

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV –0827–11**

**Využitie transgénnych postupov pri funkčnej analýze neuropeptidov a ich receptorov regulujúcich správanie a vývin hmyzu.**

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Ladislav Roller, PhD.**

Príjemca **Ústav zoológie SAV Slovenská akadémia vied**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Sekcia molekulárnej fyziológie, Ústav zoológie SAV Slovenská akadémia vied
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Gwanju Institute of Science and Technology, Gwanju, Južná Korea
2. Univerzity of California, Riverside, USA
3. National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS), Tsukuba, Japonsko

### 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. JIANG, H. - LKHAGVA, A. - DAUBNEROVÁ, I. - CHAE, H-S. - ŠIMO, L. - JUNG, S-H. - YOON, Y-K. - LEE, N-R. - SEONG, JY. - ŽITŇAN, D. - PARK, Y. - KIM Y-J. 2013. Natalisin, a tachykinin-like signaling system, regulates sexual activity and fecundity in insects. Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 110, Iss. 37, p. E3526-E3534.
2. CHO, K-H. - DAUBNEROVÁ, I. - PARK, Y. - ŽITŇAN, D. - ADAMS, M.E. 2014. Secretory competence in a gateway endocrine cell conferred by the nuclear receptor  $\beta$ FTZ-F1 enables stage-specific ecdysone responses throughout development in Drosophila. In Developmental Biology, Vol. 385, iss. 2, p. 253–262.
3. ROLLER, L. – ČIŽMÁR, D. – GÁLIKOVÁ, Z. – BEDNÁR, B. – DAUBNEROVÁ, I. –

ŽITŇAN, D. 2015. Molecular cloning, expression and identification of the promoter regulatory region for the neuropeptide trissin in the nervous system of the silkworm *Bombyx mori*. *Cell & Tissue Research*, DOI 10.1007/s00441-015-2352-z.

4. Žitňan D, Daubnerová I, Roller L, Adams, M.E., 2015. Complex mechanisms of ETH expression and release in insects. In *Invertebrate Neuropeptide Conference 2015*, February 15-19, 2015, Bagan, Myanmar, (oral presentation).

5. GÁLIKOVÁ, ZUZANA – ČIŽMÁR, DANIEL - ROLLER, LADISLAV - ŽITŇAN, DUŠAN. 2015. Využitie bakulovírusového expresného systému pri identifikácii promótorových oblastí pre neuropeptidy natalizín a trissín u *Bombyx mori*. In *Študentská vedecká konferencia PriF UK 2015*, Zborník recenzovaných príspevkov. Editori: GALAMBOŠ M., DŽUGASOVÁ V., ŠEVČOVIČOVÁ A. - Bratislava : Univerzita Komenského v Bratislave vo Vydavateľstve UK, 2015, STR. 202-205. ISBN 978-80-223-3859-2.

## **Uplatnenie výsledkov projektu**

Výsledky získané štúdiom regulačných peptidov nevyhnutných pre vývin a správanie majú teoretický aj praktický význam. Základné mechanizmy pôsobenia týchto signálnych molekúl sú podobné u všetkých živočíchov vrátane človeka. Naše výsledky získané na modelových druhoch hmyzu prispievajú k objasneniu účinku regulačných peptidov na bunkovej aj molekulovej úrovni a preto je možné ich publikovanie v kvalitných zahraničných časopisoch (*Proc Natl Acad Sci USA*, *Cell & Tissue Res*, *Devel Biol*). Endokrinný systém hmyzu je intenzívne študovaný aj ako potenciálny cieľ pre zastavenie vývinu hmyzích škodcov a prenášačov patogénov. Hlavný modelový druh tohto projektu bol motýľ priadka morušová, predstaviteľ početnej a hospodársky významnej skupiny hmyzu. Metódy reverznej genetiky neboli u motýľov dostatočne zavedené a nami vyvinuté transgénne línie významne rozšírili možnosti štúdia funkcie molekúl podieľajúcich sa na regulácii správania a vývinu.

## **CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV**

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

Identifikovali sme vyše 300 neurónov a bunky prímozgovej žľazy produkujúce receptor pre ecdýziotropný hormón (ETH) u motýľa *B. mori*. Po prvýkrát sme opísali expresiu dvoch subtypov ETH receptoru pred zvliekaním do kukly a dospelého motýľa. Kombináciou sekvenovania transkriptómov a bioinformatických prístupov sme získali ucelený obraz o regulačných peptidoch a ich receptoroch v *B. mori*. Identifikovali sme tri nové gény pre regulačné peptidy. Pomocou *in situ* hybridizácie, imunohistochemicky a/alebo cieleňou expresiou zeleného fluorescenčného proteínu (EGFP) sme analyzovali expresiu 47 génov pre peptidy. Získali sme tak nové údaje o distribúcii peptidov v bunkách produkujúcich ETH receptory a o produkčných bunkách viacerých málo známych peptidov. Identifikovali sme regulačné oblasti peptidových génov a overili ich funkčnosť pomocou fúzie s EGFP a propagácie v bakulovírusovom expresnom systéme. Deväť promótorov bolo vybraných pre cieleňú expresiu molekulárnych markerov v rôznych typoch neurónov a buniek prímozgovej žľazy. Pomocou piggyBac transpozónu sme pripravili stabilné transgénne línie *B. mori* pre konštitutívnu ako aj časovo indukovateľnú expresiu molekulárnych markerov. Systém pre konštitutívnu expresiu sa nám podarilo úspešne aplikovať pri analýze úlohy corazonínu pri iniciácii zvliekania. Pre indukovateľnú expresiu génových markerov sme použili binárny systém GeneSwitch-UAS. Tento sme úspešne otestovali pri štúdiu kompetencie Inka buniek pri vylučovaní ETH pri zvliekaní dvojkrídlovca *D. melanogaster* a pri štúdiu neurosekrečných buniek regulujúcich produkciu ecdysteroidov u motýľa. Pripravili sme spolu 10 parentálnych GeneSwitch a UAS línie, ktoré umožnia funkčnú analýzu neurónov a orgánov u *B. mori*, zástupcu hospodársky významnej skupiny hmyzu – motýľov.

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

We identified more than 300 neurons and cells of corpus allatum producing receptor for

ecdysis triggering hormone (ETH) in the silkworm *Bombyx mori*. Expression of two subtypes of ETH receptor prior the pupal and adult emergence was described in Lepidoptera for the first time. We obtained most complete list of regulatory peptides and their receptors in *B. mori* combining in silico search and sequencing of transcriptomes. Moreover, we identified three novel peptide genes. Expression of 47 genes coding for peptides was analyzed using in situ hybridization, immunohistochemistry and targeted expression of EGFP. Our comprehensive approach yielded new data on co-expression of peptides in cells producing ETH receptors and on cells producing poorly-studied peptides. Next we identified regulatory regions of peptide genes, which functionality was verified by a fusion with EGFP and manifestation in baculovirus expression system. Nine promoters were subsequently utilized for targeted expression of molecular markers in individual types of neurons and endocrine organs. We used piggyBack transposon system for production of stable transgenic silkworms with permanent or inducible expression of markers. Using transgenic silkworms permanently expressing corazonin receptor in Inka cells, we confirmed a role of corazonin in initiation of ecdysis. To manipulate expression of molecular markers in transgenic insects we used binary GeneSwitch-UAS system. This system was applied in functional study of competence of the Inka cell to secrete ETH in *D. melanogaster* and in analysis of neurosecretory cells regulating secretion of ecdysteroids in *B. mori*. We generated in total 10 parental GeneSwitch and UAS lines, which enable functional analysis of individual neurons and organs in *B. mori*, a representative of Lepidoptera, an insect group of economic importance.

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

**Zodpovedný riešiteľ**

Ing. Ladislav Roller, PhD.

V Bratislave 28.1.2016

**Štatutárny zástupca príjemcu**

RNDr. Dušan Žitňan, DrSc.

V Bratislave 28.1.2016

.....  
podpis zodpovedného riešiteľa

.....  
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu