

Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-16-0219**Identifikácia molekulárno-genetických determinantov apokrinnej sekrécie.**Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Robert Farkaš, CSc.**

Príjemca

Biomedicínske centrum SAV - Ústav experimentálnej endokrinológie**Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený**Ústav experimentálnej endokrinológie
Biomedicínske centrum SAV v.v.i.
Dúbravská cesta 9
845 05 Bratislava 4**Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení**

na niektoré dielčie úlohy sme v rámci projektu využili už predtým etablovanú spoluprácu s nasledujúcimi pracoviskami:

Ústav bunenej biológie a patológie, 1. Lékařská fakulta KU, Praha, ČR
Ludwig Boltzmann Institute for Experimental and Clinical Traumatology, Faculty of Life Science, University of Vienna, Austria
Department of Biology, University of Nebraska, Omaha, NE, USA,
Institute for Genomics, Biocomputing and Biotechnology, Mississippi State University, Starkville, MS, USA**Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu**

0

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlačeFarkaš R., Beňová-Liszeková D., Mentelová L., Beňo M., Babišová K., Trusínová-Pečeňová L. et al. (2018) Endosomal vacuoles of the prepupal salivary glands of *Drosophila* play an essential role in the metabolic reallocation of iron. *Dev. Growth Differ.* 60 (7): 411-430.
Beňová-Liszeková D., Beňo M. and Farkaš R. (2019) A protocol for processing the delicate larval and prepupal salivary glands of *Drosophila* for scanning electron microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 82 (7): 1145-1156. doi: 10.1002/jemt.23263.
Beňová-Liszeková D., Beňo M. and Farkaš R. (2019) Fine infrastructure of released and solidified *Drosophila* larval salivary secretory glue using SEM. *Bioinspir. Biomim.* 14 (5): 055002. doi: 10.1088/1748-3190/ab2b2b.
Farkaš R., Beňo M., Beňová-Liszeková D., Raška I. and Raška O. (2020) A new look at transudation: the apocrine connection. In *Physiological Research*, 2020, vol. 69, no. 2, p. 227-244. (2019: 1.655 - IF, Q4 - JCR, 0.651 - SJR, Q2 - SJR). ISSN 0862-8408.
Beňová-Liszeková D., Beňo M. and Farkaš R. (2021) Fine structure of *Drosophila* larval

salivary gland ducts as revealed by laser confocal microscopy and SEM. Eur. J. Entomol. 118: 123-134. [DOI: 10.14411/eje.2021.013]
Beňová-Liszeková D., Mentelová L., Babišová K., Beňo M., Chase B.A. and Farkaš R. (2021) An apocrine mechanism delivers a fully immunocompetent exocrine secretion. Scientific Reports 11 (1): e15915.

Uplatnenie výsledkov projektu

Odhalenie nového bunkového procesu, v tomto prípade mechanizmu transportu a sekrécie materiálu do extracelulárneho priestoru, obohacuje naše vedomosti a napomáha posúvať hranice poznania v ich komplexnosti. Napriek tomu, že sa jedná o projekt základného výskumu, problematika má nesporné praktické implikácie v budúcnosti, obzvlášť v medicíne. Poruchy apokrinnej sekrécie najmä jej exacerbácia sú diferenciálnym diagnostickým znakom u celého radu dermatogénnych nádorov ale aj tumorov mliečnej žľazy či slinných žliaz. Dosiaľ však pre tieto klinické prípady nejestvovalo vysvetlenie a najmä nebola známa súvislosť danej diagnózy s apokrinnou poruchou. Identifikácia prvých génov zapojených do kontroly apokrinného vylučovania dáva opodstatnenú nádej na postupné objasnenie príčin onkogénneho ochorenia a jeho súvis s poruchou apokrinného procesu. Hoci gény odhalené v tejto súvislosti boli nájdené u *Drosophila*, je nutné zdôrazniť, že vlna muška je univerzálnym a široko používaným modelovým organizmom, a väčšina nami objavených proteín-kódujúcich génov má svojho ortológa aj u cicavcov vrátane človeka. Dosiaľ u *Drosophila melanogaster* bolo zistených viac ako 900 tzv. OMIM-spriahnutých dedičných ochorení, a experimentálna práca na tomto modelovom organizme zásadným spôsobom prispela k dôležitému poznaniu či osvetleniu desiatok z nich. Naše experimenty zatiaľ viedli k odhaleniu asi troch desiatok génov ovplyvňujúcich apokrinnú sekréciu u *Drosophila*, a fenotypická analýza vrátane pilotných štúdií interakcií génov jasne preukázala, že nimi kódované proteíny sú súčasťou osobitej signálnej dráhy. Postupné a dôsledné rozširovanie vzájomných interakcií medzi identifikovanými lokusmi a príslušnými proteínmi dáva opodstatnenú nádej na nájdenie kľúčových súvislostí s inými už známymi dráhami zapojenými do iných bunkových procesov a na vysvetlenie viacerých patogénz.

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

Najdôležitejšie výsledky z riešenia projektu možno zhrnúť do nasledujúcich bodov: (1) odhalenie 29 génov kontrolujúcich apokrinnú sekréciu; (2) určenie funkcie apokrinného sekrétu ako imunokompetentnej exuviálnej tekutiny; (3) proteomická analýza apokrinného sekrétu; (4) nájdenie evolučných vzťahov a konzervácie apokrinného procesu v rámci celej skupiny *Diptera* (*Brachycera*); (5) odlíšenie transcytózy od transsudácie; (6) genetická a funkčná disekcia signálnej dráhy apokrinnej sekrécie od exocytózy a od apoptózy; (7) nájdenie nových organel (collector saccules); (8) podmienenosť mohutnosti apokrinnej sekrécie od koevolúcie niektorých merokrinných faktorov.

Považujeme za potrebné konštatovať, že počas riešenia sa vyskytli zdržania a posuny spôsobené jednak Covid pandémiou a karanténymi opatreniami, ale tiež nepredvídateľnými okolnosťami, ktoré sa nedajú naplánovať pri takomto type projektu. Hlavným cieľom projektu bolo identifikovať gény zodpovedné za kontrolu apokrinnej sekrécie a tento zámer bol nielen splnený ale aj prekročený, keď zväžíme počet takto odhalených génov. Celogenomický skrining, ktorý sme zvolili (využitie deficičných kitov, delečného mapovania, RNAi a identifikácia apokrinných promótorov) bol nad očakávanie úspešný, pretože umožnil v priebehu riešenia projektu postupne identifikovať takmer 30 nových a dosiaľ nepoznaných génov. Napriek tomu, že genóm *Drosophila* je kompletne sekvenovaný, väčšina z nich patrí do kategórie tzv. CG-génov t.j. génov bez dosiaľ známej funkcie alebo fenotypu. CG-gény boli v rámci genómového projektu nájdené resp. predikované *in silico*. Až náš skrining niektoré z týchto CG-génov odhalil ako regulátorov či efektorov apokrinnej sekrécie, a pre viac ako polovicu z nich máme k dispozícii konfirmačné transkriptomické údaje o ich unikátnej tkanivovo- a temporálne-spezifickej expresii iba v prepupálnych slinných žľazách, kde sa proces apokrinnej sekrécie odohráva. Úspešnosť, najmä výťažnosť, nášho skriningu v kombinácii s inými objektívnymi prekážkami (spomínané pandemické opatrenia) spôsobila, že niektoré pôvodne plánované experimenty (subklonovanie väčšiny identifikovaných génov do transformačných a expresných vektorov

najmä pre účely proteín-proteínových interakčných štúdií) sa nestihli uskutočniť v plnom rozsahu, avšak tieto ciele sa naplňajú priebežne aj v súčasnosti, s dôrazom na publikovanie rozpracovaných rukopisov.

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

Crucial achievements of the project can be summarized as follows: (1) uncovering 29 genes involved in the control of apocrine secretion; (2) identifying function of the apocrine secretion; (3) proteomic analysis of apocrine secretion components; (4) determining evolutionary relationships and conservation of apocrine process within entire Muscomorpha dipterans (Brachycera); (5) discrimination between transcytosis and transudation; (6) genetic and mechanistic dissection of apocrine secretion signaling pathway from exocytosis and apoptosis; (7) finding new organelle (collector saccules); (8) dependence of the robustness of apocrine secretion on the coevolution of specific merocrine factors.

It should be emphasized that in the course of project implementation we experienced some delays due to Covid pandemics and subsequent shifts in the plan of experiments. In addition, some temporal shifts in the experiments were caused also by unforeseen events and unexpected directions of some results. The main goal of the project to identify genes responsible for apocrine secretion was not only met but we believe it was also extended over original plans, when considering number of uncovered new genes. Whole genome screening we chose (deficiency kits, deletion mapping, RNAi and identification of apocrine promoters) was extremely successful and led to identification nearly 30 new and previously unknown genes. Even though Drosophila genome is completely sequenced, great majority of discovered genes fall into the category of CG genes that were originally predicted only by in silico methods. It was our screen that identified several of these CG-genes as regulators or effectors of apocrine secretion. For about half of them we possess also confirmatory transcriptomic data evidencing their tissue- and developmentally-specific expression in prepupal salivary glands, where and when the process of apocrine secretion takes place. Significantly greater proportion of genomic screen than originally planned and anticipated caused some shifts in proposed experiments towards more genes to be identified, and thus molecular subcloning of cDNA of newly recovered genes was delayed, and some of the germline transformations and protein-protein interactions studies were not completed. However, currently we not only continue in fulfilling these plans, but we are also completing several manuscripts dealing with above described data.