

## Zapalne rodzaje regulowanej śmierci komórkowej w infekcjach wirusami oddechowymi

Zainfekowane komórki stosują różne strategie hamowania rozprzestrzeniania się wirusa. Po wykryciu wirusa komórki mogą wydzielić interferony informujące sąsiednie komórki o infekcji, dając im czas na przygotowanie się na rozprzestrzeniający się patogen. Zaalarmowana komórka może próbować strawić wirusy na drodze autofagii lub aktywować program autodestrukcji, czyli programowanej śmierci. Może to być niezapalna apoptoza lub prozapalna, związana z pęknięciem błony komórkowej, pyroptoza lub nekroptoza. Śmierć komórkowa może być również wywołana przez komórki NK (ang. natural killer), które rozpoznają i eliminują zainfekowane lub nowotworowe komórki. Wirusy, dzięki swoim białkom niestrukturalnym, mogą przeciwdziałać autofagii i apoptozie lub wykorzystać te procesy na swoją korzyść. Złożone interakcje między komórką gospodarza a wirusem mogą ostatecznie prowadzić do prozapalnej śmierci komórkowej.

Różne rodzaje prozapalnej śmierci komórkowej zostały stosunkowo dobrze poznane z osobna. Jednakże ich wzajemne interakcje oraz interakcje z mechanizmami apoptozy, które ostatecznie determinują los komórki, nie są dostatecznie zrozumiane. Rozróżnienie między rodzajami śmierci jest istotne, ponieważ aktywacja śmierci prozapalnej ma potencjał immunogeny i może prowadzić z jednej strony do rozwoju skutecznej odpowiedzi adaptacyjnego układu odpornościowego, a z drugiej do szkodliwego ogólnoustrojowego stanu zapalnego.

W projekcie użyjemy dwóch wirusów układu oddechowego, RSV i grypy typu A, oraz komórek nabłonka dróg oddechowych w celu zbadania interakcji między komórką gospodarza a wirusem oraz komórką NK a zainfekowaną komórką, które prowadzą do różnych rodzajów śmierci komórkowej: niezapalnej lub prozapalnej. Naszym celem jest wyjaśnienie wzajemnych relacji między apoptozą a ścieżkami prozapalnymi zarówno na poziomie pojedynczej komórki, jak i na poziomie zainfekowanej populacji komórek. Będziemy badać, jakie czynniki determinują decyzje o losie komórki i wpływają na proporcję komórek wykazujących określony rodzaj śmierci. Sprawdzimy również, czy wspomniane rodzaje śmierci wzajemnie się wykluczają czy raczej pojedyncza komórka może wykazywać połączenie szlaków apoptozy i śmierci prozapalnej.

Wykorzystamy techniki mikroskopowe analizy pojedynczych komórek, w tym obserwacje przyżyciowe różnych typów śmierci poszczególnych komórek w zakażonej populacji komórek. Interakcje międzykomórkowe będą badane przy użyciu urządzeń mikroprzepływowych opartych na kropelkach, co umożliwi przeprowadzenie tysięcy równoległych eksperymentów w izolowanych objętościach (jak na rysunku poniżej). Wykorzystamy opartą na uczeniu maszynowym analizę obrazów uzyskanych z przyżyciowych obserwacji mikroskopowych, aby rozróżnić rodzaje śmierci komórkowej na podstawie zmian w morfologii komórek i aktywacji markerów fluorescencyjnych. Aby zweryfikować spójność naszych wyników i lepiej zrozumieć współzależności zbadanych mechanizmów regulacyjnych, skonstruujemy matematyczne modele wzajemnych oddziaływań szlaków śmierci na poziomie pojedynczej komórki i populacji komórek. Nasze badania, prowadzone we współpracy z wiodącym specjalistą zajmującym się pyroptozą, profesorem Davidem Brough z Uniwersytetu w Manchesterze, zaowocują postępem w zrozumieniu fundamentalnych procesów kontrolujących szlaki śmierci komórkowej i umożliwią lepsze planowanie terapii przeciwwirusowych.

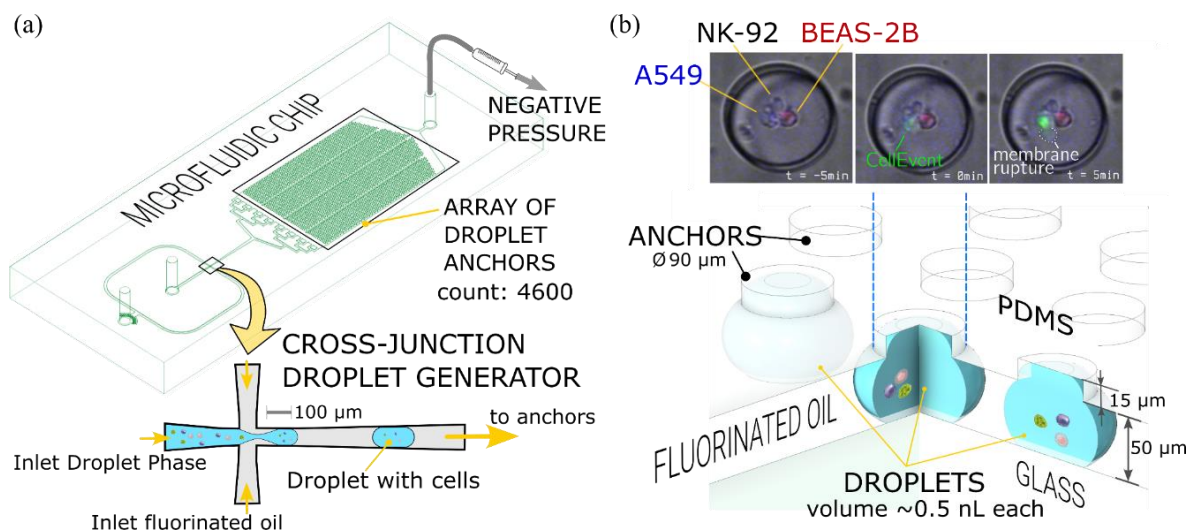


Fig.1 Układ mikroprzepływowy pozwala na unieruchomienie ponad 4000 kropli i obserwacje interakcji komórek umieszczonych w kropelkach. (a) Schematyczny widok naszego układu. (b) U góry: wybrane zdjęcia kropli zawierającej trzy komórki: komórka linii NK-92 (niewybarwiona), nienowotworowa BEAS-2B (barwiona na czerwono) i nowotworowa A549 (barwiona na niebiesko), pokazujące śmierć komórki nowotworowej wywołaną przez komórkę NK-92. Pojawienie się zielonego koloru (CellEvent) informuje o inicjacji śmierci komórkowej, po której następuje pęknięcie błony komórkowej, sugerujące śmierć komórkową typu pyroptozy. (b) Na dole: widok kropli zakotwiczonej w dołku.