



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-0036-10

Štúdium interakcií medzi hosťiteľom a patogénom na objasnenie neuroinvazívnych mechanizmov na proteomickej úrovni.

Zodpovedný riešiteľ **doc. MVDr. Mangesh Bhide, PhD.**

Príjemca **Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Laboratórium biomedicínskej mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

2.

3.

4.

5.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Grupo de Genomica y Mejora Animal, Departamento de Genetica, Universidad de Cordoba, Španielsko

2. Bioinformatics & Medical Informatics Team, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Grécko

3. Institute for Veterinary medical research, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Maďarsko

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

1.

2.

3.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Pulzova, L., Kovac, A., Mucha, R., Mlynarcik, P., Bencurova, E., Madar, M., Novak, M., Bhide, M.: OspA-CD40 dyad: ligand-receptor interaction in the translocation of neuroinvasive *Borrelia* adheres across the blood brain barrier. Nature Scientific Reports 2011, 1:86 - CITOVANÉ 4 krát

2. Bencurova, E., Mlynarcik, P., Bhide, M.: An insight into the ligand-receptor interactions involved in the translocation on pathogens across blood-brain barrier. FEMS immunology and

medical microbiology. ISSN 0928-8244, 2011, vol. 63, č. 3, s. 297-318. - CITOVANÉ 8 krát

3. Bhide M., Bhide K., Pulzova L., Madar M., Mlynarcik P., Bencurova E., Hresko S., Mucha R.: Variable regions in the sushi domains 6-7 and 19-20 of factor H in animals and human lead to change in the affinity to factor H binding protein of *Borrelia*. *J Proteomics*. 2012 Jul 19;75(14):4520-8. Epub 2012 Apr 24. - CITOVANÉ 1 krát

4. Pulzova L., Mlynarcik P., Bencurova E., Bhide M.: It Takes Two to Tango: Protein-Protein Interactions in the Translocation of Pathogens across Blood-Brain Barrier. Nova Publishers, USA (2012) – ISBN- 978-1-62100-812-5 - CITOVANÉ 1 krát

5. Bhide, M., Natarajan, S., Hresko, S., Aguilar, C., Bencurova, E.: Rapid in vitro protein synthesis pipeline: a promising tool for cost-effective protein array design. *Molecular BioSystems* (2014), 10(6), 1236-1245. - CITOVANÉ 1 krát

Uplatnenie výsledkov projektu

Zistili sme, že adhézia borélie na endotelové bunky hematoencefalickej bariéry je sprostredkovaná proteínom OspA u neuroinuzívneho kmeňa *Borrelia garinii* SKT-7.1. Určili sme presnú doménovú sekvenciu a zodpovedné aminokyseliny, ktoré túto interakciu spôsobujú. Blokováním tejto sekvencie sa zabezpečí strata schopnosti adhézie borélie na endotelové bunky hematoencefalickej bariéry, ktorá je sprostredkovaná receptorom CD40. Borélia by teda neprechádzala do mozgu, ale ostávala v krvi, kde je vysoká koncentrácia komplementových proteínov. Neuroborelióza je ťažko liečiteľným ochorením najmä z dôvodu, že antibiotiká nie sú účinné proti boréliám ukrývajúcim sa centrálnom nervovom systéme. Preto je funkčná doména OspA, ktorá je zodpovedná za interakciu s CD40, podľa našich výsledkov vhodným kandidátom pre vývoj vakcíny proti neuroborelióze. Okrem toho sme zistili, že francisela sa translokuje cez hematoencefalickú bariéru pomocou adhézie proteínov PilE4 na receptor ICAM-1, pričom variácia len dvoch aminokyselín spôsobuje stratu afinity PilE4 na ICAM-1. Rovnako ako v prípade OspA, aj PilE4 sa teda javí ako potenciálne vhodný kandidát pre ďalší výskum, najmä ako kandidát pre vakcínu proti neuroinuzívnej forme tularémie. Okrem toho sme prispeli k poznaniu patogenézy borélie a francisely v krvnom riečišti a objasnili sme mechanizmus komplementovej rezistencie týchto patogénov na základe komplement-viažucich a mimikujúcich proteínov. Identifikované proteíny môžu byť použité v prospech prípravy vakcín voči neuro- a neneuroinuzívnych kmeňov borélií a francisel.

CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Viacero patogénov využíva komplement regulačné proteíny (KRP) na prežitie v krvi. Prvým cieľom projektu bola detekcia proteínov *Borrelia* a *Francisella* viažucich sa na KRP. Bolo testovaných 17 kmeňov borélií a 6 kmeňov francisely a ich schopnosť interagovať s KRP: C1 inhibítor, C4Bp, vitronektín (VTN), faktor H a faktor I, a mimikovať KRP: CD35, CD46 a CD59. Zistili sme, že 4 kmene francisely sú schopné viazať C1inh, dva kmene majú afinitu k VTN a dva zdieľajú homológny motív k CD59. 11 kmeňov borélií viazalo C1inh, 13 kmeňov bolo schopných viazať C4Bp, 9 kmeňov preukázalo afinitu k VTN a 11 kmeňov na svoj povrch viaže faktor H. Homológne motívy boli nájdené u 3 kmeňov pre CD46 a šiestich kmeňov pre CD59. Následne bola časť týchto bakteriálnych proteínov identifikovaná, konkrétne 6 proteínov s afinitou k C4Bp, 5 proteínov s afinitou k faktoru H a jeden proteín s afinitou k VTN, ako aj 2 proteíny francisely interagujúce s VTN. V tretej časti sme analyzovali bakteriálne a hostiteľské ligandy, ktoré sprostredkujú adhéziu *Borrelia* a *Francisella* na mozgové mikrovaskulárne endotelové bunky (MMEB). Zistili sme, že za túto adhéziu je zodpovedná druhá doména CD40 a OspA proteín u borélie, pričom aminokyseliny liganda 149, 165, 172, 187 a 192 sú pre túto väzbu kľúčové. U francisely sú PilE4 a OmpA adhezími pre receptor ICAM-1 na povrchu MMEB a len doména Ig-like C2-type 1 sprostredkuje túto adhéziu. V poslednej časti projektu sme zistili, že OspA, PilE4 a OmpA ovplyvňujú signálne dráhy bunky a spôsobujú remodeláciu cytoskeletónu potrebnú na translokáciu patogéna cez

hematoencefalickú bariéru (HEB). Taktiež sme experimentálne potvrdili, že blokovaním CD40 a ICAM-1 sme schopný zabrániť translokácii borélie a francisely cez HEB.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku
(max. 20 riadkov)

Numerous pathogens exploit complement regulatory proteins (CRP) to block complement attack and survive in the blood. The first aim of the study was to detect proteins of *Borrelia* and *Francisella*, which bind or mimic CRPs like C1 inhibitor, C4BP, Vitronectin (VTN), factor H, factor I, CD35, CD46 and CD59. Among 17 *Borrelia* and 6 *Francisella* strains, we found that 4 strains of *Francisella* bound C1inh on their surface, two strains bound VTN and two shares homologous motif of CD59. 11 strains of *Borrelia* bound C1inh, while 13 strains bound to C4Bp, nine strains have affinity to VTN and 11 strains bound factor H on their surface. CD46 homologous motif was found in three borrelial strains and CD59 homologous motif in six strains. We were able to identify some of CRP binding or mimicking proteins. 6 C4BP binding proteins, five factor H binding proteins and three VTN binding proteins were identified and deeply characterized. In the third part, we analyzed bacterial and host proteins responsible for the adhesion of *Borrelia* and *Francisella* to brain microvascular endothelial cells (BMEC). We found that the second domain of CD40 and five amino acids OspA (149,165,172,187 and 192) are crucial for this adhesion. In case of *Francisella*, PilE4 and OmpA are adhesins that interact with ICAM-1 of BMEC, and Ig-like C2-type 1 domain of ICAM-1 is important in the ligand-receptor interaction. In the last part of the project, we found that OspA, PilE4 and OmpA modulate the signalling pathways in BMEC, which cause remodulation of the cytoskeleton necessary for the translocation of pathogen across the blood brain barrier (BBB). We also showed experimentally that by blocking CD40 and ICAM-1 translocation of the *Borrelia* and *Francisella* across BBB can be hindered.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

doc. MVDr. Mangesh Bhide, PhD.

V Košiciach 15.10. 2014

Štatutárny zástupca príjemcu

prof. MVDr. Emil Pilipčiniac, PhD.

V Košiciach 15. 10. 2014

.....
podpis zodpovedného riešiteľa

.....
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu