiol. 2012;35(6):368-73. Epub 2012/07/24. doi: 10.1016/j.syapm.2012.06.005. PubMed PMID: 22817877.
- Pfeifer K, Ergal İ, Koller M, Basen M, Schuster B, Rittmann SKR. Archaea Biotechnology. Biotechnol Adv. 2021;47:107668. Epub 2020/12/04. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107668. PubMed PMID: 33271237.
- Singh A, Singh AK. Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential. Biotechnol Lett. 2017;39(12):1793-800. Epub 2017/09/14. doi: 10.1007/s10529-017-2434-y. PubMed PMID: 28900776.

- 43. Besse A, Peduzzi J, Rebuffat S, Carré-Mlouka A. Antimicrobial peptides and proteins in the face of extremes: Lessons from archaeocins. Biochimie. 2015;118:344-55. Epub 2015/06/21. doi: 10.1016/j.biochi.2015.06.004. PubMed PMID: 26092421.
- Adamiak N, Krawczyk KT, Locht C, Kowalewicz-Kulbat M. Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development. Front Immunol. 2021;12:746235. Epub 2021/09/28. doi: 10.3389/fimmu.2021.746235. PubMed PMID: 34567012; PubMed Central PMCID: PMCPMC8462270.
- 45. Rowley DA, Fitch FW. The road to the discovery of dendritic cells, a tribute to Ralph Steinman. Cell Immunol. 2012;273(2):95-8. Epub 2012/02/14. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.01.002. PubMed PMID: 22326169.
- 46. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. J Exp Med. 1974;139(2):380-97. Epub 1974/02/01. doi: 10.1084/jem.139.2.380. PubMed PMID: 4589990; PubMed Central PMCID: PMCPMC2139525.
- 47. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. J Exp Med. 1974;139(6):1431-45. Epub 1974/06/01. doi: 10.1084/jem.139.6.1431. PubMed PMID: 4598015; PubMed Central PMCID: PMCPMC2139680.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med. 1973;137(5):1142-62. Epub 1973/05/01. doi: 10.1084/jem.137.5.1142. PubMed PMID: 4573839; PubMed Central PMCID: PMCPMC2139237.
- Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(10):5132-6. Epub 1978/10/01. doi: 10.1073/pnas.75.10.5132. PubMed PMID: 154105; PubMed Central PMCID: PMCPMC336278.
- 50. Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM, Kaplan G. Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. J Exp Med. 1982;155(4):1172-87. Epub 1982/04/01. doi: 10.1084/jem.155.4.1172. PubMed PMID: 6460832; PubMed Central PMCID: PMCPMC2186648.

- 51. Nobel Prize to immunology. Nat Rev Immunol. 2011;11(11):714. Epub 2011/12/06.
 doi: 10.1038/nri3103. PubMed PMID: 22141149.
- Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. Immunology. 2018;154(1):3-20. Epub 2018/02/27. doi: 10.1111/imm.12888. PubMed PMID: 29313948.
- Waisman A, Lukas D, Clausen BE, Yogev N. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. Semin Immunopathol. 2017;39(2):153-63. Epub 2016/07/28. doi: 10.1007/s00281-016-0583-z. PubMed PMID: 27456849.
- Schultze JL, Aschenbrenner AC. Systems immunology allows a new view on human dendritic cells. Semin Cell Dev Biol. 2019;86:15-23. Epub 2018/02/16. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.017. PubMed PMID: 29448068.
- 55. Villar J, Segura E. Decoding the Heterogeneity of Human Dendritic Cell Subsets. Trends Immunol. 2020;41(12):1062-71. Epub 2020/12/01. doi: 10.1016/j.it.2020.10.002. PubMed PMID: 33250080.
- Clark GJ, Silveira PA, Hogarth PM, Hart DNJ. The cell surface phenotype of human dendritic cells. Semin Cell Dev Biol. 2019;86:3-14. Epub 2018/03/03. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.013. PubMed PMID: 29499385.
- 57. León B, López-Bravo M, Ardavín C. Monocyte-derived dendritic cells. Semin Immunol. 2005;17(4):313-8. Epub 2005/06/16. doi: 10.1016/j.smim.2005.05.013. PubMed PMID: 15955712.
- Szczygieł A, Pajtasz-Piasecka E. Between biology and medicine: perspectives on the use of dendritic cells in anticancer therapy. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2017;71(0):921-41. Epub 2017/11/28. doi: 10.5604/01.3001.0010.5808. PubMed PMID: 29176007.
- Coutant F. Shaping of Monocyte-Derived Dendritic Cell Development and Function by Environmental Factors in Rheumatoid Arthritis. Int J Mol Sci. 2021;22(24). Epub 2021/12/25. doi: 10.3390/ijms222413670. PubMed PMID: 34948462; PubMed Central PMCID: PMCPMC8708154.
- Tang LL, Zhang Z, Zheng JS, Sheng JF, Liu KZ. Phenotypic and functional characteristics of dendritic cells derived from human peripheral blood monocytes. J Zhejiang Univ Sci B. 2005;6(12):1176-81. Epub 2005/12/17. doi:

10.1631/jzus.2005.B1176. PubMed PMID: 16358375; PubMed Central PMCID: PMCPMC1390640.

- Kowalewicz-Kulbat M, Szpakowski P, Krawczyk KT, Kowalski ML, Kosinski S, Biet F, et al. Decrease of IL-5 Production by Naive T Cells Cocultured with IL-18-Producing BCG-Pulsed Dendritic Cells from Patients Allergic to House Dust Mite. Vaccines (Basel). 2021;9(3). Epub 2021/04/04. doi: 10.3390/vaccines9030277. PubMed PMID: 33803752; PubMed Central PMCID: PMCPMC8003153.
- 62. Dustin ML. The immunological synapse. Arthritis Res. 2002;4 Suppl 3(Suppl 3):S119-25. Epub 2002/07/12. doi: 10.1186/ar559. PubMed PMID: 12110130; PubMed Central PMCID: PMCPMC3240135.
- 63. Dustin ML. The immunological synapse. Cancer Immunol Res. 2014;2(11):1023-33.
 Epub 2014/11/05. doi: 10.1158/2326-6066.Cir-14-0161. PubMed PMID: 25367977;
 PubMed Central PMCID: PMCPMC4692051.
- 64. Rothoeft T, Balkow S, Krummen M, Beissert S, Varga G, Loser K, et al. Structure and duration of contact between dendritic cells and T cells are controlled by T cell activation state. Eur J Immunol. 2006;36(12):3105-17. Epub 2006/11/18. doi: 10.1002/eji.200636145. PubMed PMID: 17111349.
- Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? Trends Immunol. 2003;24(6):314-9. Epub 2003/06/18. doi: 10.1016/s1471-4906(03)00111-x. PubMed PMID: 12810107.
- 66. Van Gool SW, Vandenberghe P, de Boer M, Ceuppens JL. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. Immunol Rev. 1996;153:47-83. Epub 1996/10/01. doi: 10.1111/j.1600-065x.1996.tb00920.x. PubMed PMID: 9010719.
- 67. Laman JD, Claassen E, Noelle RJ. Functions of CD40 and Its Ligand, gp39 (CD40L). Crit Rev Immunol. 2017;37(2-6):371-420. Epub 2017/01/01. doi: 10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.100. PubMed PMID: 29773027.
- van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol. 2000;67(1):2-17.
 Epub 2000/01/27. doi: 10.1002/jlb.67.1.2. PubMed PMID: 10647992.
- Grosche L, Knippertz I, König C, Royzman D, Wild AB, Zinser E, et al. The CD83 Molecule - An Important Immune Checkpoint. Front Immunol. 2020;11:721. Epub

2020/05/05. doi: 10.3389/fimmu.2020.00721. PubMed PMID: 32362900; PubMed Central PMCID: PMCPMC7181454.

- Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men. Trends Immunol. 2013;34(10):482-6. Epub 2013/04/24. doi: 10.1016/j.it.2013.03.001. PubMed PMID: 23608151.
- Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. Cell. 2020;180(6):1044-66. Epub 2020/03/14. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.041. PubMed PMID: 32164908.
- 72. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. Cancers (Basel). 2016;8(3). Epub 2016/03/22. doi: 10.3390/cancers8030036. PubMed PMID: 26999211; PubMed Central PMCID: PMCPMC4810120.
- 73. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. Immunity. 2018;48(2):202-13. Epub 2018/02/22. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.007. PubMed PMID: 29466753; PubMed Central PMCID: PMCPMC5826622.
- 74. Ratajczak W, Niedźwiedzka-Rystwej P, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Immunological memory cells. Cent Eur J Immunol. 2018;43(2):194-203. Epub 2018/08/24. doi: 10.5114/ceji.2018.77390. PubMed PMID: 30135633; PubMed Central PMCID: PMCPMC6102609.
- 75. Boyman O, Létourneau S, Krieg C, Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. Eur J Immunol. 2009;39(8):2088-94. Epub 2009/07/29. doi: 10.1002/eji.200939444. PubMed PMID: 19637200.
- Niedźwiedzka-Rystwej P, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. [Characteristics of T lymphocyte subpopulations]. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2013;67:371-9. Epub 2013/05/15. doi: 10.5604/17322693.1048814. PubMed PMID: 23667096.
- Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Crameri R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β, and TNF-α: Receptors, functions, and roles in diseases. J Allergy Clin Immunol. 2016;138(4):984-1010. Epub 2016/09/01. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.033. PubMed PMID: 27577879.

- 78. Krakauer T. Staphylococcal Superantigens: Pyrogenic Toxins Induce Toxic Shock. Toxins (Basel). 2019;11(3):178. doi: 10.3390/toxins11030178. PubMed PMID: 30909619.
- 79. Abdurrahman G, Schmiedeke F, Bachert C, Bröker BM, Holtfreter S. Allergy-A New Role for T Cell Superantigens of Staphylococcus aureus? Toxins (Basel).
 2020;12(3):176. doi: 10.3390/toxins12030176. PubMed PMID: 32178378.
- Fries BC, Varshney AK. Bacterial Toxins-Staphylococcal Enterotoxin B. Microbiol Spectr. 2013;1(2). Epub 2013/12/01. doi: 10.1128/microbiolspec.AID-0002-2012.
 PubMed PMID: 26184960; PubMed Central PMCID: PMCPMC5086421.
- 81. Liu T, He SH, Zheng PY, Zhang TY, Wang BQ, Yang PC. Staphylococcal enterotoxin B increases TIM4 expression in human dendritic cells that drives naïve CD4 T cells to differentiate into Th2 cells. Mol Immunol. 2007;44(14):3580-7. Epub 2007/04/19. doi: 10.1016/j.molimm.2007.03.004. PubMed PMID: 17439824.
- 82. Coutant KD, de Fraissinette AB, Cordier A, Ulrich P. Modulation of the activity of human monocyte-derived dendritic cells by chemical haptens, a metal allergen, and a staphylococcal superantigen. Toxicol Sci. 1999;52(2):189-98. Epub 2000/01/12. doi: 10.1093/toxsci/52.2.189. PubMed PMID: 10630571.
- 83. Rybaczek D, Musiałek MW, Balcerczyk A. Caffeine-Induced Premature Chromosome Condensation Results in the Apoptosis-Like Programmed Cell Death in Root Meristems of Vicia faba. PLoS One. 2015;10(11):e0142307. Epub 2015/11/07. doi: 10.1371/journal.pone.0142307. PubMed PMID: 26545248; PubMed Central PMCID: PMCPMC4636323.
- 84. Crisan-Dabija R, Sandu IG, Popa IV, Scripcariu DV, Covic A, Burlacu A. Halotherapy-An Ancient Natural Ally in the Management of Asthma: A Comprehensive Review. Healthcare (Basel). 2021;9(11). Epub 2021/11/28. doi: 10.3390/healthcare9111604. PubMed PMID: 34828649; PubMed Central PMCID: PMCPMC8623171.
- 85. **Mętel S**, Kostrzon M, Adamiak J, Gattner H, Kościelecka D, Sosulska A, et al. The influence of speleotherapy combined with pulmonary rehabilitation on functional fitness in older adults preliminary report. Ther Adv Respir Dis.

2020;14:1753466620926952. Epub 2020/06/11. doi: 10.1177/1753466620926952. PubMed PMID: 32519590; PubMed Central PMCID: PMCPMC7288829.

- Rashleigh R, Smith SM, Roberts NJ. A review of halotherapy for chronic obstructive pulmonary disease. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2014;9:239-46. Epub 2014/03/05. doi: 10.2147/copd.S57511. PubMed PMID: 24591823; PubMed Central PMCID: PMCPMC3937102.
- Kostrzon M, Czarnobilski K, Czarnobilska E. The influence of pulmonary rehabilitation in the Wieliczka Salt Mine on asthma control--preliminary results. Przegl Lek. 2015;72(12):716-20. Epub 2015/01/01. PubMed PMID: 27024946.
- Mokryi V, Petrushka I, Dzhumelia E, Chayka O, Korolko S. Information support of Stebnyk geopark design. Environmental Problems. 2021;6:270-4. doi: 10.23939/ep2021.04.270.
- McGenity TJ, Gemmell RT, Grant WD, Stan-Lotter H. Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. Environ Microbiol. 2000;2(3):243-50. Epub 2001/02/24. doi: 10.1046/j.1462-2920.2000.00105.x. PubMed PMID: 11200425.
- 90. Litchfield CD. Potential for industrial products from the halophilic Archaea. J Ind Microbiol Biotechnol. 2011;38(10):1635-47. Epub 2011/08/20. doi: 10.1007/s10295-011-1021-9. PubMed PMID: 21853327.
- 91. Hegazy GE, Abu-Serie MM, Abo-Elela GM, Ghozlan H, Sabry SA, Soliman NA, et al. In vitro dual (anticancer and antiviral) activity of the carotenoids produced by haloalkaliphilic archaeon Natrialba sp. M6. Sci Rep. 2020;10(1):5986. Epub 2020/04/07. doi: 10.1038/s41598-020-62663-y. PubMed PMID: 32249805; PubMed Central PMCID: PMCPMC7136267.
- 92. Safarpour A, Ebrahimi M, Shahzadeh Fazeli SA, Amoozegar MA. Supernatant Metabolites from Halophilic Archaea to Reduce Tumorigenesis in Prostate Cancer In-vitro and In-vivo. Iran J Pharm Res. 2019;18(1):241-53. Epub 2019/05/16. PubMed PMID: 31089359; PubMed Central PMCID: PMCPMC6487416.
- 93. Nkamga VD, Lotte R, Roger PM, Drancourt M, Ruimy R. Methanobrevibacter smithii and Bacteroides thetaiotaomicron cultivated from a chronic paravertebral muscle abscess. Clin Microbiol Infect. 2016;22(12):1008-9. Epub 2016/10/25. doi: 10.1016/j.cmi.2016.09.007. PubMed PMID: 27664777.

- 94. Belay N, Mukhopadhyay B, Conway de Macario E, Galask R, Daniels L. Methanogenic bacteria in human vaginal samples. J Clin Microbiol. 1990;28(7):1666-8. Epub 1990/07/01. doi: 10.1128/jcm.28.7.1666-1668.1990. PubMed PMID: 2199527; PubMed Central PMCID: PMCPMC268013.
- 95. Lepp PW, Brinig MM, Ouverney CC, Palm K, Armitage GC, Relman DA. Methanogenic Archaea and human periodontal disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(16):6176-81. Epub 2004/04/07. doi: 10.1073/pnas.0308766101. PubMed PMID: 15067114; PubMed Central PMCID: PMCPMC395942.
- 96. Pecher WT, Al Madadha ME, DasSarma P, Ekulona F, Schott EJ, Crowe K, et al. Effects of road salt on microbial communities: Halophiles as biomarkers of road salt pollution. PLoS One. 2019;14(9):e0221355. Epub 2019/09/05. doi: 10.1371/journal.pone.0221355. PubMed PMID: 31483804; PubMed Central PMCID: PMCPMC6726365.
- 97. Chen S, Xu Y, Sun S, Chen F. Haloterrigena salifodinae sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a subterranean rock salt. Antonie Van Leeuwenhoek. 2019;112(9):1317-29. Epub 2019/04/22. doi: 10.1007/s10482-019-01264-w. PubMed PMID: 31006074.
- 98. Gibtan A, Song HS, Kim JY, Kim YB, Park N, Park K, et al. Halorubrum aethiopicum sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from commercial rock salt. Int J Syst Evol Microbiol. 2018;68(1):416-22. Epub 2017/12/12. doi: 10.1099/ijsem.0.002525. PubMed PMID: 29227219.
- 99. Khelaifia S, Caputo A, Andrieu C, Cadoret F, Armstrong N, Michelle C, et al. Genome sequence and description of Haloferax massiliense sp. nov., a new halophilic archaeon isolated from the human gut. Extremophiles. 2018;22(3):485-98. Epub 2018/02/13. doi: 10.1007/s00792-018-1011-1. PubMed PMID: 29435649; PubMed Central PMCID: PMCPMC5862939.
- 100. Bang C, Weidenbach K, Gutsmann T, Heine H, Schmitz RA. The intestinal archaea Methanosphaera stadtmanae and Methanobrevibacter smithii activate human dendritic cells. PLoS One. 2014;9(6):e99411. Epub 2014/06/11. doi: 10.1371/journal.pone.0099411. PubMed PMID: 24915454; PubMed Central PMCID: PMCPMC4051749.

- Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. Immunol Rev. 2007;219:143-56. Epub 2007/09/14. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x. PubMed PMID: 17850487.
- Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. Biochem Pharmacol. 2003;66(8):1527-35. Epub 2003/10/14. doi: 10.1016/s0006-2952(03)00508-2. PubMed PMID: 14555231.
- 103. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature. 2009;461(7267):1071-8. Epub 2009/10/23. doi: 10.1038/nature08467. PubMed PMID: 19847258; PubMed Central PMCID: PMCPMC2906700.
- 104. Erkekoglu P, Oral D, Kocer-Gumusel B, Chao MW. DNA Double-Strand Breaks Caused by Different Microorganisms: A Special Focus on Helicobacter pylori. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2017;36(2):131-50. Epub 2017/12/05. doi: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2017019476. PubMed PMID: 29199594.
- 105. Uto T, Toyama M, Yoshinaga K, Baba M. Cepharanthine induces apoptosis through the mitochondria/caspase pathway in murine dendritic cells. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2016;38(3):238-43. Epub 2016/04/29. doi: 10.3109/08923973.2016.1173059. PubMed PMID: 27121492.
- 106. Xuan NT, Shumilina E, Gulbins E, Gu S, Götz F, Lang F. Triggering of dendritic cell apoptosis by xanthohumol. Mol Nutr Food Res. 2010;54 Suppl 2:S214-24. Epub 2010/03/25. doi: 10.1002/mnfr.200900324. PubMed PMID: 20333722.
- 107. Singh V, Prajeeth CK, Gudi V, Bénardais K, Voss EV, Stangel M. 2-Chlorodeoxyadenosine (cladribine) induces apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells. Clin Exp Immunol. 2013;173(2):288-97. Epub 2013/04/24. doi: 10.1111/cei.12109. PubMed PMID: 23607690; PubMed Central PMCID: PMCPMC3722929.
- 108. Wang JJ, Li YF, Jin YY, Wang X, Chen TX. Effects of Epstein-Barr virus on the development of dendritic cells derived from cord blood monocytes: an essential role for apoptosis. Braz J Infect Dis. 2012;16(1):19-26. Epub 2012/02/24. PubMed PMID: 22358351.
- 109. Liu H, Xiong X, Zhu T, Zhu Y, Peng Y, Zhu X, et al. Differential nitric oxide induced by Mycobacterium bovis and BCG leading to dendritic cells apoptosis in a caspase

dependent manner. Microb Pathog. 2020;149:104303. Epub 2020/06/07. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104303. PubMed PMID: 32504845.

- Nougayrède JP, Taieb F, De Rycke J, Oswald E. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. Trends Microbiol. 2005;13(3):103-10. Epub 2005/03/02. doi: 10.1016/j.tim.2005.01.002. PubMed PMID: 15737728.
- 111. El-Aouar Filho RA, Nicolas A, De Paula Castro TL, Deplanche M, De Carvalho Azevedo VA, Goossens PL, et al. Heterogeneous Family of Cyclomodulins: Smart Weapons That Allow Bacteria to Hijack the Eukaryotic Cell Cycle and Promote Infections. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:208. Epub 2017/06/08. doi: 10.3389/fcimb.2017.00208. PubMed PMID: 28589102; PubMed Central PMCID: PMCPMC5440457.
- 112. Weier AK, Homrich M, Ebbinghaus S, Juda P, Miková E, Hauschild R, et al. Multiple centrosomes enhance migration and immune cell effector functions of mature dendritic cells. J Cell Biol. 2022;221(12). Epub 2022/10/11. doi: 10.1083/jcb.202107134. PubMed PMID: 36214847; PubMed Central PMCID: PMCPMC9555069.
- 113. Bang C, Vierbuchen T, Gutsmann T, Heine H, Schmitz RA. Immunogenic properties of the human gut-associated archaeon Methanomassiliicoccus luminyensis and its susceptibility to antimicrobial peptides. PLoS One. 2017;12(10):e0185919. Epub 2017/10/06. doi: 10.1371/journal.pone.0185919. PubMed PMID: 28982164; PubMed Central PMCID: PMCPMC5628862.
- 114. Krawczyk KT, Locht C, Kowalewicz-Kulbat M. Halophilic Archaea Halorhabdus Rudnickae and Natrinema Salaciae Activate Human Dendritic Cells and Orient T Helper Cell Responses. Front Immunol. 2022;13:833635. Epub 2022/06/21. doi: 10.3389/fimmu.2022.833635. PubMed PMID: 35720372; PubMed Central PMCID: PMCPMC9204267.
- 115. Vierbuchen T, Bang C, Rosigkeit H, Schmitz RA, Heine H. The Human-Associated Archaeon Methanosphaera stadtmanae Is Recognized through Its RNA and Induces TLR8-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation. Front Immunol. 2017;8:1535. Epub 2017/11/29. doi: 10.3389/fimmu.2017.01535. PubMed PMID: 29181003; PubMed Central PMCID: PMCPMC5694038.

- Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. Trends Immunol. 2002;23(6):273-5. Epub 2002/06/20. doi: 10.1016/s1471-4906(02)02214-7. PubMed PMID: 12072358.
- 117. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity. 2000;13(5):715-25. Epub 2000/12/15. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00070-4. PubMed PMID: 11114383.
- 118. Vanden Eijnden S, Goriely S, De Wit D, Willems F, Goldman M. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human. Eur J Immunol. 2005;35(2):469-75. Epub 2005/02/01. doi: 10.1002/eji.200425677. PubMed PMID: 15682457.
- 119. Blais Lecours P, Duchaine C, Taillefer M, Tremblay C, Veillette M, Cormier Y, et al. Immunogenic properties of archaeal species found in bioaerosols. PLoS One. 2011;6(8):e23326. Epub 2011/08/23. doi: 10.1371/journal.pone.0023326. PubMed PMID: 21858070; PubMed Central PMCID: PMCPMC3155538 alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.
- 120. Yamabe K, Maeda H, Kokeguchi S, Tanimoto I, Sonoi N, Asakawa S, et al. Distribution of Archaea in Japanese patients with periodontitis and humoral immune response to the components. FEMS Microbiol Lett. 2008;287(1):69-75. Epub 2008/08/19. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01304.x. PubMed PMID: 18707623.
- Blais Lecours P, Marsolais D, Cormier Y, Berberi M, Haché C, Bourdages R, et al. Increased prevalence of Methanosphaera stadtmanae in inflammatory bowel diseases. PLoS One. 2014;9(2):e87734. Epub 2014/02/06. doi: 10.1371/journal.pone.0087734. PubMed PMID: 24498365; PubMed Central PMCID: PMCPMC3912014.
- 122. Yoon S, Bae KL, Shin JY, Yoo HJ, Lee HW, Baek SY, et al. Analysis of the in vivo dendritic cell response to the bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B in the mouse spleen. Histol Histopathol. 2001;16(4):1149-59. Epub 2001/10/20. doi: 10.14670/hh-16.1149. PubMed PMID: 11642735.
- 123. **Herz U**, Rückert R, Wollenhaupt K, Tschernig T, Neuhaus-Steinmetz U, Pabst R, et al. Airway exposure to bacterial superantigen (SEB) induces lymphocyte-dependent airway inflammation associated with increased airway responsiveness--a model for

non-allergic asthma. Eur J Immunol. 1999;29(3):1021-31. Epub 1999/03/26. doi: 10.1002/(sici)1521-4141(199903)29:03<1021::Aid-immu1021>3.0.Co;2-3. PubMed PMID: 10092107.

- 124. Mandron M, Ariès MF, Brehm RD, Tranter HS, Acharya KR, Charveron M, et al. Human dendritic cells conditioned with Staphylococcus aureus enterotoxin B promote TH2 cell polarization. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(5):1141-7. Epub 2006/05/06. doi: 10.1016/j.jaci.2005.12.1360. PubMed PMID: 16675344.
- 125. Grievink HW, Luisman T, Kluft C, Moerland M, Malone KE. Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. Biopreserv Biobank. 2016;14(5):410-5. Epub 2016/10/18. doi: 10.1089/bio.2015.0104. PubMed PMID: 27104742.
- 126. Krakauer T, Stiles BG. The staphylococcal enterotoxin (SE) family: SEB and siblings. Virulence. 2013;4(8):759-73. Epub 2013/04/19. doi: 10.4161/viru.23905. PubMed PMID: 23959032.
- 127. Zhang X, Shang W, Yuan J, Hu Z, Peng H, Zhu J, et al. Positive Feedback Cycle of TNFα Promotes Staphylococcal Enterotoxin B-Induced THP-1 Cell Apoptosis. Front Cell Infect Microbiol. 2016;6:109. Epub 2016/10/07. doi: 10.3389/fcimb.2016.00109. PubMed PMID: 27709104; PubMed Central PMCID: PMCPMC5030291.
- 128. Kedzierska A, Kaszuba-Zwoińska J, Słodowska-Hajduk Z, Kapińska-Mrowiecka M, Czubak M, Thor P, et al. SEB-induced T cell apoptosis in atopic patients--correlation to clinical status and skin colonization by Staphylococcus aureus. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2005;53(1):63-70. Epub 2005/03/12. PubMed PMID: 15761377.
- 129. Ionin B, Hammamieh R, Shupp JW, Das R, Pontzer CH, Jett M. Staphylococcal enterotoxin B causes differential expression of Rnd3 and RhoA in renal proximal tubule epithelial cells while inducing actin stress fiber assembly and apoptosis. Microb Pathog. 2008;45(5-6):303-9. Epub 2008/08/30. doi: 10.1016/j.micpath.2008.07.002. PubMed PMID: 18721871.
- 130. Kissner TL, Ruthel G, Alam S, Ulrich RG, Fernandez S, Saikh KU. Activation of MyD88 signaling upon staphylococcal enterotoxin binding to MHC class II

molecules. PLoS One. 2011;6(1):e15985. Epub 2011/02/02. doi: 10.1371/journal.pone.0015985. PubMed PMID: 21283748; PubMed Central PMCID: PMCPMC3024394.

- Beamon S, Falkenbach A, Fainburg G, Linde K. Speleotherapy for asthma. Cochrane Database Syst Rev. 2001;(2):Cd001741. Epub 2001/06/19. doi: 10.1002/14651858.Cd001741. PubMed PMID: 11406004.
- Bar-Yoseph R, Kugelman N, Livnat G, Gur M, Hakim F, Nir V, et al. Halotherapy as asthma treatment in children: A randomized, controlled, prospective pilot study. Pediatr Pulmonol. 2017;52(5):580-7. Epub 2016/10/11. doi: 10.1002/ppul.23621. PubMed PMID: 27723955.

Oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach

Oświadczenie o udziale w publikacjach **mgr Krzysztof Krawczyk** Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki e-mail: krzysztof.krawczyk@biol.uni.lodz.pl

 Natalia Adamiak, Krzysztof T. Krawczyk, Camille Locht, Magdalena Kowalewicz-Kulbat. (2021). Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development. Front. Immunol. 12:746235. doi: 10.3389/fimmu.2021.746235

Oświadczam, że mój udział w ww. publikacji wynosił **55%** i obejmował współudział w zebraniu literatury i wyborze bibliografii, przygotowanie manuskryptu, opracowanie merytoryczne i graficzne Tabeli 1 i 2 oraz edytowanie finalnej wersji manuskryptu.

podpis współautora

podpis wspołautora

 Krzysztof Krawczyk, Camille Locht, Magdalena Kowalewicz-Kulbat. (2022). Halophilic Archaea Halorhabdus Rudnickae and Natrinema Salaciae Activate Human Dendritic Cells and Orient T Helper Cell Responses. Front. Immunol. 13:833635. doi: 10.3389/fimmu.2022.833635

Oświadczam, że mój udział w ww. publikacji wynosił **70%** i obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, wykonanie doświadczeń, analizę wyników, przygotowanie manuskryptu oraz rycin.

Oświadczenie o udziale w publikacjach **dr hab. Magdalena Kowalewicz-Kulbat** Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki e-mail: magdalena.kowalewicz@biol.uni.lodz.pl

 Natalia Adamiak, Krzysztof T. Krawczyk, Camille Locht, Magdalena Kowalewicz-Kulbat. (2021). Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development. Front. Immunol. 12:746235. doi: 10.3389/fimmu.2021.746235

Oświadczam, że mój udział w ww. publikacji wynosił **10%** *i obejmował* współudział w tworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu i edycji manuskryptu, autor korespondencyjny.

podpis współautora

 Krzysztof Krawczyk, Camille Locht, Magdalena Kowalewicz-Kulbat. (2022). Halophilic Archaea Halorhabdus Rudnickae and Natrinema Salaciae Activate Human Dendritic Cells and Orient T Helper Cell Responses. Front. Immunol. 13:833635. doi: 10.3389/fimmu.2022.833635

Oświadczam, że mój udział w ww. publikacji wynosił **20%**, który obejmował współudział w tworzeniu koncepcji pracy, nadzór nad realizacją badań, ocenę postępów pracy, decyzję o sekwencji badań, przygotowanie i edycję manuskryptu, autor korespondencyjny.

podpis współautora

Oświadczenie o udziale w publikacjach **Dr Camille Locht** Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR9017 – CIIL – Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France e-mail: camille.locht@pasteur-lille.fr

 Krawczyk Krzysztof, Locht Camille and Kowalewicz-Kulbat Magdalena. (2022). Halophilic Archaea Halorhabdus Rudnickae and Natrinema Salaciae Activate Human Dendritic Cells and Orient T Helper Cell Responses. Front. Immunol. 13:833635. doi: 10.3389/fimmu.2022.833635

My contribution included: the discussion of the results and the revision of the final version of the manuscript and is estimated as **10%**

..... podpis wspołautora

 Adamiak Natalia, Krawczyk Krzysztof, Locht Camille and Kowalewicz-Kulbat Magdalena. (2021). Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development. Front. Immunol. 12:746235. doi: 10.3389/fimmu.2021.746235

My contribution included: the consultancy of the manuscript preparation and revision of the final draft of the manuscript and is estimated as 5%

AA współautora

Oświadczenie o udziale w publikacjach **Mgr Natalia Adamiak** e-mail: adamiakn1@gmail.com

 Natalia Adamiak, Krzysztof T. Krawczyk, Camille Locht, Magdalena Kowalewicz-Kulbat. (2021). Archaeosomes and Gas Vesicles as Tools for Vaccine Development. Front. Immunol. 12:746235. doi: 10.3389/fimmu.2021.746235

Oświadczam, że mój udział w ww. publikacji wynosił **30%** i obejmował współudział w opracowaniu koncepcji pracy i przygotowaniu manuskryptu.

Adamel podpis współautora