

W ostatnich latach w Europie i USA obserwowana jest gwałtowna ekspansja chorób odkleszczowych. Do najistotniejszych przyczyn tego zjawiska, obok stopniowego ocieplania się klimatu, z pewnością zaliczyć można brak skutecznych środków umożliwiających zwalczanie kleszczy oraz ograniczających ich zdolności do przenoszenia czynników patogennych, wynikający z bardzo słabej znajomości tych zagadnień. Najpowszechniej występującym w Europie gatunkiem kleszcza jest *Ixodes ricinus*. Jest on wektorem dla drobnoustrojów powodujących groźne choroby, takie jak borelioza, odkleszczowe zapalenie mózgu, babeszjoza, anaplazmoza czy riketsjoza. Borelioza, powodowana przez grupę bakterii *Borrelia burgdorferi sensu lato*, jest najczęstszymi z odkleszczowych chorób ludzi. Celem niniejszego projektu jest poznanie warunków i podstaw dwóch istotnych procesów związanych z rozprzestrzenianiem się kleszczy powodujących choroby. Procesy te to kolonizacja kleszcza *I. ricinus* przez bakterie z rodzaju *Borrelia* oraz transfer tych bakterii z kleszcza do organizmu kręgowca.

Do kolonizacji kleszcza przez *B. burgdorferi* dochodzi podczas jego erowania na zakażonym kręgowcu. W procesie tym uczestniczy powierzchniowe białko bakterii OspA (ang. Outer Surface Protein A), które oddziałuje z białkiem TROSPA (ang. Tick Receptor for Outer Surface Protein A) obecnym na powierzchni komórek nabłonka w jelicie kleszcza. Para białek TROSPA i OspA stanowi pierwszy obiekt badań niniejszego projektu. Podstawowa funkcja białka TROSPA w organizmie *I. ricinus* jest nieznana, podobnie jak jego struktura oraz sposób oddziaływania z powierzchniowym białkiem OspA *B. burgdorferi*. W trakcie wcześniejszych badań wykazaliśmy, że rekombinowane białko TROSPA oraz jego mutanty produkowane w *E. coli* zachowują zdolność do oddziaływania z białkami OspA pochodzącymi z trzech różnych gatunków *Borrelia*. Doniesienia literaturowe mówią o tym, że TROSPA jest również zaangażowana w proces kolonizacji kleszcza przez chorobotwórczego pierwotniaka *B. bigemina*. W trakcie wcześniejszych badań ustaliliśmy także, że białko TROSPA posiada fragment kotwiczący w błonie komórkowej. Ponadto, prowadzone przez nas prace jasno wskazują, że białko TROSPA należy do białek inherentnie nieuporządkowanych (IDP). Łańcuch polipeptydowy białek IDP w warunkach natywnych nie przyjmuje określonej struktury przestrzennej, w przeciwieństwie do białek o sztywnej strukturze. Białka te mogą jednak uformować konkretną strukturę w odpowiedzi na zmiany otoczenia, czy na skutek związania się z partnerami, np. innymi białkami. Brak konkretnej struktury pozwala tym białkom IDP na wiązanie się z różnymi białkami i innymi cząsteczkami, do których są one w stanie dopasować swój kształt. Poznanie reguł porządkowania się IDP stanowi duże wyzwanie dla współczesnej biologii strukturalnej zwłaszcza, że stanowi one około 20-30% wszystkich białek eukariotycznych. IDP pełni w organizmach bardzo istotne funkcje, m.in.: białek opiekuńczych, receptorowych czy sygnałowych w procesach, w których dochodzi do oddziaływania z innymi makrocząsteczkami. Planowane badania nad procesem porządkowania się struktury TROSPA oraz jego mutantów podczas tworzenia kompleksu z OspA mają na celu określenie, czy nieuporządkowany charakter TROSPA umożliwia kolonizowanie kleszcza przez różne patogeny. Jednocześnie prace te doprowadzą do lepszego poznania molekularnych mechanizmów i podstaw procesów związanych z porządkowaniem się białek IDP.

Pobieranie krwi przez kleszcza trwa kilka dni; jest to okres wystarczający, aby u kręgowca wystąpiła odpowiedź ze strony układu immunologicznego. Kleszcze z rodzaju *Ixodes* i *Rhipicephalus* w stanie niwelować odpowiedź dzięki wydzielanym przez gruczoły linowe i wstrzykiwanym do organizmu gospodarza kilkuset czynnikom przeciwzakrzepowym, rozkurczającym naczynia krwionośne, przeciwwzapalnym oraz immunomodulującym. Krętki z rodzaju *Borrelia* posiadły zdolność wykorzystywania niektórych z tych czynników do własnych celów. Jednym z takich czynników jest białko *I. ricinus* Iric-1, należące do rodziny kleszczowych białek Salp15, zdolne do wiązania białka powierzchniowego OspC *B. burgdorferi*. Krętki *Borrelia*, po związaniu na swej powierzchni białka Iric-1, stają się „niewidzialne” dla układu odpornościowego kręgowca, dzięki czemu mogą efektywnie migrować z linianek kleszcza do krwiobiegu kręgowca. W ostatnim czasie wykazano, że gruczoły linowe kleszczy z rodzaju *Ixodes* wydzielają całą gamę białek z rodziny Salp15. Nie wiadomo, które z nich zaangażowane są w transfer patogennych bakterii z kleszcza do kręgowca, ponieważ struktura przestrzenna i sposób, w jaki białka z rodziny Salp15 tworzą kompleks z białkami OspC czy z czynnikami obecnymi we krwi kręgowców, są nieznane. W ramach niniejszego projektu planujemy badanie powinowactwa serii wariantów Salp15 (w tym Iric-1) do białka OspC. Białka kleszczowe z rodziny Salp15 zostaną wybrane do badań na podstawie analizy najnowszych danych literaturowych dotyczących transkryptomu *I. ricinus*. Uzyskane dane o strukturze kompleksów Salp15--OspC i białek Salp15 niezdolnych do wiązania OspC zostaną następnie porównane. W ten sposób zamierzamy określić funkcjonalnie zakonserwowane elementy strukturalne rodziny kleszczowych białek Salp15, związane z transmisją patogenu do gospodarza.

W trakcie wcześniejszych badań opracowana została metoda wydajnej produkcji białek TROSPA, OspA i OspC (pochodzących z różnych gatunków *Borrelia*) oraz Iric-1, jak również ich pochodnych, w systemie bakteryjnym. Opracowano także metody produkcji białek kleszcza w systemie owadzi, który pozwala na uzyskanie rekombinowanych białek TROSPA i Salp15 o bardzo zbliżonej strukturze do białek występujących w organizmie kleszcza. Produkowane przez nas rekombinowane białka zachowują zdolność do tworzenia kompleksów TROSPA--OspA i Iric1--OspC, a zatem są odpowiednio do zaplanowanych w projekcie badań strukturalnych.

Uzyskane w niniejszym projekcie wyniki znacząco wpłyną na rozwój wiedzy dotyczącej molekularnych procesów związanych z pasożytnictwem kleszczy i prewencją chorób odkleszczowych. Obecnie znajomość opisanych zagadnień jest słaba, a wyniki uzyskane podczas realizacji tego projektu staną się źródłem cennych publikacji.