

Założenia naukowe/cel projektu: Pandemia wywołana wirusem COVID19 lub inaczej SARS-Cov-2 jest ogromnym wyzwaniem klinicznym. Infekcja może prowadzić w ostrej fazie do uszkodzeń wielonarządowych, które skutkują śmiertelnym powikłaniem określanym mianem „burzy cytokinowej” w wyniku niekontrolowanej hyperaktywacji układu immunologicznego. Infekcja COVID19 może również prowadzić do uszkodzenia przedziału komórek macierzystych, co się przedmiotem naszych badań proponowanych w złożonym wniosku. COVID19 wnika do komórki docelowej dzięki wiązaniu fuzyjnego białka Spike (SP) otoczki wirusa z receptorem enzymu konwertującego angiotensynę 2 (ACE2) oraz receptorem Toll-podobnym 4 (TLR4) na powierzchni komórki zakażanej. Nasza grupa przedstawiła kilka miesięcy temu hipotezę, popartą obecnie opublikowanymi oraz nowymi danymi, iż interakcja SP z ACE2 oraz TLR4 prowadzi do nadmiernej aktywacji inflamasomu Nlrp3, co może prowadzić do „burzy cytokinowej” oraz uszkodzenia komórek docelowych. Wykazaliśmy, że ludzkie krwiotwórcze komórki macierzyste (HSC) oraz śródbłonkowe komórki progenitorowe (EPC), podobnie jak małe komórki o fenotypie CD34⁺CD133⁺lin⁻CD45⁻ pochodzących ze szpiku kostnego, posiadają ekspresję receptorów ACE2 oraz TLR4. Wykazaliśmy również, że interakcja SP z receptorami ACE2/TLR4 na powierzchni komórek HSC i EPC prowadzi do hyperaktywacji Nlrp3, co skutkuje upośledzeniem ich potencjału proliferacyjnego i może prowadzić do lizy na drodze śmierci komórkowej – zależnej od inflamasomu czyli tzw. pyroptozy. Efekt ten został zniesiony poprzez zastosowanie drobnocząsteczkowego inhibitora Nlrp3 – MCC950. Na podstawie danych w projekcie chcemy szczegółowo ocenić wczesne oraz odległe skutki infekcji SARS-CoV-2 na przedział krwiotwórczych oraz śródbłonkowych komórek macierzystych.

Opis badań: Weryfikacji eksperymentalnej ocenimy: **1. Wczesne konsekwencje** nadmiernej aktywacji inflamasomu Nlrp3 w przedziale HSC oraz EPC przy wykorzystaniu białka Spike oraz pseudowirusa COVID19. Ocenimy wpływ infekcji na potencjał krwiotwórczy oraz angiopoetyczny w modelach *in vitro* oraz *in vivo*. Przy wykorzystaniu technik OMICS ocenimy profil transkrypcyjny oraz proteomiczny po ekspozycji na białko Spike oraz pseudowirusa COVID19 w badanych komórkach macierzystych. **2. Późne konsekwencje** interakcji białka SP z receptorem ACE2 na poziom aktywacji inflamasomu Nlrp3 w HSC oraz EPC przy wykorzystaniu modelu myszy transgenicznym z ekspresją ludzkiego białka ACE2. Ocenie zostanie poddana również hipoteza o możliwym zakażeniu HSC oraz EPC i obecności SARS-CoV-2 w formie utajonej w tych komórkach. Te ostatnie badanie zostaną przeprowadzone na modelu zwierzęcym oraz na podstawie oceny materiału biologicznego pobranego od pacjentów po przebytej infekcji COVID19. **3.** Ocenimy również skuteczności inhibitorów inflamasomu z wykorzystaniem modeli *in vitro* oraz *in vivo* jako nowej metody zapobiegania konsekwencjom zakażenia COVID19.

Oczekiwane rezultaty: W składanym wniosku proponujemy pionierskie badania mające ocenić wpływ infekcji COVID19 na przedział komórek macierzystych układu krwiotwórczego oraz śródbłonków naczyń. Ma to ogromne znaczenie zarówno podczas ostrej fazy infekcji, jak i ewentualnych skutków odległych zakażenia. W literaturze jest bowiem bardzo mało danych dotyczących wpływu infekcji na komórki macierzyste. Badania planujemy prowadzić na populacjach komórek HSC oraz EPC izolowanych z dorosłych tkanek. Zweryfikujemy hipotezę, że do uszkodzenia komórek macierzystych na wczesnym etapie infekcji może dochodzić w odpowiedzi na interakcje SP-ACE2 oraz SP-TLR4 indukując nadmierną aktywację inflamasomu Nlrp3, co prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia komórek macierzystych w mechanizmie pyroptozy. W konsekwencji prowadzi to do uwalniania szeregu alarmin oraz cytokin, prowadząc do „burzy cytokinowej” w organizmie pacjenta. Późne powikłania zakażenia COVID-19 mogą być natomiast związane z nieodwracalnymi uszkodzeniami niedojrzałych HSC i EPC, a także wynikać z obecności wirusa SARS-CoV-2 w stanie latencji w przedziale długożyjących zainfekowanych komórek macierzystych. W proponowanej aplikacji ocenimy również potencjalne strategie łagodzenia nadmiernej aktywacji inflamasomu w odpowiedzi na interakcję SP-ACE2 i SP-TLR4 - jako potencjalną strategię mającą na celu ochronę komórek macierzystych w infekcji COVID-19.