

Receptory Toll-like (TLRs), do których należy TLR3 (Toll-like receptor 3), są rodziną białek związanych z błonami komórkowymi. Każdy patogen (bakteria, wirus, grzyb etc.) posiada swoistą molekularną wizytówkę, którą legitymuje się wobec układu odpornościowego. Jest to cząsteczkowy wzorzec, którego rozpoznanie umożliwia identyfikację patogenu na wczesnym etapie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. TLRs pełnią w organizmie bardzo ważną rolę – rozpoznają wspomniane „identyfikatory”, inicjując stosowną reakcję na wtargnięcie czynnika zakaźnego do ustroju gospodarza, odgrywają zatem rolę molekularnych kontrolerów, ustalających tożsamość intruzów. Takim identyfikatorem dla TLR3 jest dwuniciowy kwas rybonukleinowy (dsRNA), pośredniczący w powielaniu genomu (replikacji) wielu wirusów. TLR3 należy do podrodziny TLRs występujących w endosomach, pęcherzykach znajdujących się wewnątrz komórki. Po rozpoznaniu dsRNA, TLR3 uruchamia kaskadę sygnałów prowadzącą do produkcji interferonów typu I i cytokin prozapalnych. Związki te aktywują odpowiedź przeciwwirusową gospodarza.

TLR3 ulega ekspresji m. in. w komórkach mózgu – astrocytach, oligodendrocytach, neuronach i komórkach mikroglejowych. Badania genetyczne zwierząt i ludzi z niedoborem funkcjonalnego receptora pozwoliły stwierdzić, że **TLR3 ma kluczowe znaczenie w obronie organizmu przed zakażeniem wirusem opryszczki (herpes simplex virus 1, HSV-1)**, a szczególnie zapaleniem mózgu wywoływanym przez ten wirus. Wykazano także, że prawidłowe funkcjonowanie TLR3 jest niezbędne dla skutecznej odpowiedzi przeciw HSV-1 w centralnym układzie nerwowym (CUN). Uzasadnione jest szczegółowe poznanie mechanizmów immunologicznych regulujących kontrolę zakażenia HSV w CUN.

W endosomach, miejscu występowania TLR3, zlokalizowany może być również kompleks białkowy ESCRT-0 (Endosomal sorting complex required for transport-0), składający się z Hrs i STAM, swoisty inżynier odpowiedzialny za przebudowę i cyrkulację błon komórkowych, z których zbudowane są właśnie m. in. endosomy. Ponadto, kieruje on do tychże endosomów białka oznaczone ubikwityną („metką” predestynującą je do degradacji) i/lub rozmaite receptory komórkowe.

Dotychczasowe badania nad ESCRT-0 wykazały, że TLR3 może precypitować ze STAM i że wyciszenie ekspresji TLR3 obniża ekspresję STAM i Hrs w mysich komórkach mikroglejowych linii C8D1A. Dowiedziono również, że traktowanie komórek syntetycznym ligandem (cząsteczką aktywującą) TLR3 – poly(I:C) (polyinosinic-polycytidylic acid), prowadzi do fosforylacji i aktywacji kinazy Syk, która z kolei aktywuje Hrs. Jeśli kinaza pośredniczy w aktywacji ESCRT-0 przez TLR3 (czyli jeśli aktywowany receptor indukuje jej fosforylację), wówczas aktywacja kompleksu przez TLR3 może prowadzić do transportu ESCRT-0 do endosomów w komórce. Dotychczasowe wyniki badań pozwoliły przyjąć za nadrzędny cel projektu **scharakteryzowanie molekularnych mechanizmów, przez które ESCRT-0 reguluje przeciwwirusowe działanie TLR3 po jego związaniu z odpowiednim ligandem**. Doświadczenia prowadzone są na wybranej linii komórkowej, gdyż ludzka linia komórek mikrogleju, niemająca pochodzenia nowotworowego, jest obecnie niedostępna. TLR3 ulega ekspresji w komórkach mikrogleju człowieka, jak i myszy i należy do konserwowanych ewolucyjnie białek: wśród różnych gatunków wykazuje wiele podobieństw strukturalnych oraz funkcjonalnych. Przyjęto, że mysz model komórkowy będzie wiernie i dokładnie odzwierciedlał mechanizmy regulacyjne dla TLR3 w komórkach ludzkich.

W projekcie planowane jest określenie profilu fosforylacji i ubikwitynacji Hrs/STAM po stymulacji TLR3, a także dokładne zbadanie sprzęgania TLR3 z ubikwityną. Ważnym krokiem będzie scharakteryzowanie regulacji ekspresji TLR3 przez ESCRT-0, oraz ustalenie, w jaki sposób wyciszenie ekspresji genów Hrs i/lub STAM wpływa na syntezę czynników transkrypcyjnych uruchamiających odpowiedź przeciwwirusową w komórce. Istotny będzie pomiar aktywności kinazy Syk w komórkach, jej wyciszenie i precyzyjna ocena roli w aktywacji Hrs/STAM. Ostatnim celem projektu będzie określenie, czy i w jaki sposób zakłócenie funkcjonowania Hrs/STAM wpływa na odpowiedź przeciwwirusową, w której uczestniczy TLR3. Badania będą przeprowadzone z udziałem konstruktów – wirusa HSV-1 połączonego z fluorescencyjnym białkiem GFP, oceniana będzie replikacja wirusa i aktywacja TLR3 przez pomiar poziomu interferonów typu I.

Wyniki otrzymane dzięki powyższym badaniom będą pierwszym krokiem w ocenie roli ESCRT-0 we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w CUN po aktywacji TLR3 swoistym ligandem. Umożliwią oszacowanie, w jakim stopniu ESCRT-0 reguluje funkcjonowanie TLR3 oraz czy interakcja białek wymaga przemieszczenia ESCRT-0 do endosomów. Wiedza wynikająca z powyższych badań pozwoli zidentyfikować szlaki sygnalizacyjne, mogące mieć znaczenie w odpowiedzi przeciwwirusowej, a zatem również znaczenie terapeutyczne. Dokładne poznanie szlaków sygnałowych związanych z TLR3 może być kluczowym elementem w opracowaniu możliwości modulowania sygnalizacji przez ten receptor u ludzi lub zwierząt, w szczególności posiadających defekty w powyższych szlakach sygnałowych. Proponowane badania mogą być pomocne w uzyskaniu postępowych narzędzi naukowych dla międzynarodowych zespołów badawczych, zaś otrzymane dane mogą zainteresować grupę naukowców badających możliwości terapeutyczne w zakażeniach wirusowych.