

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-14-0556**

**Funkcia neuropeptidov and ich receptorov pri regulácii prenosu patogénov z kliešťov na hostiteľa**

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Dušan Žitňan, DrSc.**

Príjemca **Ústav zoológie SAV**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Ústav zoológie SAV  
Virologický ústav BMC, SAV

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

Parazitologický ústav AV ČR, Česká Republika  
Kansas State University, USA

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

Nie

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

Bednár B, Roller L, Čižmár D, Mitrová D, Žitňan D (2017) Developmental and sex-specific differences in expression of neuropeptides derived from allatotropin gene in the silkworm *Bombyx mori*. *Cell Tiss Res* 368(2):259-275

Procházka E, Michalková V, Daubnerová V, Roller L, Žitňan D, Takáč P (2018) Molecular genetic approach to reduce fecundity of tsetse flies. *BMC Microbiology* 18:144, 183-292

Tatiana Vaculová, Markéta Derdáková, Eva Špitalská, Radovan Václav, Michal Chvostáč, Veronika Rusňáková-Taragel'ová (2018) Simultaneous occurrence of *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in urban foci in Bratislava, Slovakia. *Acta Parasitologica* <https://doi.org/10.2478/s11686-018-00004-w>

Gáliková M, Klepsatel P. (2018) Obesity and aging in the *Drosophila* model. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, 7, 1896, 24 pp. (IF 3.687).

Klepsatel P., Procházka E, Gáliková M. (2018) Crowding of *Drosophila* larvae affects lifespan and other life-history traits via reduced availability of dietary yeast. *Experimental Gerontology*, vol. 110, p. 298-308. (IF 3.224).

Klepsatel P, Girish TN, Dircksen H, Gáliková M. (2019) Reproductive fitness of *Drosophila* is maximised by optimal developmental temperature. *Journal of Experimental Biology*, 222 (Pt 10) (IF= 3.179).

Klepsatel P., Wildridge D, Gáliková M. (2019) Temperature induces changes in *Drosophila*

energy stores. *Scientific Reports*, 9(1): 5239 (IF= 4.122).

Čižmár D, Roller L, Pillerová M, Sláma K, Žitňan D (2019) Multiple neuropeptides produced by sex-specific neurons control activity of the male accessory glands and gonoducts in the silkworm *Bombyx mori*. *Scientific Reports* 9:2253, pp. 1-13 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38761-x> (IF= 4.122).

Sumihiro Matsumoto, Natsumaro Kutsuna, Ivana Daubnerová, Ladislav Roller, Dušan Žitňan, Hiromichi Nagasawa, Shinji Nagata (2019) Enteroendocrine peptides regulate feeding behavior via controlling intestinal contraction of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS ONE* (in press)

Stanko M, Dedarkova M, Spitalska E, Kazimirova M (2019) Ticks and their epidemiological role in Slovakia. *Wiener klinische Wochenschrift*. submitted

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

Tento projekt pomohol objasniť doteraz neznáme neuroendokrinné prepojenia nevyhnutné pre reguláciu aktivity čreva, slinných žliaz a vnútorných pohlavných orgánov. Tieto orgány sú veľmi dôležité rezervoáre nebezpečných patogénov (vírus kliešťovej encefalitídy, spirochéty z rodu *Borrelia* a iné). Uvedené neuroendokrinné systémy neboli doteraz známe a opísané u iných druhov živočíchov a pravdepodobne predstavujú unikátnu adaptáciu na ektoparazitický spôsob života kliešťov. Štúdium regulácie aktivity slinných žliaz a čreva je nevyhnutné pre pochopenie zložitých procesov pri cicaní a trávení krvi, počas ktorých prebieha aj prenos patogénov do hostiteľa. Objasnenie vývinu a fyziológie pohlavných orgánov kliešťov prinesie zásadné a doteraz neobjasnené poznatky o regulácii oplodnenia a ďalších procesov potrebných pre úspešnú reprodukciu týchto ektoparazitov. Tieto výsledky poskytujú možnosti na ciele zastavenie príjmu potravy a prenosu patogénov a tiež pre zablokovanie reprodukcie kliešťov. Vhodný výber neuropeptidov a ich receptorov, ktoré regulujú cicanie krvi, trávenie alebo reprodukciu poskytuje možnosti pre produkciu účinnej vakcíny, ktorá môže zastaviť uvedené fyziologické pochody a prenos patogénov.

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

V tomto projekte sme sa zamerali na 5 skupín neuropeptidov, ktoré sú prítomné v inervácii a endokrinných bunkách vnútorných orgánov kliešťov. Použili sme imunohistochemické farbenia a in situ hybridizácie (ISH) s DNA próbmami na detekciu týchto neuropeptidov v neurónoch inervujúcich slinné žľazy, črevo a gonády. Tiež sme objavili nové endokrinné bunky na povrchu čreva a oviduktov týchto ektoparazitov. Tieto orgány sú dôležité pre rozmnoženie a prenos patogénov. Pomocou uvedených metód a kvantitatívnej real-time PCR (qRT-PCR) sme dokázali, že neuropeptidy sa produkujú a vylučujú z nervových zakončení a endokrinných buniek počas cicania alebo krátko po ukončení príjmu potravy kliešťov. V tomto čase sme zistili aj zvýšenú expresiu receptorov pre neuropeptidy v slinných žľazách a čreve kliešťov, čo naznačuje, že sú dôležité pri regulácii ich aktivity. Molukulárne metódy sme použili na klonovanie všetkých potenciálnych receptorov pre tieto neuropeptidy a v in vitro systéme s CHO bunkami sme charakterizovali a overili ich funkčnosť. Na základe týchto výsledkov sme predpokladali, že neuroendokrinná signalizácia špecifických neuropeptidov a ich receptorov reguluje aktivitu slinných žliaz a čreva a umožňuje prenos patogénov do krvného obehu hostiteľa. Preto sme v ďalšom kroku použili RNA interferenciu (RNAi) na potlačenie expresie neuropeptidov a ich receptorov. Naše pokusy ukázali, že potlačenie expresie neuropeptidov alebo ich receptorov pomocou RNAi negatívne ovplyvňuje aktivitu slinných žliaz, čreva a gonád, čo sa prejavilo pomalším cicaním krvi, nižšou hmotnosťou, vyššou mortalitou a obmedzeným kladením vajíčok. Pri niektorých pokusoch sme pozorovali aj obmedzený prenos patogénov. Tieto výsledky naznačujú, že objasnenie signálnych dráh neuropeptidov a ich receptorov by mohlo pomôcť pri vývoji vakcín proti prenosu patogénov z kliešťov na hostiteľov.

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

In this project we focused on 5 neuropeptide families which are produced in innervation and endocrine cells of various internal organs of ticks. Initially we used immunohistochemical staining and in situ hybridization (ISH) with DNA probes for detection of these neuropeptides

in neurons innervating the salivary glands, gut and gonads. We also observed novel endocrine cells on surface of the gut and oviducts. These organs are important for multiplication and transmission of pathogens. Using these techniques and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) we showed that neuropeptides are produced and released from nerve endings and endocrine cells during or shortly after tick blood feeding. This time period is associated with increased expression of neuropeptide receptors in the salivary glands and gut of ticks. These results indicate that neuropeptide-receptor signalling is important for regulation of the salivary gland and gut activity. We used molecular cloning for identification of all potential receptors and in vitro system with CHO cells for their functional characterization. Based on these results we hypothesised that neuroendocrine signalling of specific neuropeptides and their receptors controls activity of the salivary glands and gut, and mediates pathogen transmission to the bloodstream of the host. The following step was utilization of RNA interference (RNAi) for suppression neuropeptide/receptor expression. These experiments showed that RNAi-induced suppression of neuropeptides and their receptors had adverse effects on activity of the salivary glands, gut and gonads. We observed the following phenotypes in RNAi ticks: delayed blood-feeding, lower weight, higher mortality and limited oviposition. In some cases we also observed suppressed pathogen transmission. These results indicate that functional analysis of neuropeptide-receptor signalling may lead to successful development of vaccines that suppress pathogen transmission from ticks to their hosts.