

Popularnonaukowe streszczenie projektu

W roku 1990 Woese i wsp. wprowadzili pojęcie domeny i podzielili świat organizmów żywych na: *Bacteria*, *Archaea* i *Eucarya*. Archeony są to jednokomórkowe mikroorganizmy prokariotyczne, które charakteryzują się zdolnością życia w ekstremalnych warunkach. Ich komórki choć morfologicznie przypominają komórki bakterii, to jednak znacznie się od nich różnią przede wszystkim: wyjątkową budową ściany komórkowej, która w swoim składzie zamiast peptydoglikanu, posiada charakterystyczny polimer pseudomureinę, obecnością warstwy S zbudowanej z białek i/lub glikoprotein, występowaniem pęcherzyków gazowych w cytoplazmie, a także unikalnymi strukturami zewnątrzkomórkowymi, takimi jak: pile, archaella, oraz haczyki. Jedną z najciekawszych grup archeonów budzących zainteresowanie badaczy w ostatnich latach są halofile-organizmy, które wymagają do wzrostu stężenia soli wyższego niż 0,2 M NaCl. Halofile występują w środowiskach na całym świecie - od naturalnych solanek w basenach morskich do kopalni soli dzięki doskonale rozwiniętym mechanizmom adaptacji komórkowej i enzymatycznej do środowiska. Środowisko soli od lat jest wykorzystywane w haloterapii, która jest formą leczenia uzdrowiskowego, gdzie wykorzystywana jest sól w różnych postaciach. Pozytywny wpływ soli i klimatu morskiego na zdrowie ludzi stał się powodem, dla którego odtwarza się ten klimat w grotach solnych. Leczenie haloterapią przynosi ulgę w takich jednostkach chorobowych układu oddechowego jak: astma, mukowiscydoza i przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP), a także w schorzeniach skórnych, czy chorobach kardiologicznych. Nadal nieznany jest mechanizm oddziaływania halofili na organizm człowieka. Doniesienia na temat braku działania patogennego archeonów oraz opublikowane w ostatnich latach prace dokumentujące obecność halofili jako składnika mikrobiomu człowieka skłoniły do podjęcia badań, które mogłyby odpowiedzieć na pytanie w jaki sposób halofile oddziałują z komórkami układu odpornościowego człowieka. W prezentowanym projekcie zostaną zbadane dwa szczepy archeonów halofilnych. Pierwszy z nich - *Halorhabdus rudnickae*-został wyizolowany w 2016r z terenu Polski przez nasz zespół we współpracy ze światowej sławy ekspertem w dziedzinie badania drobnoustrojów ekstremalnych - prof. Miltonem S da Costa z University of Coimbra w Portugalii. Drugi szczep *Natrinema salaciae* został wyizolowany przez zespół prof. M.S da Costa w 2012r z jeziora Medee Lake z Basenu Morza Śródziemnego.

Rola komórek dendrytycznych (KD), jako profesjonalnych komórek prezentujących antygeny łączących mechanizmy odpowiedzi wrodzonej i adaptacyjnej, w modelu z udziałem archeonów halofilnych jest nadal nieznana. Dlatego celem proponowanych w projekcie badań jest zbadanie interakcji halofili z KD w dwóch niezależnych modelach *in vitro* imitujących oddziaływanie tych komórek z patogenami układu oddechowego: 1) inicjowanego działaniem superantygeny SEB *S. aureus* oraz 2) LPS *P. aeruginosa*. Oba modele zostały wybrane ze względu na istotny udział tych patogenów w rozwoju reakcji zapalnej towarzyszącej schorzeniom układu oddechowego takim jak sepsa, ciężka niewydolność oddechowa (w przypadku zakażeń o etiologii gronkowca) czy mukowiscydoza (chorzy są niezwykle podatni na kolonizację *P. aeruginosa*). W przedstawionym projekcie zostanie opracowany nowatorski model, który umożliwi wykorzystanie halofili jako modulatorów, zdolnych do „wyciszenia” reakcji zapalnej, poprzez ich zdolność indukcji „tolerogennych” właściwości KD zdolnych do wprowadzania limfocytów T w stan anergii. Badaniem obejmujemy 20 osób zdrowych krwiodawców (kobiet i mężczyzn) w wieku 25-40 lat, z kożuszków leukocytarnych zostaną wyizolowane monocyty techniką separacji magnetycznej, a następnie przy użyciu IL-4 i GM-CSF przekształcone w KD. Następnie KD zostaną poddane stymulacji supernatynem SEB *S. aureus* oraz LPS *P. aeruginosa* w obecności i nieobecności halofilnych szczepów *Halorhabdus rudnickae* oraz *Natrinema salaciae*. W pierwszym etapie zostanie zbadana ekspresja cząsteczek kostymulujących CD86, CD80, HLADR oraz CD40 oraz receptorów TLR2, TLR4 i TLR9 za pomocą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych. Następnie w supernatantach hodowlanych KD zostanie oceniona produkcja cytokin (IL-10, IL-12 i IL-23). W mieszanych hodowlach limfocytów CD4+ z autologicznymi KD stymulowanymi SEB *S.aureus*, LPS *P. aeruginosa* w obecności i nieobecności halofili zostanie określony poziom IFN-gamma, IL-10, IL-13, IL-17 i TNF- α za pomocą immunoenzymatycznego testu ELISA. Ostatni etap z udziałem linii komórek nabłonka oddechowego w modelu hodowli typu ALI pozwoli na sprawdzenie w jaki sposób prezentowane przez KD halofile wpływają na integralność połączeń międzykomórkowych nabłonka dróg oddechowych na podstawie pomiarów wartości oporu elektrycznego (TEER), spektrofluorometrycznej oceny parakomórkowej przepuszczalności FITC-dekstranu oraz barwienia immunofluorescencyjnego okludyny i ZO-1. Wyniki uzyskane w proponowanych badaniach pozwolą zrozumieć dotychczas nieznanne efekty interakcji komórek dendrytycznych z halofilami i umożliwią sprawdzenie immunomodulacyjnych właściwości halofili w modelu odpornościowej reakcji zapalnej wywołanej antygenami patogenów układu oddechowego. Uzyskana wiedza posłuży bliższemu poznaniu mechanizmów na drodze której halofile mogłyby oddziaływać jako modulatory wyciszenia reakcji zapalnych, co pozwoli na zrozumienie korzystnego oddziaływania haloterapii z uwzględnieniem roli organizmów halofilnych.