

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-14-0218**

Odhalenie ligand-receptor interakcií zúčastňujúcich sa invázie patogénov do centrálného nervového systému a vývoj cielej terapeutickú stratégiu voči neuroinfekciám

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

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

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

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

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

- Faculty of veterinary medicine, University of Zagreb, Croatia (spoluautori v publikáciách ADC2, ADC3, ADC4, ADC5, ADC11, ADC13).
- Department of Bioinformatics, Biocenter, Am Hubland, D-97074 Wuerzburg, Germany (spoluautori v publikácii ADC16).
- Genomics Core Facility, CEITEC Masaryk University, Brno, Czech Republic (RNA sekvenovanie bolo realizované v spolupráci s Dr. Borisom Tichým; poďakovanie je uvedené v našej publikácii ADC17).
- University of Queensland, Australia (bio-layer interferometria bola realizovaná v laboratóriu prof. Kirilla Alexandrova Mgr. Ľubošom Čomorom počas jeho dvojmesačného výskumného pobytu; poďakovanie je uvedené v našej publikácii ADC10).
- EMBL Heidelberg, BioComputing Unit, Meyerhofstr, Heidelberg, Germany (spoluautori v publikácii, spolupráca s Dr. Thomasom Dandekarom pri výpočtovej analýze proteín-proteín interakcií, ADC17).
- Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, Berlin, Germany (spolupráca v oblasti metódy fágového displeja).
- Pfizer-University of Granada-Junta de Andalucía Centre for Genomics and Oncological Research (GENYO), Granada, Spain (spoločný ERA-NET projekt a spolupráca v rámci konjugácie nanoprotílátok – EuroNanoMed III).
- Institute for Veterinary Medical Research, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary (niektoré kmene *Borrelia* boli získané v spolupráci s maďarským partnerom).
- University medical hospital, University of Olomouc, Czech republic (v spolupráci s

partnerom z Olomouca boli získané neuroinvazívne patogény ako Neisseria a Streptococcus izolované z ľudských pacientov; publikácie ADC14, ADC15).

Referencie

- ADC2 Guillemain et al. Mol. BioSyst., 2016,12, 2036-2046. (IF 2.75)
ADC3 Galan et al. Mol. BioSyst., 2016,12(8), 2342-2358 (IF 2.75)
ADC4 Horvatić et al. Mol. BioSyst., 2016,12(8), 2373-2384. (IF 2.75)
ADC5 Kuleš et al. Mol. BioSyst., 2016,12, 2680-2694 (IF 2.75)
ADC10 Čomor et al. Microbial Cell Factories (2017) 16:13 DOI 10.1186/s12934-017-0630-z (IF 4.29)
ADC11 Kuleš et al. Vector-Borne and Zoonotic Diseases (2017) 17(5):285-296. doi: 10.1089/vbz.2016.2074. (IF 1.93)
ADC13 Horvatić et al. Host-Pathogen Interactions, Methods in Mol. Biology book series 83-96. doi: 10.1007/978-1-4939-7604-1_9. ISSN: 1064-3745. (2017)
ADC14 Káňová et al. Frontiers in Microbiology, 9., 2294 (2018) DOI: 10.3389/fmicb.2018.02294. (IF 4.019)
ADC15 Jiménez-Munguía et al. Scientific Reports, volume 8, article number: 5231 (2018) DOI:10.1038/s41598-018-23485-1. Impakt faktor – 4.609
ADC16 Mol Omics. 2018 Oct 8;14(5):330-340. doi: 10.1039/c8mo00130h.
ADC17 SUBMITTED: Káňová et al. Transcriptome analysis of human brain microvascular endothelial cells response to N. meningitidis and its antigen MafA using RNA-seq. Scientific Reports (IF 4.609)

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

Expresná kazeta na prípravu proteín-mRNA ribozómového komplexu. Číslo – C12N 15/00 (50080-2016), Vestník Úradu priemyselného vlastníctva SR 6-2018-SK (http://personal.uvlf.sk/personal-pages/default_data/tree/download_file.php?file=/personal-pages/mangesh.bhide/share/APVV_report/2019/ribozom_express_casette.pdf)

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

Kapitola v knihe

1. ADC13. A Horvatić, J Kuleš, N Guillemain, F Martinković, I Štimac, V Mrljak, M Bhide: Surface Proteome Biotinylation Combined with Bioinformatic Tools as a Strategy for Predicting Pathogen Interacting Proteins. Host-Pathogen Interactions, 83-96.

Články v impaktovaných časopisoch

1. ADC14. Evelína Káňová, Irene Jiménez-Munguía, Petra Majerová, Zuzana Tkáčová, Katarína Bhide, Patrícia Mertinková, Lucia Pulzová, Andrej Kováč, Mangesh Bhide: Deciphering the interactome of Neisseria meningitidis with human brain microvascular endothelial cells. In: Frontiers in Microbiology, 9., 2294 (2018) DOI: 10.3389/fmicb.2018.02294. Impakt faktor – 4.019

2. ADC15. Irene Jiménez-Munguía, Lucia Pulzová, Evelína Káňová, Zuzana Tomečková, Petra Majerová, Katarína Bhide, Ľuboš Čomor, Ivana Širochmanová, Andrej Kováč, Mangesh Bhide: Proteomic and bioinformatic pipeline to screen the ligands of S. pneumoniae interacting with human brain microvascular endothelial cells. In: Scientific Reports, volume 8, article number: 5231 (2018) DOI:10.1038/s41598-018-23485-1. Impakt faktor – 4.609

3. ADC16 Elena Bencurova, Shishir K. Gupta, Ehsan Oskoueian, Mangesh Bhide, Thomas Dandekar. Omics and bioinformatics applied to vaccine development against Borrelia. Mol Omics. 2018 Oct 8;14(5):330-340. doi: 10.1039/c8mo00130h.

4. ADC10. L. Comor, S. Dolinska, K. Bhide, L. Pulzova, I. Jimenez-Munguia, E. Bencurova, Z. Flachbartova, L. Potocnakova, Ev. Kanova, M. Bhide. Joining the in vitro immunization of

alpaca lymphocytes and phage display: rapid and cost effective pipeline for sdAb synthesis. *Microbial Cell Factories* (2017) 16:13 DOI 10.1186/s12934-017-0630-z. IF – 4.29

5. ADC1. Flachbartova Z., Pulzova L., Bencurova E., Potocnakova L., Comor L., Bednarikova Z., Bhide M.: Inhibition of multidrug resistant *Listeria monocytogenes* by peptides isolated from combinatorial phage display libraries. *Microbiological Research* 188 (2016) 34–41. IF – 4.1

6. ADC2. Guillemin, N., Horvatic, A., Kules, J., Galan, A., Mrljak, V., Bhide, M.: Omics approaches to probe markers of disease resistance in animal sciences. *Mol. BioSyst.*, 2016,12, 2036-2046. IF – 2.75

7. ADC3. Asier Galan, Lubos Comor, Anita Horvatic, Josipa Kules, Nicolas Guillemin, Vladimir Mrljak and Mangesh Bhide: Library-based display technologies: where do we stand?. *Mol. BioSyst.*, 2016,12(8), 2342-2358, IF – 2.75

8. ADC4. Anita Horvatić, Josipa Kuleš, Nicolas Guillemin, Asier Galan, Vladimir Mrljak, Mangesh Bhide: High-throughput proteomics and fight against pathogens. *Mol. BioSyst.*, 2016,12(8), 2373-2384. IF – 2.75

9. ADC5. Josipa Kuleš, Anita Horvatić, Nicolas Guillemin, Asier Galan, Vladimir Mrljak, Mangesh Bhide: New approaches and omics tools for mining of vaccine candidates against vector-borne diseases. *Mol. BioSyst.*, 2016,12, 2680-2694. IF – 2.75

10. ADC7. Pulzová, L., Flachbartová, Z., Bencúrová, E., Potocnakova, L., Comor, L., Schréterová, E., Bhide, M.: Identification of B-cell epitopes of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein C by screening a phage-displayed gene fragment library. *Microbiol Immunol.* 2016 Sep 13. doi: 10.1111/1348-0421.12438. IF – 1.44

11. ADC8. Lenka Potočňáková, Mangesh Bhide, Lucia Borszéková Pulzová: An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction. *Journal of Immunology Research* Volume 2016 (2016), Article ID 6760830. IF – 3.4

Pozvané prednášky

1. AFG2. M. Bhide. From PCR to protein: Protein synthesis pipelines. 10 th CEEPC 2016. ISBN 978-963-7067-33-4. p. 64.

2. AFG33. M. Bhide: Vector borne pathogens and host complement system: A tangled tale. Workshop on Arthropod-Borne Disease 2017.

3. AFG34. M. Bhide, K. Bhide, Z. Tomeckova, I. Sirochmanova, E. Kanova, L. Comor, I. Jimenez-Munguía, P. Anda: MALDI-TOF-TOF based de novo Sequencing of the Novel Factor H Binding Protein Bg19 of *Borrelia garinii*. MS-INDUSCON-2017 Mass Spectrometry - Indian Users Congress.

4. AFG51. Mangesh Bhide. *Borrelia* and host interaction: a tangled tale. Proceeding of Veterinary and Animal Science Days; International Journal of Health, Animal Science and Food Safety; Vol. 5, No. 1. 6th-8th June, Milano, Italy . SSN: 2283-3927.

5. AFG55. Mangesh Bhide. Host and *Borrelia*: It takes two to tango. Challenges of Hungarian Agriculture; Agricultural days of Transtisza Region; University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management; 5-6 September 2018, Debrecen, Hungary.

Prednášky

1. AFG18 L. Borszékova Pulzová, E. Schréterová, L. Potočňáková, L. Čomor, M. Bhide: Design, construction and evaluation of multi-epitope chimeric proteins for diagnosis of Lyme borreliosis. 11th Central and Eastern European Proteomic Conference

2. AFG35 Amod Kulkarni, Evelína Káňová, Patrícia Mertinková, Katarína Bhide, Zuzana Tkáčová, Lenka Potočňáková, Ľuboš Čomor, Mangesh Bhide. Domain mapping of NadA, the outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* to block its interaction with human brain microvascular endothelial cells. ADVANCES in Slovak Experimental Neuroimmunology 2018, Smolenice Castle, Slovakia, May 09-11, 2018. ISBN: 978-80-971357-6-8.
3. AFG36 Evelína Káňová, Zuzana Tkáčová, Irene Jiménez-Munguía, Petra Majerová, Katarína Bhide, Andrej Kováč, Lenka Potočňáková, Patrícia Mertinková, Ľuboš Čomor, Mangesh Bhide. Cell signaling analysis of human brain microvascular endothelial cells induced by *Neisseria meningitidis* and its selected outer membrane proteins. ADVANCES in Slovak Experimental Neuroimmunology 2018, Smolenice Castle, Slovakia, May 09-11, 2018. ISBN: 978-80-971357-6-8.
4. AFG37 Lenka Potočňáková, Patrícia Mertinková, Zuzana Tkáčová, Katarína Bhide, Ľuboš Čomor, Evelína Káňová, Amod Kulkarni, Mangesh Bhide. Borrelial mimotope mapping for diagnostics purposes. ADVANCES in Slovak Experimental Neuroimmunology 2018, Smolenice Castle, Slovakia, May 09-11, 2018. ISBN: 978-80-971357-6-8.
5. AFG38 Ľuboš Čomor, Lenka Potočňáková, Evelína Káňová, Zuzana Tkáčová, Patrícia Mertinková, Amod Kulkarni, Mangesh Bhide. Production of single-domain antibodies in *Leishmania tarentolae* expression system. ADVANCES in Slovak Experimental Neuroimmunology 2018, Smolenice Castle, Slovakia, May 09-11, 2018. ISBN: 978-80-971357-6-8.
6. AFG39 Zuzana Tkáčová, Evelína Káňová, Irene Jiménez-Munguía, Katarína Bhide, Petra Majerová, Andrej Kováč, Lenka Potočňáková, Patrícia Mertinková, Ľuboš Čomor, Mangesh Bhide. Transcriptome analysis of human brain microvascular endothelial cells after challenge with *Borrelia bavariensis* and Erp23 protein. ADVANCES in Slovak Experimental Neuroimmunology 2018, Smolenice Castle, Slovakia, May 09-11, 2018. ISBN: 978-80-971357-6-8.
7. AFG40 Patrícia Mertinková, Mangesh Bhide, Lenka Potočňáková, Zuzana Tkáčová, Evelína Káňová, Petra Majerová, Ľuboš Čomor, Andrej Kováč, Katarína Bhide. Identification of flaviviral domain III blocking peptides to prevent its interaction with human brain microvascular endothelial cells. ADVANCES in Slovak Experimental Neuroimmunology 2018, Smolenice Castle, Slovakia, May 09-11, 2018. ISBN: 978-80-971357-6-8.
8. AFG41 Mangesh Bhide, Patrícia Mertinková, Lenka Potočňáková, Zuzana Tkáčová, Evelína Káňová, Petra Majerová, Ľuboš Čomor, Andrej Kováč, Amod Kulkarni, Katarína Bhide. Simple and rapid pipeline for recombinant protein production. ADVANCES in Slovak Experimental Neuroimmunology 2018, Smolenice Castle, Slovakia, May 09-11, 2018. ISBN: 978-80-971357-6-8.
9. AFG47 Patrícia Mertinková, Mangesh Bhide, Amod Kulkarni, Zuzana Tkáčová, Evelína Káňová, Katarína Bhide. Mapping of binding sites of domain III of West Nile virus envelope glycoprotein using a limited proteolysis. Current Status of Experimental Neuro-Immunology in Slovakia II, Košice, Slovakia, November 15-16, 2018. ISBN 978-80-971357-7-5
10. AFG48 Lubos Comor, Evelina Kanova, Zuzana Tkacova, Patricia Mertinkova, Amod Kulkarni, Mangesh Bhide. Production of single-domain antibodies in T7 Expression *E. coli* shuffle expression system. Current Status of Experimental Neuro-Immunology in Slovakia II, Košice, Slovakia, November 15-16, 2018. ISBN 978-80-971357-7-5
11. AFG49 Evelina Kanova, Zuzana Tkacova, Irene Jimenez-Munguia, Petra Majerova, Katarina Bhide, Andrej Kovac, Lenka Potocnakova, Patricia Mertinkova, Lubos Comor, Mangesh Bhide. Cell signaling analysis of human brain microvascular endothelial cells induced by *Neisseria meningitidis* and its selected outer membrane proteins. Current Status of Experimental Neuro-Immunology in Slovakia II, Košice, Slovakia, November 15-16, 2018.

12. AFG50 Zuzana Tkacova, Evelina Kanova, Irene Jimenez-Munguia, Katarina Bhide, Petra Majerova, Patricia Mertinkova, Lubos Comor, Mangesh Bhide. Transcriptome analysis of human brain microvascular endothelial cells after challenge with *Borrelia bavariensis* and Erp23 protein. Current Status of Experimental Neuro-Immunology in Slovakia II, Košice, Slovakia, November 15-16, 2018. ISBN 978-80-971357-7-5

13. AFG56 Amod Kulkarni, Patrícia Mertinková, Katarína Bhide, Evelína Káňová, Zuzana Tkáčová, Mangesh Bhide. Mapping of binding sites on NadA protein of *Neisseria meningitidis* and blocking its interaction with human brain microvascular endothelial cells. 10th International Tissue Repair and Regeneration Congress, 12th Annual Conference on Stem Cell and Regenerative Medicine and International Conference on Cell Biology and Genomics, June 13-14, 2019, Helsinki, Finland. Journal of Tissue Science & Engineering, June 2019, Volume 10, ISSN 2157-7552.

14. AFG57 Mangesh Bhide, Amod Kulkarni, Petra Majerová, Evelína Káňová, Patrícia Mertinková, Zuzana Tkáčová, Katarína Bhide, Andrej Kováč. A proof of concept: pilot development of drug delivery system across BBB against neuropathogens (from APVV-14-0218 to EuronanoMed III). ADVANCES in Slovak Experimental Neuroimmunology 2019, Smolenice Castle, Slovakia, May 22-24, 2019. ISBN 978-80-971357-8-2.

15. AFG59 Evelína Káňová, Zuzana Tkáčová, Petra Majerová, Katarína Bhide, Andrej Kováč, Patrícia Mertinková, Amod Kulkarni, Mangesh Bhide. The transcriptome analysis of human brain microvascular endothelial cells induced by *Neisseria meningitidis* and MafA. ADVANCES in Slovak Experimental Neuroimmunology 2019, Smolenice Castle, Slovakia, May 22-24, 2019. ISBN 978-80-971357-8-2.

16. AFG60 Patrícia Mertinková, Amod Kulkarni, Mangesh Bhide, Zuzana Tkáčová, Evelína Káňová, Katarína Bhide. West Nile virus domain III blocking peptides to combat flavivirus neuroinvasion. ADVANCES in Slovak Experimental Neuroimmunology 2019, Smolenice Castle, Slovakia, May 22-24, 2019. ISBN 978-80-971357-8-2.

17. AFG61 Punit Tyagi, Mangesh Bhide Punit Tyagi, Mangesh Bhide. Development of a bioinformatics platform for analysis big data from omics analyses – OMnalysis. ADVANCES in Slovak Experimental Neuroimmunology 2019, Smolenice Castle, Slovakia, May 22-24, 2019. ISBN 978-80-971357-8-2.

Uplatnenie výsledkov projektu

Z dosiahnutých výsledkov projektu vyplýva, že neuropatogény (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Borrelia garini*) využívajú svoje povrchové proteíny (ligandy) na adhéziu k receptorom ľudských mozgových mikrovaskulárnych endotelových buniek (hBMECs) počas iniciálneho štádia neuroinvázie.

1. Odhalenie celkových interaktómov vybraných neuropatogénov vytvorilo komplexnú databázu, ktorá môže byť nápomocná vedcom pri štúdiu interakcií jednotlivých ligandov a ich partnerov (receptorov) a odhalení ich vplyvu na rôzne biologické procesy v hostiteľských bunkách.

2. Unikátny postup vytvorený v rámci tohto projektu na odhalenie interaktómu ktorý kombinuje biologické metódy s bioinformatickými nástrojmi môže byť užitočný na odhalenie a selekciu povrchových ligandov nielen baktérií, ale aj iných patogénov ako napr. parazitov alebo vírusov invadujúcich CNS.

3. V rámci projektu bol odhalený celkový obraz bunkovej odpovede (transkriptom) na neuropatogény a ich ligandy (MafA a NadA *N. meningitidis*, OspA a Erp23 *B. garini* a adhesion lipoprotein *S. pneumoniae* na hBMECs). Boli čiastočne odhalené signálne procesy umožňujúce translokáciu patogénov cez hematoencefalickú bariéru. Tieto poznatky vytvárajú pevný základ pre ďalšie štúdie translokácie patogénov cez HEB.

4. Vďaka ligand-receptorovým interakciám patogény adherujú na povrch buniek. Väzbové domény sú dôležité pre ligand-receptorovú interakciu. V rámci tohto projektu bola v našom laboratóriu štandardizovaná unikátna metóda limitovanej proteolýzy na mapovanie

väzbových domén. Metóda sa vyznačuje hlavne svojou nenáročnosťou a rýchlosťou (za jeden deň vieme identifikovať väzbové miesta). Pomocou tejto metódy je možné identifikovať väzbové domény ligandov, ktoré môžu byť následne použité na vytvorenie špecifických terapeutík (napr. nanoprotilátok) blokujúcich ligandy zúčastňujúcich sa ligand-receptorových interakcií. V rámci projektu sme boli úspešní pri identifikácii väzbových miest proteínov NadA, MafA, OspA a Erp23, proti ktorým sme následne produkovali ligand-blokujúce nanoprotilátky.

5. Pre produkciu nanoprotilátok bola na našom pracovisku navrhnutá mRNA-ribozóm-VHH expresná kazeta (patent C12N 15/00 (50080-2016) a zavedená metóda fágového displeja, pomocou ktorých sme boli schopní produkovať antimikrobiálne peptidy, určené ako terapeutické látky proti neuropatogénom, a nanoprotilátky schopné znížiť schopnosť neuropatogénov (*Borrelia* a *Neisseria*) adherovať na povrch endotelových buniek.

6. V našom laboratóriu sme štandardizovali metódu in vitro imunizácie B-lymfocytov, ktorá je oproti klasickej imunizácii zvierat (napr. lama) výhodnejšia, pretože: 1) nie je potrebná imunizácia viacerých zvierat pre viac antigénov; 2) zvieratá netrpia v dôsledku toxických antigénov a 3) je možné imunizovať B-lymfocyty živými patogénmi v in vitro podmienkach. Vďaka týmto výhodám je možné in vitro imunizáciu využívať v praxi.

7. Nami vyvinuté nanoprotilátky majú vysoký potenciál uplatniť sa ako terapeutické látky pri liečbe neuroboreliózy a znižovaní nepriaznivého vplyvu meningitídy pri infekcii *N. meningitidis*. Postup na produkciu nanoprotilátok štandardizovaný v tomto projekte môže byť použitý na produkciu ďalších nanoprotilátok proti rôznym patogénom, a tým prispieť k vývoju účinných terapeutík pri liečbe rôznych ochorení vyvolaných patogénmi.

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

Prvým cieľom bolo mapovať súbor povrchových proteínov (ligandov) neuropatogénov (*N. meningitidis*, *B. bavariensis* a *S. pneumoniae*), ktoré interagujú s bunkami neurovaskulárnej jednotky (NVJ). Pomocou proteomických metód a bioinformatiky sme úspešne mapovali interaktom neuropatogénov. Interakcia vybraných ligandov s bunkami NVJ bola validovaná ELISA testom. Druhým cieľom bolo posúdenie schopnosti ligandov indukovať signálne dráhy, napomáhajúce translokácii patogénov cez hematoencefalickú bariéru (HEB). Ligandy MafA a NadA *N. meningitidis*, OspA a Erp23 *B. bavariensis* a adhesion lipoprotein *S. pneumoniae* boli použité pri indukcii hBMECs a astrocytov. S použitím RNA sekvenovania bola hodnotená bunková odpoveď na úrovni transkriptomu. Ligandy indukovali biologické procesy, ktoré môžu meniť permeabilitu HEB. V treťom ciele sme identifikovali väzbové domény ligandov zúčastňujúcich sa ligand-receptorových interakcií pomocou limitovanej proteolýzy ligand-receptorového komplexu a MALDI-MS. Identifikované väzbové domény boli použité vo štvrtom ciele na produkciu špecifických VHH nanoprotilátok. Metóda „in vitro imunizácie B-lymfocytov lamy“ bola zavedená na prípravu VHH-fágových alebo VHH-ribozómových knižníc (patentované). Pomocou fágového displeja bolo vytvorených niekoľko VHH nanoprotilátok a ich schopnosť blokovat' (úplne alebo čiastočne) adhéziu patogénov na hBMECs bola úspešne testovaná. Vďaka projektu sme: publikovali 16 článkov, 63 abstraktov, 1 kapitolu; podali 1 patent; realizovali 5 pozvaných prednášok a 17 prezentácií; dostali 3 EÚ a 7 národných projektov, bol dosiahnutý „brain gain“ (2 postdoktorandské miesta) a niekoľko doktorandov dokončilo PhD.

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

First aim was to map surface proteins of neuropathogens (*N. meningitidis*, *B. bavariensis* and *S. pneumoniae*) that interacts with cells of neurovascular unit (NVU). Using highthroughput proteomics and bioinformatics, we successfully mapped surface protein interactome of neuropathogens. Interaction of several novel surface proteins to cells of NVU was validated with ELISA and cytochemistry. Second aim was to assess the ability of the surface ligands to evoke signaling events, which help translocation of pathogens across blood-brain barrier (BBB). MafA and NadA of *Neisseria*, OspA and Erp23 of *Borrelia* and Adhesion lipoprotein of *Streptococcus* were selected to challenge hBMECs and astrocytes. Cell response was assessed at a transcriptomic level using RNA-seq NGS. Selected ligands induced signaling event that can alter the permeability of the BBB. In third aim, we identified binding pockets on the ligands involved in ligand-receptor interactions using

limited proteolysis of the ligand-receptor complex and mass spectrometry. Binding pockets (domains) were used in the fourth aim to produce domain-specific VHH nanobodies. "In vitro immunization of llama B-cells" was established to prepare domain-specific VHH-phage or VHH-ribosome libraries (patented). With phage display several VHH nanobodies were produced against neuropathogens. Nanobodies were successfully tested for their ability to block adhesion of ligand and pathogens to hBMECs and abate neuroinflammation. We delivered: 16 papers, 63 abstracts, 1 patent, 1 chapter, 5 invited speeches, 17 oral presentations, 3 EU projects, 7 national projects, 2 brain gain (2 post-docs) and several PhD students finished/ing their PhD.