



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-19-0519

Interakcia hostiteľských buniek s Coxiella burnetii: identifikácia a využitie nových terapeutických a diagnostických cieľov

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Ľudovít Škultéty, DrSc.**

Príjemca **Biomedicínske centrum SAV, v. v. i. - Virologický ústav**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Virologický ústav Biomedicínskeho centra SAV, v. v. i.

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

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

Počas riešenia tohto projektu bol zverejnený Patent SR 289057: Spôsob chromatografickej purifikácie rekombinantného ľudského erytropoetínu, ktorý ale bol výsledkom nášho projektu APVV-14-0474.

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

ŠPITÁLSKA, E. - BOLDIŠOVÁ, E. - PALKOVIČOVÁ, K. - SEKEYOVÁ, Z. - SKULTETY, L. Case studies of rickettsiosis, anaplasmosis and Q fever in Slovak population from 2011 to 2020. In Biologia, 2022, vol. 77, p. 1633-1640.

KUZMA, Jozef - GUADALUPE ZAVALA-MENESES, Sofia - SKULTETY, Ludovít - CHMELAR, Dittmar - FICÍK, Jozef - PALCOVÁ, Lenka. Antibiotic resistance and biofilm-forming ability of α -toxin-positive Clostridium septicum isolates worsen patient prognosis. In APMIS, 2023, vol. 131, iss. 8, pp 434-441;

ČENTE, Martin - DANCHENKO, Monika - SKULTETY, Ludovít - FILIPČÍK, Peter - SEKEYOVÁ, Zuzana. Rickettsia Deregulates Genes Coding for the Neurotoxic Cell Response Pathways in Cerebrocortical Neurons In Vitro. In Cells, 2023, vol. 12, no. 9, art. no. 1235;

FERRARA, Gianmarco - COLITTI, Barbara - FLORES - RAMÍREZ, Gabriela - PAGNINI, Ugo - IOVANE, Giuseppe - ROSATI, Sergio - MONTAGNARO, Serena. Detection of Coxiella antibodies in ruminants using a SucB recombinant antigen. In Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2023, vol. 36, no. 6, p. 721-726.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky nášho projektu viedli k niekoľkým významným aplikáciám v diagnostike a profylaxii Q horúčky. O náš optimalizovaný protokol na prípravu antigénov C. burnetii v syntetickom médiu ACCM s tryptofánom prejavili záujem popredné pracoviská - Výskumný ústav

Moredun zo Škótska a MultiplexDX zo Slovenska, s ktorými boli podpísané 2 Licenčné zmluvy. Zistili sme, že takto pripravené antigény sú stabilné, vysokokvalitné a bez krížovej reaktivity s inými podobnými druhmi a antigén 2 môže slúžiť aj ako vakcína pre malé prežúvavce.

Okrem toho sme úspešne vyvinuli a štandardizovali model ELISA testu na diagnostiku Q horúčky. Ten preukázal vysokú senzitivitu a špecifickosť pri detekcii IgG a IgM protilátok proti *C. burnetii*. Vyvinutý test bol následne validovaný porovnaním s komerčnými súpravami, čím sa zabezpečila jeho spoľahlivosť a robustnosť pre klinické použitie. Okrem toho sme pomocou rekombinantných techník pripravili dva diagnostické antigény, a to CBU0307 a CBU1398. Tieto proteíny boli exprimované v *Escherichia coli*, purifikované a ich diagnostický potenciál bol testovaný pomocou ELISA na ľudských a zvieracích sérach. Oba antigény vykazovali vysokú zhodu s výsledkami komerčných súprav ELISA. Všetky naše aplikované výstupy boli úspešne testované v Národnom referenčnom centre pre surveillance a laboratórnu diagnostiku rickettsií, čím sme významne zlepšili schopnosť Slovenska odhaliť a zvládnuť infekcie spôsobené s *C. burnetii*.

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

Identifikáciou a charakterizáciou významných rozdielne hojných biomakromolekúl *C. burnetii* a hostiteľských buniek podobných makrofágom sme úspešne splnili hlavný cieľ projektu. Pomocou bioinformatiky sme analyzovali transkriptómové a proteómové údaje v skorých (3 dni) a neskorých (7 dní) štádiách infekcie kmeňmi Nine Mile a S. Táto analýza identifikovala metabolické a regulačné procesy ovplyvnené infekciou a objasnila kmeňovo špecifické patogénne mechanizmy. Okrem toho náš výskum biomarkerov, ktorý identifikoval secerované proteíny v hostiteľských bunkách v rôznych štádiách infekcie, významne prispel k zlepšeniu diagnostiky Q horúčky.

Vykonalí sme aj systematickú analýzu markerov súvisiacich s rezistenciou na antibiotiká, pričom sme zaznamenali zníženú metabolickú aktivitu a transformáciu na bunky podobné spóram. Proteomické analýzy odhalili proteíny zapojené do detoxikácie a membránovej homeostázy, čo naznačuje aktiváciu mechanizmov na zabránenie vstupu antibiotík. Aj fotodynamická inaktivácia sa ukázala ako sľubná antimikrobiálna stratégia, ktorá preukázala vysokú účinnosť proti *C. burnetii*. Následná proteomická analýza podrobne popísala dôsledky tejto terapie.

Použili sme optickú a fluorescenčnú mikroskopiu, ako aj prietokovú cytometriu na štúdium účinnosti infekcie s *C. burnetii*. „Single-cell“ transkriptómová analýza infikovaných buniek podobných makrofágom odhalila odlišné profily transkriptov vo vzťahu k sile infekcie, čo pravdepodobne súvisí s rozdielmi v stave aktivácie makrofágov. Okrem toho sme študovali vstup baktérie do slinných žliaz kliešťov a cerebrokortikálnych neurónov.

Naše úsilie pri vývoji vakcín a novej diagnostiky viedlo k príprave stabilných a spoľahlivých antigénov v syntetickom médiu ACCM, výsledkom čoho bol podpis 2 licenčných zmlúv a vývoj vysoko citlivého a špecifického modelu ELISA testu. Taktiež sme pripravili 4 diagnostické antigény pomocou rekombinantných techník prostredníctvom heterológnej expresie v *E. coli*. Proteíny CBU0307 a CBU1398 následne úspešne preukázali svoj diagnostický potenciál.

Záverom teda možno konštatovať, že projekt účinne pokročil v chápaní mechanizmov infekcie *C. burnetii*, rezistencie na antibiotiká a poskytol cenné diagnostické nástroje, čím dosiahol všetky svoje relevantné špecifické ciele.

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

The project successfully met its objectives by identifying and characterizing significant differentially abundant biomacromolecules from *C. burnetii* and host macrophage-like cells. Using bioinformatics, we analyzed transcriptome and proteome data at early (3 days) and late (7 days) infection stages with Nine Mile and S strains. This analysis identified metabolic and regulatory processes affected by the infection and elucidated strain-specific pathogenic mechanisms. Additionally, our research on biomarkers, which identified secreted proteins in host cells at various infection stages, has significantly contributed to improving Q fever diagnostics.

We conducted a systematic analysis of markers related to antibiotic resistance, noting reduced metabolic activity and transformation to spore-like cells. Proteomic analyses highlighted proteins involved in detoxification and membrane homeostasis, indicating activation of mechanisms to prevent antibiotic passage. Photodynamic inactivation emerged also as a promising antimicrobial strategy with high efficiency demonstrated against *C. burnetii*. Subsequent proteomic analysis detailed the consequences of this therapy. Optical and fluorescence microscopy, as well as flow cytometry, were employed to study the infection efficiency of *C. burnetii*. Single-cell transcriptome analysis of infected macrophage-like cells revealed distinct transcript profiles in relation to the strength of infection, potentially associated with distinct macrophage activation states. Additionally, we studied the bacterium's entry into tick salivary glands and cerebrocortical neurons. Our efforts in vaccine development and novel diagnostics led to the preparation of stable and reliable antigens in synthetic ACCM medium, resulting in licensing agreements and the development of a highly sensitive and specific ELISA test. We also prepared 4 diagnostic antigens using recombinant techniques through heterologous expression in *E. coli*. The proteins CBU0307 and CBU1398 successfully demonstrated their diagnostic potential. In conclusion, the project effectively advanced the understanding of *C. burnetii* infection mechanisms, antibiotic resistance, and provided valuable diagnostic tools, achieving all of its relevant specific objectives.