



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-18-0259

Strategický vývoj terapeutických látok voči neuroinfekciám spôsobených vybranými vektorom prenášanými patogénmi

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

- 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 ADC1, ADC4, ADC7, ADC8, ADC11, ADC12).
- 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 ADC1, ADC2, ADC11).
- University of Glasgow, School of biodiversity, one health & veterinary medicine (údaje kvantitatívnej proteomiky odvodené z hmotnostnej spektrometrie boli získané od prof. Davida Eckersalla. Tieto údaje boli použité pri vývoji platformy OManalysis publikovanej v našom článku ADC7).
- Institute for Veterinary Medical Research, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, Budapešť, Maďarsko (niektoré kmene Borrelia boli získané v spolupráci s maďarským partnerom).
- Dr. Ling PENG, CNRS Research Director, Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille, Aix-Marseille University, CNRS, UMR 7325 CInaM 163, avenue de Luminy, 13288 Marseille, France. Anti-Borrelia VHH vyrobená v tomto projekte bola použitá pri vývoji nanoterapeutík (spoluautor patent PCT/IL2023/050499).
- Prof. Zvi Hayouka | Associate Professor, Institute of Biochemistry, Food Science and Nutrition The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem Rehovot 76100, Israel. Anti-Borrelia VHH vyrobená v tomto projekte bola použitá pri vývoji nanoterapeutík (spoluautor patentu PCT/IL2023/050499).

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

1. Patentová prihláška PP 48-2023-3 podaná 26.4.2023 s názvom DNA fragmenty na konštrukciu expresnej kazety na produkciu rekombinantných proteínov. Autori: Mangesh Bhide, Katarína Bhide, Martina Cepková, Viera Kopčáková, Juraj Pistl
2. Patentová prihláška PP 49-2023-3 podaná 26.4.2023 s názvom Rýchla konštrukcia expresnej kazety na produkciu mCherry fúzaných proteínov. Autori: Mangesh Bhide, Katarína Bhide, Martina Cepková, Viera Kopčáková, Juraj Pistl

3. International Patent Application No. PCT/IL2023/050499 s názvom Self-assembling dendrimers and antibacterial uses thereof. Autori zo Slovenska, Francúzska, Izraela a USA. Details: (PCT Patent Application filed with the PCT receiving desk of the Israel Patent Office (RO/IL) as the Receiving Office on May 15, 2023, designating the European Patent Office as the International Searching Authority. The Application was allotted International Patent Application No. PCT/IL2023/050499. Patent office contact person Cherisse Soto, Paralegal department, Webb+co patent attorney, 4, Plaut st. Rehovot, Israel, cherisse.soto@wbpatents.com)

Ochranná známka

1. Ochranná známka na softvér OMnalysis v procese registrácie. Autori: Mangesh Bhidé, Punit Tyagi. <http://lbmi.uvlf.sk/omnalysis.html>

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

ADC 1. Káňová, Evelína, Zuzana Tkáčová, Katarína Bhidé, Amod Kulkarni, Irene Jiménez-Munguía, Patrícia Mertinková, Monika Drážovská, Punit Tyagi, Mangesh Bhidé, 'Transcriptome Analysis of Human Brain Microvascular Endothelial Cells Response to Neisseria meningitidis and Its Antigen MafA Using RNA-Seq', Scientific Reports, 9.1 (2019). <https://www.nature.com/articles/s41598-019-55409-y>

ADC2. Kulkarni, Amod, Evelína Mochnáčová, Petra Majerová, Ján Čurlík, Katarína Bhidé, Patrícia Mertinková, Mangesh Bhidé, 'Single domain antibodies targeting receptor binding pockets of NadA restrain adhesion of Neisseria meningitidis to human brain microvascular endothelial cells', Frontiers in Molecular Biosciences, (2020) <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.573281/abstract>

ADC3. Mertinková, Patrícia, Amod Kulkarni, Evelína Káňová, Katarína Bhidé, Zuzana Tkáčová, Mangesh Bhidé, 'A simple and rapid pipeline for identification of receptor-binding sites on the surface proteins of pathogens', Scientific Reports, 10.1163 (2020). <https://www.nature.com/articles/s41598-020-58305-y>

ADC4. Tkáčiková, Ľudmila, Evelína Mochnáčová, Punit Tyagi, Zuzana Kiššová, 'Comprehensive mapping of the cell response to E. coli infection in porcine intestinal epithelial cells pretreated with exopolysaccharide derived from Lactobacillus reuteri', Veterinary Research, 51.49 (2020). <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-020-00773-1>

ADC5. Tkáčová, Zuzana, Lucia Borszéková Pulzová, Evelína Mochnáčová, Irene Jiménez-Munguía, Katarína Bhidé, Patrícia Mertinková, Petra Majerová, Amod Kulkarni, Andrej Kováč, Mangesh Bhidé, 'Identification of the proteins of Borrelia garinii interacting with human brain microvascular endothelial cells', Ticks and Tick-borne Diseases, 11.4 (2020). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877959X19304649?via%3Dihub>

ADC6. J. Čurlík, P. Lazár, A. Iglódyová, E. Barbušinová, Ľ. Šmiga, J. Novotný, J. Mojžišová, A. Ondřejková, R. Hromada, D. Konjević, M.R. Bhidé, M. Drážovská. Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Slovakian wildlife. Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 23, No. 4 (2020), http://personal.uvlf.sk/personal-pages/default_data/tree/download_file.php?file=/personal-pages/mangesh.bhide/share/APVV_report/2020/2020_C%CC%8Curl%CC%81k_et_al._galle_y_proof.pdf

ADC7. Tyagi, Punit, and Mangesh Bhidé. 'Development of a bioinformatics platform for analysis of quantitative transcriptomics and proteomics data: the OMnalysis'. PeerJ, 12415. PMID: 34820180; PMCID: PMC8588854 (2021). <https://peerj.com/articles/12415/>

ADC8. Zuzana Tkáčová, Katarína Bhidé, Evelína Mochnáčová, Patrícia Petroušková, Jana Hrušková, Amod Kulkarni, Mangesh Bhidé. 'Comprehensive mapping of the cell response to Borrelia bavariensis in the brain microvascular endothelial cells in vitro using RNA-Seq'. Frontiers in Microbiology. 12:760627. (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.760627/full#FNT1>

ADC9. Mertinková Patrícia, Evelína Mochnáčová, Katarína Bhidé, Amod Kulkarni, Zuzana Tkáčová, Jana Hrušková, Mangesh Bhidé, 'Development of peptides targeting receptor binding site of the envelope glycoprotein to contain the West Nile virus infection. Scientific Report 11, 20131 (2021). <https://www.nature.com/articles/s41598-021-99696-w#citeas>

- ADC10. Hudakova, Nikola, Simona Hricikova, Amod Kulkarni, Mangesh Bhide, Eva Kontsekova, and Dasa Cizkova. 'Fundamental and advanced therapies, vaccine development against SARS-CoV-2' *Pathogens* 10, no. 6: 636. (2021).
<https://doi.org/10.3390/pathogens10060636>
- ADC11. Jiménez-Munguía, I., Zuzana Tomečková, Evelina Mochnáčová, Katarína Bhide, Petra Majerová, Mangesh Bhide, 'Transcriptomic analysis of human brain microvascular endothelial cells exposed to laminin binding protein (adhesion lipoprotein) and *Streptococcus pneumoniae*'. *Scientific Report* 11, 7970 (2021).
<https://www.nature.com/articles/s41598-021-87021-4#citeas>
- ADC12. Bhide K, Mochnáčová E. Tkáčová Z, Petroušková P, Kulkarni A, Bhide M. Signaling events evoked by domain III of envelop glycoprotein of tick-borne encephalitis virus and West Nile virus in human brain microvascular endothelial cells. *Scientific Reports* 12, 8863 (2022).
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-13043-1>
- ADC13. Mochnáčová E, Petroušková P, Danišová O, Hudecová P, Bhide K, Kulkarni A, Bhide M. Simple and rapid pipeline for the production of cyclic and linear small-sized peptides in *E. Coli*. *Protein Expression and Purification* 191, 106026 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.106026>
- ADC14. Majerova P, Olesova D, Golisova G, Buralova M, Michalicova A, Vegh J, Piestansky J, Bhide M, Hanes J, Kovac A. Analog of kynurenic acid decreases tau pathology by modulating astrogliosis in rat model for tauopathy. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 152, 113257 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113257>
- ADC15. Hruškovická J, Bhide K, Petroušková P, Tkáčová Z, Mochnáčová E, Čurlík J, Bhide M, Kulkarni A. Engineering the single domain antibodies targeting receptor binding motifs within the domain III of West Nile virus envelope glycoprotein. *Frontiers in Microbiology* 13, 801466 (2022).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.801466>

Uplatnenie výsledkov projektu

1. V prvej časti projektu bol objasnený celkový obraz bunkovej odpovede (na transkriptomickej úrovni) voči neuropatogénom (*Borrelia bavariensis*, západonílsky vírus a vírus kliešťovej encefalitídy) pomocou modelu ľudských mikrovaskulárnych endotelových buniek mozgu (Brain microvascular endothelial cells, BMEC). V tomto projekte boli odhalené signalizačné procesy umožňujúce translokáciu patogénov cez hematoencefalickú bariéru (HEB). Tieto zistenia vytvárajú základ pre ďalšie štúdie translokácie patogénov cez túto bariéru.
2. Vďaka interakciám medzi povrchovými proteínmi (antigénmi) patogénov a bunkovými receptormi, adherujú patogény k povrchu bunky a spúšťajú signálne udalosti v bunke. V niekoľkých prípadoch patogény modulujú signalizačné udalosti vo svoj prospech. *Borrelia* je jedinečný neuropatogén, ktorý má rôzne povrchové proteíny, ktoré sa môžu viazať na BMEC. Pomocou povrchovej biotinylácie, SWATH-MS a bioinformatiky bolo identifikovaných viac ako 20 boréliových proteínov, ktoré môžu adherovať k BMEC. V tejto štúdii bola po prvýkrát identifikovaná funkcia adhézie niekoľkých patogénnych proteínov. Výsledky odhalili adhézne proteíny borélií (publikované v ADC5), čo pomôže ďalším vedcom pochopiť interakciu *Borrelia*-HEB. Podrobná štúdia funkcie a charakterizácie každého z identifikovaných proteínov si zaslúži pozornosť v ďalšom výskume.
3. Väzbové domény sú dôležité pre interakciu antigén-receptor. V rámci tohto projektu bola v našom laboratóriu vyvinutá unikátna metóda „limited proteolysis“ na identifikáciu patogénnej domény viažucej sa na receptor (Receptor binding domain, RBD) buniek. Metóda je jednoduchá a rýchla (miesta väzby vieme identifikovať za jeden deň). Podarilo sa nám identifikovať väzbové miesta proteínov borélií (OspA, Erp23 a Lsm), vírusu kliešťovej encefalitídy a vírusu západonílskej horúčky (v oboch prípadoch proteínu E). V biofarmaceutických spoločnostiach sa domény viažuce sa na receptory buniek používajú na vývoj vysoko špecifických protilátok (ako sú monoklonálne), nanoprotilátok alebo cyklických peptidov voči určitým patogénom.
4. V tomto projekte sme identifikovali domény použité na vývoj špecifických nanoprotilátok a C7C cyklických peptidov proti boréliám, TBEV a WNV pomocou techniky fágového displeja. Úspešne sme vyvinuli anti-WNV nanoprotilátky, ktoré preukázali neutralizačnú schopnosť voči pseudovírusovým časticiam WNV vo vírus neutralizačnom teste (článok publikovaný

ADC15). Taktiež sme vyvinuli anti-TBEV nanoprotiľátky, ktoré neutralizujú živý vírus (TBEV, kmeň Hypr), čo bolo potvrdené plak redukčným neutralizačným testom (článok sa pripravuje). Obidve nanoprotiľátky budú použité v ďalšom projekte APVV „Systém dodávania liečiv na báze nanonosičov“ (APVV-22-0084) na vývoj transportu antibiotík a antivirov do špecifického miesta infekcie v mozgu.

5. C7C cyklické peptidy boli tiež produkované proti RBD proteínu E TBEV a WNV. Anti-WNV C7C peptidy boli schopné neutralizovať pseudovírusové častice WNV. Tieto C7C peptidy sú malé (~ 2 kDa), netoxické, nehemolytické a cyklické, čo zvyšuje pravdepodobnosť ich prechodu cez HEB (uverejnené výsledky v ADC9). Zistilo sa tiež, že anti-TBEV peptidy neutralizujú živý vírus. Údaje prezentujúce vývoj anti-TBEV peptidov sú v procese publikovania.

6. Fágový displej sa taktiež použil na vývoj antiboréliálnych (boréliacidných) cyklických peptidov. Na produkciu cyklických peptidov bol skonštruovaný expresný plazmid. Počas tohto projektu boli zavedené techniky expresie a purifikácie rekombinantných cyklických peptidov (publikovaný v ADC13). Táto technika je rýchla, jednoduchá a lacná a veríme, že bude užitočná aj pre ďalších vedcov pracujúcich v oblasti proteomiky.

7. Bezpečnosť C7C peptidov voči boréliám, vyvinutým v tomto projekte, by sa mohla ďalej otestovať in vivo a použiť ako alternatíva k existujúcim antibiotikám. Je však potrebné podať patentovú prihlášku, aby farmaceutické spoločnosti mohli vyvinúť C7C peptidy v potenciálne antiboréliové terapeutiká. Aktuálne sme v procese prípravy patentovej prihlášky.

8. Nami vyvinuté nanoprotiľátky majú vysoký potenciál ako liečivá pri neuroborélióze a meningitíde/encefalitíde spôsobenej TBEV a WNV. Postup na produkciu nanoprotiľátok štandardizovaný v tomto projekte môže byť použitý na produkciu ďalších účinných látok proti rôznym patogénom, a tým prispieť k vývoju účinného terapeutika pri liečbe rôznych infekcií.

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

Predpokladali sme, že neuroinvazívne borélie adherujú k mikrovaskulárnym endotelovým bunkám mozgu (Brain microvascular endothelial cells, BMEC), hlavnej zložke neurovaskulárnej jednotky, pomocou viacerých povrchových proteínov. Pomocou LC-SWATH-MS a pokročilých bioinformatických nástrojov sme identifikovali takmer 20 boréliových proteínov, ktoré môžu interagovať s BMEC. Pomocou techniky „limited proteolysis“ sme identifikovali receptor viažucu doménu (RBD) boréliových antigénov. Počas tohto projektu boli objavené aj RBD proteínu E u TBEV (Tick born encephalitis virus) a WNV (West Nile virus). Pomocou RNA-seq sme ďalej odhalili signálne dráhy v BMEC (transkriptóm) ovplyvnené patogénmi alebo ich hlavnými antigénmi. Neuroinvazívne borélie modulujú bunkovú odpoveď BMEC, čo spôsobuje uvoľnenie tesných spojení medzi bunkami, ktoré umožňujú boréliám prechádzať cez hematoencefalickú bariéru. V prípade WNV a TBEV doména III proteínu E narúša normálnu funkciu BMEC, čo vedie k translokácii vírusu v mozgovom parenchýme. V druhej časti projektu sme vyvinuli jednodoménové protiľátky (nanoprotiľátky) a cyklické peptidy proti RBD, ktoré sa môžu špecificky viazať na patogény. Niektoré vyvinuté nanoprotiľátky a cyklické peptidy vykazovali silnú schopnosť neutralizovať vírusy. Cyklické peptidy vyvinuté proti boréliám vykazovali silný boréliacidný účinok. Anti-TBEV, anti-WNV a anti-Borrelia cyklické peptidy a nanoprotiľátky vyvinuté v tomto projekte sa v súčasnosti používajú pri vývoji liečiva na báze nanonosičov, ktoré môže prechádzať cez hematoencefalickú bariéru a liečiť infekcie priamo v mieste výskytu. Výstupy sú: 15 článkov, 15 abstraktov na konferenciách, predložené 3 patenty, podaná prihláška 1 ochrannej známky, 5 pozvaných prednášok, 2 projekty EÚ, 6 národných projektov, 2 post-doktorandi a niekoľko ukončených alebo pokračujúcich doktorandov.

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

We hypothesized that neuroinvasive Borrelia adhere to the brain microvascular endothelial cells (BMEC, major component of neurovascular unit) with the help of multiple surface proteins. Using LC-SWATH-MS and advanced bioinformatic tools we identified nearly 20 proteins that can interact with BMECs. With the help of technique ‘limited proteolysis’, we identified the receptor binding domain (RBD) of borrelial antigens. RBDs of the protein E of TBEV and WNV were discovered during this project. Using RNA-seq we further revealed

signaling events (transcriptome) evoked by pathogens or their major antigens in BMEC. Neuroinvasive *Borrelia* modulate BMEC cell response, which causes loosening of the cell-cell tight junctions that allow *Borrelia* to cross the blood-brain barrier. In the case of WNV and TBEV, domain III of protein E disrupts normal BMEC function, resulting in virus translocation in the brain parenchyma. In the second part of the project, we developed single domain antibodies (nanobodies) and cyclic peptides against RBDs, which can specifically bind to the pathogens. Some of the developed nanobodies and cyclic peptides showed potent virus neutralization ability. Cyclic peptides developed against *Borrelia* showed potent borreliacidal activity. Anti-TBEV, Anti-WNV and anti-*Borrelia* cyclic peptides and nanobodies developed in this project are currently being used in synthesis of noncarrier based drug that can cross the human blood-brain barrier and treat the infections. We delivered: 15 papers, 15 abstracts in conferences, 3 patents (submitted), 1 application submitted for trademark, 5 invited speeches, 2 EU projects, 6 national projects, 2 brain gain (2 post-docs) and several PhD students finished/ing their PhD.