

# Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Adéla Bártová

Biosyntéza samčích feromonů čmeláků a její hormonální regulace

Biosynthesis of the bumblebee male pheromones and its  
hormonal regulation

*Diplomová práce*

Vedoucí práce: prof. RNDr. Irena Valterová, CSc.

Praha 2019



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne .....

.....

Adéla Bártová

Ráda bych zde nyní poděkovala své školitelce prof. RNDr. Ireně Valterové, CSc., za veškerou pomoc při řešení mé diplomové práce a za celkovou ochotu, trpělivost a poskytnuté rady, bez nichž by tato práce nevznikla. Můj dík náleží také celé výzkumné skupině *Infochemikálie* na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za celkovou vstřícnost a příjemný kolektiv a dále konkrétně Ing. Janě Brabcové, Ph.D. a Mgr. Aleši Bučkovi, Ph.D. za úvodní přípravnou fázi predikce a syntézy PBAN peptidů, a Ing. Pavlu Jedličkovi, Ph.D. za odborné rady v pozdějších fázích výzkumu. Dále děkuji Martinu Hubálkovi, Ph.D. za LC-MS měření části vzorků. Můj dík patří také Ivě Pichové, Ph.D. za možnost využít laboratorního vybavení její skupiny a za cenné rady a konzultace.

Zvláště pak děkuji Mgr. Michalu Tupcovi za naprosto nezanedbatelnou pomoc a přátelskou i vědeckou podporu po celou dobu výzkumu, a panu Mgr. Jiřímu Kindlovi, Ph.D., za laskavé poskytnutí biologického materiálu.

Závěrem bych ráda poděkovala také rodičům za umožnění studia jako takového.

Tato práce vznikla za finanční podpory v rámci projektu GAČR (15-06569S) a projektu na podporu ÚOCHB (RVO61388963).

## Abstrakt

Čmeláci jsou důležití opylovači rostlin, komerčně využívání při pěstování plodin ve sklenících. Při páření se u nich uplatňují samčí značkovací feromony, které jsou atraktivní pro mladé královny. Feromon je často bohatou směsí látek, která je produkována v samčí labiální žláze, přičemž složení feromonu je specifické pro každý druh.

Regulace biosyntézy sexuálních feromonů u čmeláků je neprobádanou oblastí a tato diplomová práce se zaměřuje na analýzu mechanismu posledního kroku biosyntézy feromonu čmeláků druhu *Bombus terrestris*, tedy stereospecifickou enzymovou redukcí dvojně vazby farnesolu. Byl studován vliv potenciálních neurohormonů na expresi enzymů, které jsou zapojeny do biosyntézy feromonu, a na produkci jednotlivých složek feromonu. V projektu byly používány metody biochemické, metody z oblasti molekulární biologie i analytické metody.

klíčová slova: plynová chromatografie, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, *Bombus terrestris*, terpenové alkoholy, biologicky aktivní látky, *Hymenoptera*

## Abstract

Bumblebees are important pollinators, commercially used in large-scale plant growing in greenhouses. Their males produce marking pheromones for mating, which attract young bumblebee queens. These pheromones are often a complicated mixture of chemicals, which is produced in the male labial gland, and the mixture itself is specific for each bumblebee species.

The regulation of bumblebee sexual pheromone biosynthesis is largely unknown, and this Master's thesis is focused on the analysis of the mechanisms which lead to the regulation of the *Bombus terrestris* male pheromone's fat-acid and terpenes biosynthesis, specifically on stereospecific enzymatic reduction of double bond of farnesol. This thesis studies the influence of potential neurohormones on a specific enzymatic mixture, which is involved in the pheromone biosynthesis. Methods used in this project include biochemical, analytic and molecular-biology methods.

key words: gas chromatography, liquid chromatography, mass spectrometry, *Bombus terrestris*, terpene alcohols, bio-active chemicals, *Hymenoptera*

# Obsah

1	Úvod.....	11
1.1	Feromony hmyzu a regulace jejich biosyntézy.....	12
1.1.1	Biosyntéza feromonů u hmyzu .....	13
1.1.2	Samčí feromony u čmeláka <i>B. terrestris</i> .....	15
1.1.3	Hmyzí neurohormony a PBAN.....	17
1.2	Metody stanovení PBAN a další metody studia neurohormonů hmyzu .....	20
2	Cíl práce.....	25
3	Experimentální část.....	26
3.1	Materiál .....	26
3.1.1	Použité chemikálie .....	26
3.1.2	Pufry, roztoky a komerční kity .....	26
3.1.3	Biologický materiál.....	27
3.1.4	Přístrojové vybavení .....	28
3.1.5	Výpočetní technologie .....	29
3.1.6	Ostatní materiál.....	30
3.2	Metody .....	30
3.2.1	<i>In vitro</i> inkubace labiálních žláz .....	30
3.2.2	Izolace RNA, příprava cDNA a kvantitativní PCR .....	32
3.2.3	Klonování sekvencí z cDNA a exprese proteinů v kvasinkách .....	35
3.2.4	Izolace peptidů z tkání a jejich analýza .....	40
3.2.5	Analytické metody .....	43
4	Výsledky a diskuze .....	47
4.1	Biosyntéza ( <i>S</i> )-2,3-dihydrofarnesolu .....	47
4.1.1	<i>In vitro</i> inkubace labiálních žláz <i>B. terrestris</i> .....	47
4.1.2	Hledání enzymů potenciálně zapojených do biosyntézy samčího feromonu .....	50
4.1.3	Klonování predikovaných enzymů PPR a SDR1 .....	51
4.1.4	Expresa PPR a SDR1 v kvasinkách .....	52
4.1.5	Biosyntéza feromonu <i>B. terrestris</i> .....	53
4.2	PBAN a příbuzné neuropeptidy .....	54
4.2.1	RNA interference .....	57
4.2.2	<i>In vivo</i> a <i>in vitro</i> stanovení feromonotropní aktivity.....	58
4.2.3	Stanovení relativní exprese .....	58
4.2.4	Extrakce peptidů .....	61
4.2.5	Analýzy peptidů .....	62
4.2.6	Shrnující diskuze.....	67
5	Závěr .....	69
6	Seznam použité literatury .....	70
7	Příloha 1: Složení samčího feromonu <i>Bombus terrestris</i> .....	1
8	Příloha 2: Dynamika feromonu <i>Bombus terrestris</i> .....	2

## Seznam zkratek a symbolů

%v	objemové procento
CLG	hlavová část labiální žlázy (z anglického <i>cephalic labial gland</i> )
CoA	koenzym A (z anglického <i>coenzyme A</i> )
DAG	diacylglycerol
ddH <sub>2</sub> O	dvakrát destilovaná voda (z anglického <i>double-distilled water</i> )
DEPC	dietyl pyrokarbonát (z anglického <i>diethylpyrocarbonate</i> )
DH	diapauzní hormon
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
FAR5	reduktáza mastných kyselin 5 (z anglického <i>fatty acid reductase 5</i> )
FARs	reduktázy mastných kyselin (z anglického <i>fatty acid reductases</i> )
FID	plamenoionizační detektor (z anglického <i>flame ionization detector</i> )
farátní	jedinec těsně před vylíhnutím
G6PD	enzym glukóza-6-fosfát-dehydrogenáza
GC	plynová chromatografie (z anglického <i>gas chromatography</i> )
GC-EAD	plynová chromatografie s elektroantenografickou detekcí (z anglického <i>gas chromatography coupled with electroantennographic detection</i> )
GeDH	geranioldehydrogenáza
GRHr	receptor gonadotropiny uvolňujícího hormonu (z anglického <i>gonadotropin releasing hormone receptor</i> )
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí (z anglického <i>high-performance liquid chromatography</i> )
JH III	juvenilní hormon III
LB	lyzogení médium (z anglického <i>lysogeny broth</i> )
MRCH	hormon melanizace a červeného zbarvení (z anglického <i>melanization and reddish colouration hormone</i> )
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického <i>mass spectrometry</i> )
m/z	poměr hmotnosti a nábojového čísla iontu
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotid
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NCr	receptor neuropeptidu K (z anglického <i>neuropeptide K (capa) receptor</i> )
NUr2	receptor neuromedinu U (z anglického <i>neuromedine U receptor 2</i> )
PBAN	neuropeptid aktivující biosyntézu feromonů (z anglického <i>pheromone biosynthesis activating neuropeptide</i> )

PBANp	prekurzor neuropeptidu aktivujícího biosyntézu feromonů (z anglického <i>pheromone biosynthesis activating neuropeptide precursor</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce (z anglického <i>polymerase chain reaction</i> )
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (z anglického <i>reverse transcription-quantitative PCR</i> )
RPM	otáčky za minutu (z anglického <i>rotation per minute</i> )
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (z anglického <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
SPE	extrakce na pevné fázi (z anglického <i>solid phase extraction</i> )
TAE	tris-acetátový pufr s EDTA
TAG	triacylglycerol
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z anglického <i>thin-layer chromatography</i> )
$t_R$	retenční čas, [t] = min
UV	ultrafialová oblast záření (z anglického <i>ultraviolet</i> )
VIS	viditelná oblast záření (z anglického <i>visible</i> )
$\lambda$	vlnová délka, [ $\lambda$ ] = nm

# 1 Úvod

Komplexní studium blanokřídlého hmyzu (*Hymenoptera*) v posledních letech dospělo k intenzivnějšímu zkoumání jeho genetického kódu a s ním souvisejících biochemických pochodů. Společenství blanokřídlého hmyzu obecně je silně ovlivňováno a řízeno řadou chemických látek, semiochemikálií, vylučovaných endokrinními žlázami. Mezi takové látky patří i feromony, řídící sexuální chování jedinců. Tyto látky bývají zpravidla druhově specifické [1]. I přes tuto specifitu poznatky naznačují, že jednotlivé dráhy biosyntézy jsou si vzájemně velmi podobné [2].

Jeden z nejpodrobnějších výzkumů je prováděn u nočních motýlů, zejména u druhu bourec morušový (*Bombyx mori*), u nějž se podařilo odhalit jak dráhu biosyntézy samičího feromonu, tak příslušné regulační enzymy a také konkrétní neuropeptid, zodpovědný za iniciaci produkci feromonu bombykolu. Tento neuropeptid se označuje jako PBAN (z anglického *pheromone biosynthesis activating neuropeptide*) [3].

PBAN náleží do PBAN/pyrokininové rodiny neuropeptidů, která se vyznačuje přítomností specifické aminokyselinové sekvence FxPRL-amid na C-konci. Feromonotropní aktivitu PBAN můžeme sledovat napříč celým řádem *Lepidoptera* [4]. K PBAN/pyrokininové skupině krom PBAN náleží také hmyzí diapauzní hormon, přičemž oba interagují s takzvanými receptory spřaženými s G-proteinem (GPCR) [5].

Přestože při studiu biosyntetických drah vzniku feromonů u čmeláků lze čerpat z vzájemné druhové podobnosti s dalšími příslušníky řádu *Hymenoptera*, k určení konkrétního neurohormonu zodpovědného za spouštění syntézu směsi feromonů u čmeláka *Bombus terrestris* prozatím nedošlo.

## 1.1 Feromony hmyzu a regulace jejich biosyntézy

Schopnost vzájemně komunikovat je nezbytná pro veškeré živé organismy, blanokřídlý hmyz nevyjímaje. Jednu ze zásadních rolí hrají feromony, látky sloužící k vnitrodruhové komunikaci, mimo jiné i sexuální [6], kterými se zabývá tato práce.

Pro hmyz je primárním komunikačním smyslem čich a látky čichem detekované, feromony [7]. Obecně se určují dva hlavní, vzájemně odlišné typy feromonů, spouštěče (*releasers*) a působky (*primers*). Zatímco spouštěče vyvolávají okamžitou odpověď organismu, působky způsobují fyziologické změny v organismu, které vedou až k výrazné změně chování [8]. *Releaser* feromony byly popsány u více druhů, *primer* feromony se zatím podařilo hlouběji prozkoumat pouze u včely medonosné (*Apis mellifera* L.) [9]. U *releaser* feromonů rozlišujeme tři nejzákladnější druhy – sexuální, poplašné a agregační. Zatímco sexuální feromony jsou vysoce druhově specifické, jeden poplašný feromon, postrádající zpravidla unikátní prvky chemické struktury, může vyvolávat reakci u mnoha druhů [8].

Výzkum během posledních několika desítek let jasně vypovídá o nečekané komplexitě vnitrodruhové komunikace u hmyzu a o rozmanitosti biosyntézy tohoto širokého spektra látek [1, 12].

Tato rozmanitost je o to více umocněna faktem, že na tvorbu sexuálních feromonů má vliv i druh potravy a jeho množství, stejně jako mnoho dalších faktorů [11]. Například některé druhy hmyzu dokonce využívají látky konkrétních rostlin pro produkci vlastních feromonů. Jiné rostliny se pro změnu brání tak, že vylučují látky tlumící feromonovou komunikaci hmyzu nebo lákající predátory býložravého hmyzu [12].

Neurohormony řídící tyto biosyntetické dráhy byly prozatím odhaleny a popsány pouze u zlomku celkového počtu blanokřídlých. Zkoumání neurohormonů hmyzu je zásadní jak pro pochopení přírodních systémů, tak například pro zachování některých druhů v rámci kulturní zemědělské krajiny, stejně jako pro vývoj insekticidů založených právě například na inhibici tvorby sexuálních feromonů [13]. Způsobů komerčního využití znalosti feromonů je ale výrazně více. Feromony jiné než sexuální používají mimo jiné mravenci, kteří chemicky značkují ostatním dělnickým cestu k potravě nebo naopak označují trasu, která se při sběru potravy nevyplácí (například u druhu *Monomorium pharaonis*) [14].

Další podrobně popsáným feromonem je například kyselina 9-oxodec-2-enová produkovaná včelími královnami. Pomocí tohoto feromonu královna tlumí u dělnic vývoj vaječníků a řídí tak fungování celé kolonie. Navíc je tato kyselina součástí sexuálního feromonu mladých panenských královen lákajících samce [8].

Podobně fungující feromony nacházíme i u druhu čmeláka *B. terrestris*.

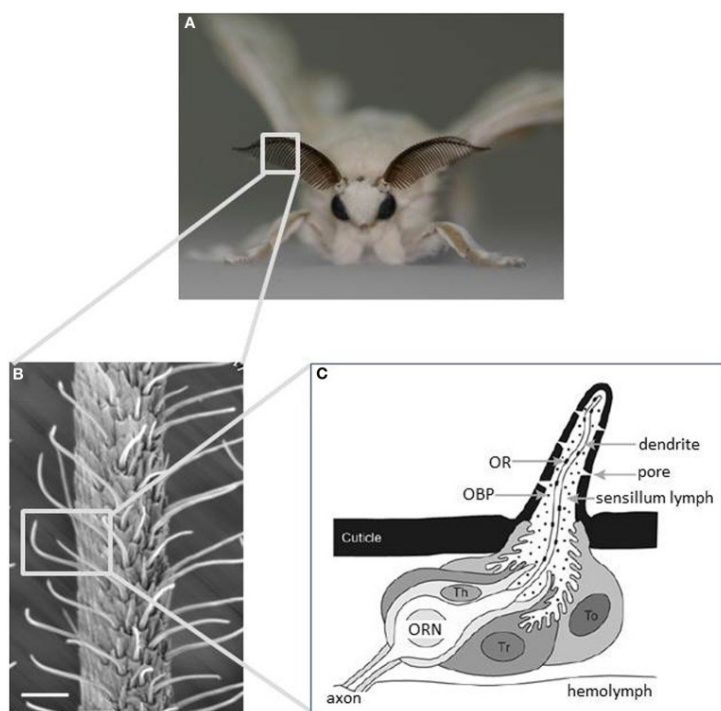
### 1.1.1 Biosyntéza feromonů u hmyzu

Existuje několik odlišných způsobů biosyntézy feromonů, od biotransformace látek z potravy (sekvestrace), přes *de novo* syntézu ze dvou- nebo tříuhlíkatých řetězců [15], zajímavým příkladem pak je například biosyntéza isoprenoidů u řádů *Cucujidae*, *Curculionidae*, a *Scolytidae*, nebo jednoduchá přeměna aminokyselin například u *Scarabaeidae* and *Scolytidae*. Předpokládá se, že u hmyzu se konkrétní způsoby tvorby feromonů vyvinuly upravením, popřípadě vytvořením tkáňově specifických enzymů, které přetvářejí produkty běžného metabolismu na vysoce stereochemicky specifické prekurzory feromonů nebo samotné feromony [16]. Úplně prvním identifikovaným sexuálním feromonem byl (*E,Z*)-10,12-hexadekadienol, bombykol, který produkují samice druhu *Bombyx mori*. Od té doby byly identifikovány feromony u více než tři tisíce druhů hmyzu, nejčastěji ekonomicky významných škůdců [10].

Chemorecepce feromonů je zřejmě jedním z nejvíce složitých a specializovaných mechanismů chemické detekce [17]. Fyzicky probíhá dvěma hlavními cestami – čichem a chutí [18]. Je zprostředkována rozvětvenou skupinou transmembránových receptorů nejdříve identifikovaných u octomilek rodu *Drosophila*. Funkční charakterizace těchto receptorů byla využita k identifikaci jejich ligandů a skupin neuronů. Jedním z typických příkladů těchto receptorů je receptor Or83b, široce zastoupený u mnoha druhů blanokřídlých [19]. Nejlépe jsou rozpoznávání feromonů a příslušné receptory popsány pro čich, tedy detekci těkavých látek v ovzduší, pro něž mají organismy často specificky upravenou anatomii – tykadla s rozličnou škálou krátkých, dlouhých nebo plátkovitých útvarů, zachytávajících látky přicházející z okolí. [20]. Čichový orgán *B. mori* je zobrazen na **Obr. 1.1**.

Typickým příkladem jsou pro samce specifické čichové receptory u druhu *Bombyx mori*, jež se nacházejí ve dvou sousedících neuronech na samčích tykadlech. Jeden z nich zachytává dominantní samičí feromon bombykol, druhý jeho oxidovanou

formu bombykal. Jak feromon, tak signální receptor využívají stejnou mechaniku přenosu obecnou pro hmyz [21].



**Obr. 1.1:** Hlavní orgány s čichovými senzory *B. mori*. (A) Samec *B. mori* s tykadly uzpůsobenými k zachycování těkavých látek. (B) Záznam elektronového mikroskanu tykadla samce *B. mori*, zobrazující podrobnou strukturu orgánu při přiblížení 25  $\mu\text{m}$ . (C) Schematický diagram čichového senzoru zobrazující detailní konfiguraci [22].

U nočních motýlů obecně je velmi časté (na rozdíl od čmeláků), že sexuální feromony sloužící k přilákání protějšku produkují samice. Samotný feromon se skládá z více těchto složek v různém, druhově specifickém poměru. Většinou se jedná o feromony I. typu složené z nerozvětvených řetězců C10-C18 s funkčními skupinami primárních alkoholů, aldehydů, esterů, acetátů a s několika dvojnými vazbami [23]. U *Bombyx mori* například dochází k biosyntéze samičího feromonu bombykolu pomocí dvou navazujících desaturačních kroků, z nichž druhý je specifický tím, že dochází k tvorbě konjugovaného dienu  $\Delta^{10,12}$  z  $\Delta^{11}$ -hexadecenového prekurzoru [24]. Dále byla u *B. mori* zkoumána také dynamika biosyntézy prekurzoru sexuálního feromonu a to konkrétně proteomickou analýzou feromonové žlázy samic těchto můr. Ukázalo se, že do biosyntézy se v různých fázích zapojují odlišné proteiny, vznikající v různých fázích života můry. Jedním z klíčových proteinů této biosyntézy je glycerol-3-fosfát-*O*-acyltransferáza, jejímž utlumením je narušena biosyntéza prekurzoru bombykolu kyseliny bombykové vázané v triacylglycerolech [25].

V rámci tvorby feromonů hraje obecně významnou roli dráha biosyntézy mastných kyselin, respektive tvorba jejich funkčních oxidovaných skupin. Tato dráha je regulovaná kromě jiných enzymů i reduktázami mastných kyselin (FARs), přičemž konkrétně u blanokřídlých jsou v genomech tyto enzymy široce zastoupeny; do současné doby se ovšem podařilo určit přesnou funkci pouze u zlomku z celkového počtu FARs [26].

Například u řádu *Lepidoptera* FAR přeměňují prekurzory feromonů právě na odpovídající alkoholy (v závislosti na druhu organismu), které posléze mohou být oxidovány nebo acetylovány na příslušné aldehydy nebo acetáty [24].

Dalším druhem, u něž byly FARs podrobněji zkoumány, je právě *B. mori*, kde byl izolován úsek cDNA kódující 460 aminokyselin dlouhý protein sekvenčně podobný FAR z olejnaté rostliny jojoby (*Simmondsia chinensis*). U *B. mori* pak *northern blot* analýzy dále ukázaly, že gen příslušný pro FARs byl exprimován zejména u farátních jedinců [27].

Neuropeptid, zodpovědný za iniciaci tvorby těchto sexuálních feromonů u můr, se obecně nazývá PBAN (z anglického *pheromone biosynthesis activating neuropeptide*), a byl podrobně popsán u druhu *B. mori* [12]. Současně se ukazuje, že biosyntéza feromonů u můr je přímo spojena s cirkadiálním rytmem, jenž je řízen právě uvolňováním PBAN do hemolymfy [28].

### 1.1.2 Samčí feromony u čmeláka *B. terrestris*

Většina druhů čmeláků (rod *Bombus*) – okolo 300 druhů – vytváří kolonie pocházející z jedné přezimující oplozené samičky [29]. Samička se před hibernací páří pouze jednou (vyjma druhu *B. hypnorum*), samci čmeláků tak musí využívat specifické směsi feromonů, aby ji k sobě přilákali [30]. Samci zároveň využívají různých strategií chování a jejich kombinací, aby nalákali samičku – patří mezi ně patrolování (*patrolling*), číhání (*perching*) a vyčkávání u hnízda. Feromony samcům dále slouží také k označení teritoria [31, 32].

U čmeláků je vnitrodruhová komunikace podobně jako u ostatních zástupců řádu *Hymenoptera* výsledkem složitého spektra sloučenin. Konkrétně se jedná zhruba o 500 strukturně spíše jednodušších látek: nasycených i nenasycených alifatických uhlovodíků s lichým počtem atomů uhlíku (C10–C35, dvojná vazba nese konfiguraci *Z*) a kyslíkatých

látek (alkoholy, aldehydy a další deriváty mastných kyselin) se sudým počtem uhlíků [31]. Směsi jsou druhově specifické [33]. Významně jsou zastoupeny též monoterpeny, seskviterpeny nebo diterpeny (například citronellol, dihydrofarnesol, geranylcitronellol, geranyllinalool a od nich odvozené estery) [34].

Nejprobádanějším druhem je u nás čmelák zemi *Bombus terrestris*. Za biosyntézu jeho samčího sexuálního feromonu je stejně jako u ostatních druhů čmeláků zodpovědná exokrinní labiální žláza (CLG), jejíž největší část je umístěná u samců i samic v hlavě. Zatímco u samců v ní vzniká specifická směs s dominantními terpeny, u samic obsahuje převážně estery mastných kyselin (dodecylhexanoát až dodecyl-(Z)-9-oktadecenoát) [35]. Přesné složení feromonové směsi labiální žlázy u čmeláků a pačmeláků je známé asi u 90 druhů [33].

Dominantní složkou samčího feromonu *B. terrestris* je seskviterpen terrestrol ((S)-2,3-dihydrofarnesol) v zastoupení 58 % a dále ester ethyldodekanoát (15 %), geranylcitronellol, 2,3-dihydrofarnesylacetát, hexadekanol; tyto látky byly popsány díky pokusům s isotopově značenými prekurzory v potravě [36]. Absolutní konfigurace dominantní složky terrestrolu byla potvrzena jako S-enantiomer u *B. terrestris* [37] a u citronellolu a 2,3-dihydrofarnesalu u jiných druhů čmeláků. Stanovení probíhalo metodou enantioselektivní GC, metodou měření optické rotace a chemické přípravy standardů optických izomerů [38].

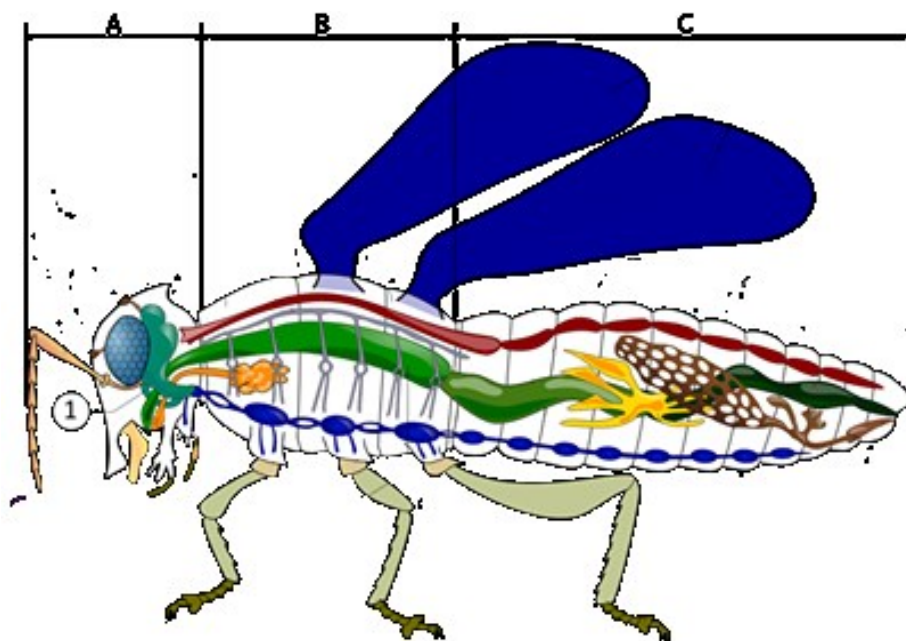
Lze tedy souhrnně říci, že samčí feromon produkovaný v CLG je neobyčejně komplexní směsí více než 50 látek, jejichž tvorba je regulována obrovským množstvím genů, kódujících esterázy, FARs, lipázy, enzymy zapojené v biosyntéze triacylglycerolů, isoprenoidů a mastných kyselin, enzymy zapojené v procesu zkracování mastných kyselin, neuropeptidové receptory. Některé tyto geny byly zkoumány u modelového *B. terrestris* například metodou RT-qPCR [39]. U *B. terrestris* a dvou dalších druhů *B. lucorum* a *B. lapidarius* byly podrobněji zkoumány také FARs, jejich exprese a funkční charakteristika [26].

I přes tuto komplexní analýzu nebyl prozatím objeven konkrétní neuropeptid spouštějící biosyntézu samčího feromonu *B. terrestris*.

### 1.1.3 Hmyzí neurohormony a PBAN

Neuropeptidy hrají nezanedbatelnou roli v řadě fyziologických procesů vývoje a rozmnožování hmyzu. Konkrétně u blanokřídlých se jedná zejména o neuropeptidy PBAN/pyrokininového rodiny, specifické pětiaminokyselinovým FxPRL-amidem na C-konci, diapauzní hormon (DH) a PBAN [5, 40, 41].

Aktivitu PBAN můžeme sledovat napříč celým řádem motýlů *Lepidoptera*, kde obecně reguluje aktivitu enzymů v jednom nebo více krocích biosyntézy řetězců mastných kyselin nebo během modifikace funkčních skupin [42]. U můr jsou specifické samičí feromony ve feromonové žláze syntetizovány *de novo* dráhou biosyntézy mastných kyselin. Samotný PBAN, peptid složený z 33 aminokyselin, je tvořen v podjícnovém gangliu (viz **Obr. 1.2**), přičemž tuková tělíska obsahující intermediáty tvorby feromonu bombykolu se sdružují v zadečku. PBAN stimuluje lipolýzu těchto uložených triacylglycerolů a další uvolnění intermediátů pro finální modifikaci. Jeho funkce je uplatňována pomocí PBAN receptorů na povrchu feromonové žlázy [43]. Vytvořený signál se u nich posléze přenáší za pomoci Gq-fosfolipázy C [44, 45]. Hluběji zkoumaným druhem, u něž PBAN přímo ovlivňuje feromonovou žlázu pomocí  $Ca^{2+}$  a cAMP jako druhých posílů, je také *Helicoverpa zea*. U samic tohoto druhu byl identifikován gen kódující G-proteinový receptor (GPCR) homologní se skupinou GPCR u rodu *Drosophila*, které jsou dále homologní k receptorům pro neuromedin-U u obratlovců. Ukázalo se, že právě neuromedin-U zde vyvolává stejnou  $Ca^{2+}$  odpověď jako PBAN [46].



**Obr. 1.2:** Schematický nákres vnitřních orgánů blanokřídleho hmyzu. 1 podjícnové ganglium (*subesophageal ganglium*), A hlava, B hrud', C zadeček. Obrázek byl upraven [47].

Dále se ukazuje, že PBAN se u některých druhů nezapojuje pouze do biosyntézy samičích feromonů, ale také samčích feromonů (například u druhu kůrovce *Ips paraconfusus*), přičemž zde se do biosyntézy zapojuje také juvenilní hormon JH III, který zvyšuje množství mRNA pro 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktázu, klíčový enzym při tvorbě feromonu [48]. Jedním z druhů, využívajících PBAN pro přímou regulaci tvorby hlavní složky sexuálního feromonu ((Z,E)-9,12-tetradekadienylacetátu z prekursoru hexadekanové kyseliny) je také zavíječ *Plodia interpunctella*. Do této biosyntézy se dále zapojují  $\Delta 12$ -desaturázy,  $\Delta 11$ -desaturázy a případně doplňkově i  $\Delta 9$ -desaturázy, což bylo opět potvrzeno pomocí RT-qPCR [49]. Zapojení PBAN bylo potvrzeno také u blýskavky *Spodoptera exempta*, kde PBAN (o stejné primární struktuře jako MRCH) extrahovaný z hlav samic *B. mori* ovlivňoval jak produkci sexuálního feromonu, tak zbarvení těla můry. U blýskavky *Spodoptera litura* bylo dále potvrzeno zapojení nejen extrahovaného, ale i syntetického PBAN, a to jak v larválním stádiu (zbarvení), tak později u dospělců během tvorby sexuálního feromonu [45, 50].

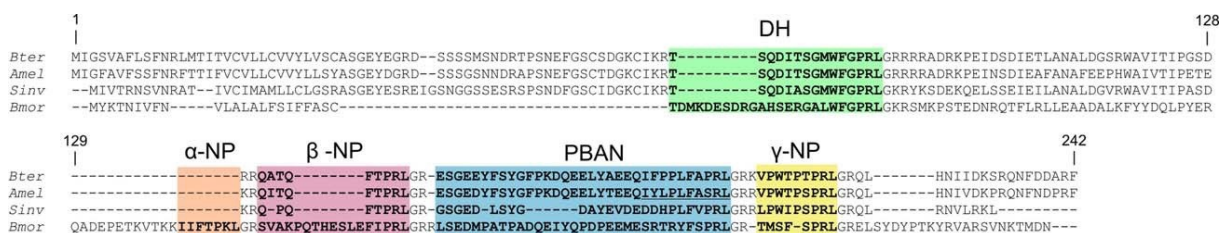
PBAN u *B. mori* dále figuruje v procesu fosforylace takzvaného BmLsd1 proteinu, který je nepostradatelný při lipolýze triacylglycerolů ve feromonové žláze, a tím pádem i v rámci syntézy bombykolu. U můry je aktivace BmLsd1 závislá na fosforylaci proteinkinázou II, zatímco u savců zastává tuto roli proteinkináza A [52].

Hmyzí neurohormony vylučované v centrálním i periferním nervovém systému organismu se však nezapojují pouze do biosyntézy feromonů – jejich aktivita byla odhalena i pro svalovou kontrakci, začátek nebo ukončení diapauzy, proces melanizace (zabarvování), nebo přechod do larválního stádia a to u různých druhů [53].

PBAN/pyrikinové peptidy byly popsány například u druhu mravence *Solenopsis invicta*, kde se vyskytuje u neoplozených samic, samců, dělníků i královen. Největší exprese mRNA pro *Soi*-PBAN byla zaznamenána v hlavě, následovalo tělo a po něm zadeček, přestože bylo předpokládáno, že právě v zadečku bude exprese nejvyšší. Je tedy možné, že se zde uplatňuje ještě jiný gen [54]. Spolu se *Soi*-PBAN složeného z 26 aminokyselin (GSGEDLSYGDAYEVEDDDHPLFVPRL), byly popsány ještě 3 peptidy odvozené z jeho cDNA: 15-AK (TSQDIASGMWFGPRL), sekvenčně odpovídající diapauznímu hormonu, 8-AK (QPQFTPRL), odpovídající *beta*-neuropeptidu ( $\beta$ -NP) a 9-AK (LPWIPSPRL), odpovídající *gamma*-neuropeptidu ( $\gamma$ -NP) – všechny tři tyto neuropeptidy se nacházejí u zástupců *Lepidoptera* a jejich výskyt u *S. invicta* tedy naznačuje existenci PBAN/pyrokininové rodiny i u jiných řádů hmyzu [48]. Tyto prekurzory jsou uvedeny na **Obr. 1.3**.

Je třeba poznamenat, že *Soi*-PBAN (26-AK) a například včelí PBAN (33-AK) jsou vzájemně poměrně odlišné, což naznačuje, že složení tohoto neuropeptidu je taxonomicky a fylogeneticky závislé [55]. Dalším druhem, u něhož je potvrzena aktivita PBAN a diapauzního hormonu náležícího k u hmyzu majoritní PBAN/pyrokininové skupině neuropeptidů sdružených s G-proteinovými receptory, je moskyt *Aedes aegypti*. mRNA kódující PBAN a DH je zde exprimována jak u samců, tak u samic v průběhu všech životních fází [52]. cDNA kódující DH-PBAN byla podrobně zaznamenána také u motýla *Maruca vitrata*, významného škůdce bobovitých rostlin. Tato cDNA o délce 591 bází kóduje 197 aminokyselin, z nichž lze odvodit 5 neuropeptidů: DH, PBAN, *alpha*-subesophageal ganglion neuropeptide (SGNP,  $\alpha$ -NP),  $\beta$ -NP and  $\gamma$ -NP [42].

Gen kódující PBAN receptor (*Plx*-PBANr) byl dále klonován například z feromonové žlázy samic západníčka *Plutella xylostella* (*L.*). *Plx*-PBANr kódoval strukturální motivy pro G-proteiny, tvořící posléze G-proteinové receptory. Ukázalo se, že tento gen byl exprimován pouze ve feromonové žláze dospělých samic [56].



**Obr. 1.3:** Sekvenční analýza PBAN prekurzorových proteinů. Predikovaný diapauzní hormon (DH),  $\alpha$ -neuropeptid ( $\alpha$ -NP),  $\beta$ -neuropeptid ( $\beta$ -NP), PBAN a  $\gamma$ -neuropeptid ( $\gamma$ -NP) jsou označeny barvami. Podtržený úsek označuje sekvenci alternativního kratšího PBAN u *Apis mellifera* [57]. Jednotlivé sekvence byly predikovány pomocí MUSCLE algoritmu a manuálně upraveny (Bter, *Bombus terrestris* PBAN precursor (XP\_003396136); Amel, *Apis mellifera* PBAN precursor (NP\_001104182); Sinv, *Solenopsis invicta* PBAN precursor (NP\_001291527); Bmor, *Bombus morio* PBAN precursor (NP\_001037321)) [58].

Zkoumáním transkriptomu labiální žlázy a tukového tělesa byly predikovány a identifikovány geny zapojené do biosyntetických pochodů *Bombus terrestris*. Bylo anotováno celkem 12 454 exprimovaných genových produktů, z nichž 876 bylo na vyšší úrovni exprimováno v labiální žláze. Bylo identifikováno 140 nejpravděpodobnějších genů zapojených v biosyntéze feromonů, kódujících esterázy, FARs, lipázy, enzymy zapojené v procesu zkracování mastných kyselin, neuropeptidové receptory, enzymy zapojené v biosyntéze triacylglycerolů, izoprenoidů a mastných kyselin [59]. Takto predikovány byly mimo jiné čmeláci desaturázy mastných kyselin (FADs), které byly funkčně charakterizovány u 3 druhů čmeláků: *Bombus lucorum*, *Bombus terrestris*, a *Bombus lapidarius*. Všechny tyto FADs mají podobnou substrátovou specifitu ( $\Delta 9$ ) [60].

## 1.2 Metody stanovení PBAN a další metody studia

### neurohormonů hmyzu

Studium receptorů a neuropeptidů zapojených do biosyntézy feromonů hmyzu vyžaduje využití komplexních metod.

PBAN byl identifikován v mnoha druzích nočních motýlů, mimo jiné u černopásky *Heliothis zea*. Tento 33 aminokyselin dlouhý neuropeptid o  $M_r = 3900$  byl nejprve syntetizován a posléze v roztoku sacharózo-fosfátového pufru injekcí vpraven do zaškrcených 3denních samiček. Ukázalo se, že PBAN vykazuje biologickou aktivitu při dávce 2–64 pmol/jedinec, a vyvolává fyziologickou reakci, tj. tvorbu feromonu (*Z*)-11-hexadecenal. Analýza produktů byla prováděna pomocí kapilární GC [61, 62].

V navazujícím pokusu byly syntetizovány pouze terminální konce PBAN (například 5 aminokyselin) a ty byly posléze injekčně aplikovány do zaškrcených jedinců

(PBAN v pufru), produkt (Z)-11-hexadecenal byl analyzován pomocí GC. Krátké konce PBAN (FSPRL-NH<sub>2</sub>) vykazovaly biologickou aktivitu, nejvyšší v malých dávkách (10 – 100 pmol) [63, 64]. V dalších studiích byl „dlouhý“ PBAN dávkován přímo na zadečky samiček černopáska *H. zea* a na žlázy se značeným prekurzorem [<sup>14</sup>C]-acetátem. Po inkubaci vykazoval biologickou aktivitu 0,01–5 pmol/žláza, což naznačuje, že PBAN reguluje biosyntézu hormonu před nebo v rámci biosyntézy mastné kyseliny, tj. prekurzoru feromonu. Analýza produktů opět probíhala na GC [65].

Pokusy prováděné u druhu *Heliothis armigera* probíhaly následujícím způsobem: žlázy 2-3denních samic byly inkubovány v pufru se značeným prekurzorem ([<sup>14</sup>C]-acetát) a PBAN (0,01 μM). Analýzy byly prováděny metodami radio-HPLC a GC [66, 67, 68]. Stejně analytické metody byly použity i u pozdější studie černopásy *Heliothis virescens*, kde byl značený prekurzor ([<sup>14</sup>C]-acetát ve fyziologickém roztoku) injektován s PBAN (5 pmol) do bezhlavých jedinců [69]. Na modelovém organismu *Heliothis peltigera* (samice) pak byl dále zkoumán PBAN a jeho antagonisté. )) [70].

U druhu černopásy *Heliothis peltigera* byl PBAN (1 a 10 pmol) injektován do těla 3,5–4,5denních samiček, přičemž po inkubaci vykazoval biologickou aktivitu. Dominantní složka feromonu (Z)-11-hexadecenal byla měřena pomocí GC. Opět byla ověřena zásadní role C-koncového amidu [71].

U bource *Bombyx mori* byl zkoumán jak nativní, tak syntetický PBAN. Nativní izolovaný z hlav byl aplikován (10 ekvivalentů) do bezhlavých jedinců s prekurzorem [<sup>14</sup>C]-palmitátem. Syntetický PBAN (0–40 ng) byl aplikován k feromonovým žlázám a inkubován. Analýzy feromonu bombykolu byly prováděny pomocí HPLC a radio-TLC. V obou případech docházelo k syntéze feromonu (u syntetického při 20 a 40 ng/žláza), což naznačuje, že k regulaci pomocí PBAN dochází i přímo ve feromonové žláze [72].

U *B. mori* byl obdobný výzkum prováděn s drobnými obměnami vícekrát, přičemž pro finální analýzu bombykolu bylo využíváno metody NP-HPLC [73, 74]. Velice podobně probíhal výzkum i u *Thaumetopoea pityocampa*, kde se ukázalo, že PBAN kontroluje biosyntézu feromonu regulací kroku transformace intermediátu na finální feromon enynol [75].

Samičky blýskavky *Spodoptera littoralis* syntetizují jako hlavní složku feromonu (Z,E)-9,11-tetradekadienylacetát vznikající syntézou z kyseliny palmitové přes intermediát kyselinu tetradekanovou, která je konvertována specifickou E11-desaturázou a následně Z9-desaturázou. Do 1–2denních zaškrcených, neoplozených samiček bylo aplikováno 0,1–5 µg/µL značeného palmitátu. Inkubace probíhala za přítomnosti extraktu ze samičího *podjícnového ganglia* (2 ekvivalenty), načež byla změřena biologická aktivita směsi. Za všech podmínek docházelo ke vzniku feromonu [76].

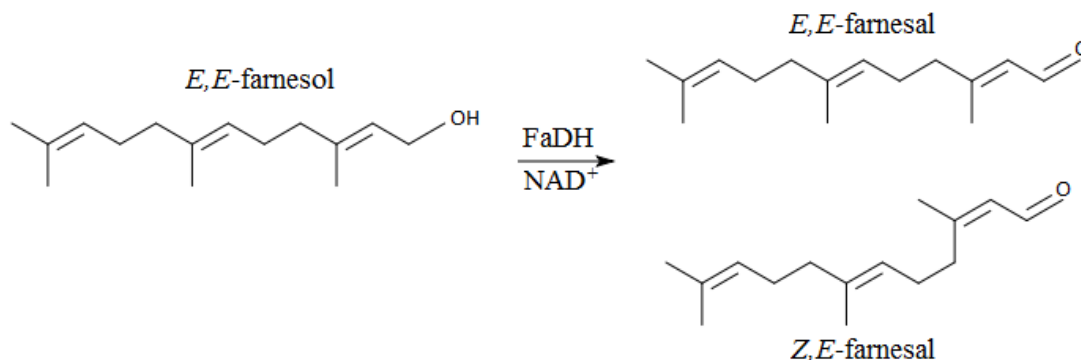
Studium biologické aktivity PBAN probíhalo ještě na několika dalších motýlech, přičemž jednotlivá měření se lišila zejména v délkách inkubací, tkáni, do níž byl roztok PBAN aplikován a také v typu inkubačního média. Krom výše zmíněných byl PBAN aplikován například u *Thaumetopoea pityocampa* [73], u samiček *Utetheisa ornatrix* [77], spolu s prekurzory u samiček *Plodia interpunctella* (zavíječ paprikový) [78], u bezhlavých samiček zavíječe *Amyelois transitella* [79] nebo bezhlavých jedinců můry *Mamestra brassicae* [80].

Modifikovaný postup měření biologické aktivity PBAN byl zvolen u 1–2denních samiček píďalky *Operophtera brumata*, kde byl extrakt z hlav (0,2 / 2 ekvivalentu) nebo čistý PBAN (0,1–10 pmol) injektován do bezhlavých jedinců a inkubován před stanovením biologické aktivity. Závěrečná analýza produktů byla prováděna pomocí GC-MS [44].

G-proteinové receptory u hmyzu jsou obecně spojeny se dvěma různými druhy ligandů: PBAN a pyrokininem-2 nebo DH a pyrokininem-1. Tyto receptory jsou aktivovány pomocí produktů periviscerokininů. U *Ostrinia nubilalis* například byla zjištěna různá míra exprese těchto receptorů u různých stáří a tkání jedinců zkoumáním mRNA metodou qPCR [81].

Metody pro *in vitro* zkoumání enzymatických oxidací farnesolu na farnesal a geraniolu na geranial (viz **Obr.1.2.1**) byly zakládány zejména na předchozích studiích geranioldehydrogenázy (u rostlin), farnesoldehydrogenázy (u hmyzu) a jim příbuzných enzymů. V přírodě se vyskytující směs aldehydů geranialu (jinak také citral A, konfigurace E) a neralu (citral B, konfigurace Z) je obecně známá pod označením citral. Pro směs E,E-farnesalu a Z,E-farnesalu neexistuje triviální název.

Enzym GeDH lze v přírodě nalézt v zástupcích čeledi routovité (*Rutaceae*) a obecně v rostlinách, obsahujících takzvané citrusové esence (pravděpodobná přítomnost farnesolu, geraniolu, citronellolu atp., tím pádem i přidružených enzymů) [82].



**Obr. 1.2.1:** Enzymová oxidace *E,E*-farnesolu na *E,E*-farnesal a *Z,E*-farnesal

Při zkoumání oxidačních reakcí s katalýzou GeDH nebo FaDH se uplatňují přísady koenzymů  $\text{NADP}^+$  nebo  $\text{NAD}^+$ . Přímá aktivita enzymů byla měřena spektrofotometricky ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ), produkty reakcí s terpenickými alkoholy pak byly stanovovány zpravidla plynovou chromatografií, nejčastěji s využitím plamenoionizačního detektoru [81, 83] nebo hmotnostního detektoru (stanovení GeDH perily křovité *Perilla citriodora* rekombinantně exprimované v *E. coli* [85]). Dále se pro zkoumání obou uvedených enzymů oplatňuje metoda SDS-PAGE (separace dvou izoenzymů s různým isoelektrickým bodem, substrátovou specifitou a kinetickými parametry) [86]. Méně častou metodou měření je pak například HPLC-UV ( $\lambda = 215 \text{ nm}$ , sledování aktivity enzymu). V referenčních výzkumech byl jako rozpouštědlo používán v menší míře aceton [87,88], častěji pak DMSO [83, 84, 85]. Schéma enzymové oxidace *E,E*-farnesolu na *E,E*-farnesal a *Z,E*-farnesal je uvedena na **Obr. 1.2.1**.

Některé výzkumy naznačují, že dostatečné množství koenzymů pro *in vitro* stanovení by mohl poskytovat i samotný homogenát přírodního vzorku [88, 89]. Jiné naopak naznačují, že aktivita enzymu GeDH a výsledná konverze geraniolu na citral je výrazně ovlivněna poměrem oxidované a redukované formy koenzymů [90, 91].

Nejdříve byla FaDH izolována z plísně *Ceratocystis fimbriata*, posléze byla použita k oxidaci *E,E*-farnesolu na *E,E*-farnesal [86]. Další studie  $\text{NAD}^+$ -dependentního

FaDH probíhaly u lišaje tabákového *Manduca sexta*, kde je tento enzym zodpovědný za konverzi farnesolu (prekurzoru JH III) [92]. Je pravděpodobné, že FaDH vykazuje různou substrátovou specifitu v závislosti na organismu původu [93], přičemž spektrum substrátů je poměrně široké (*E,E*-farnesol, *Z,Z*-farnesol, 2-dekanol, geraniol, nerol, citronellol, oktanol) [94]. Známými inhibitory FaDH oxidace farnesolu jsou například ionty  $\text{Cu}^{2+}$  a 1,10-fenathrolin [95, 96, 97]. Snížená aktivita tohoto enzymu pak vede u některých organismů k inhibici syntézy JH III.

Oba uvedené enzymy byly zkoumány jak *in vivo*, tak například heterologní expresí v bakterii *Escherichia coli* [98, 99].

Aby docházelo při *in vitro* inkubacích terpenických alkoholů k redukčním reakcím, byla ve více různých studiích užíván enzym G6PD. Konkrétně například při redukci geraniolu na citronellol při syntéze přírodního fytole slouží G6PD jako redukční enzym koenzymů  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}^+$ , nezbytných pro redukci geraniolu [100]. Stejně tak při studiu aktivity enzymů monoterpenoldehydrogenázy a monoterpenolreduktázy, obou  $\text{NADPH}$ -dependentních, se opět pro redukci koenzymu uplatňuje G6PD [101]. Podobný postup byl ověřen i u studia flavoproteinů a zapojených kofaktor-recyklujících systémů [102].

$\text{NADPH}$ - a  $\text{NADH}$ -dependentní reduktázy s krátkým řetězcem jsou širokou a evolučně poměrně starou rodinou a jejich zapojení v metabolických drahách organismů byl v posledních letech podrobně zkoumáno. Ukazuje se, že u většiny těchto SDR má katalytickou funkci Thr-12, Asp-60, Asn-86, Asn-87 a Ala-88 zbytek [103]. Z dalších výzkumů vyplývá, že existuje 5 odlišitelných SDR podrodin, které navzdory strukturním odlišnostem lze rozpoznávat spolehlivě na základě primární struktury a odhadovat tak i specifitu koenzymů [104]. Jednou z dobře popsáných oblastí působení těchto reduktáz je například konverze polyprenolu na dolichol (katalýza tzv. PPR enzymem) [105]. Tato přeměna byla zkoumána u různých organismů zpravidla s uplatněním *in vitro* inkubací nativní tkáně obsahující PPR se zvoleným substrátem a dále genové exprese do různých modelových organismů (kvasinky, bakterie) [106, 107]

## 2 Cíl práce

Tato diplomová práce si klade následující cíle:

1. Shrnout zapojení PBAN v biosyntéze feromonů u hmyzu a metody stanovení jeho feromonotropní aktivity.
2. Zjistit, zda jsou ve vybraných tkáních samců *B. terrestris* přítomné peptidy z PBAN/pyrokinové rodiny a potvrdit/vyvrátit jejich zapojení do regulace biosyntézy značkovacího feromonu.
3. Pokusit se o identifikaci enzymu zodpovědného za stereospecifickou redukci farnesolu na majoritní složku feromonu (*S*)-2,3-dihydrofarnesol.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiál

Pokud není uvedeno jinak, přípravy vzorků probíhaly při standardní laboratorní teplotě.

#### 3.1.1 Použité chemikálie

- deionizovaná voda (systém *Milli-Q*).
- Fluka, SRN: NAD<sup>+</sup> (≥95 %, nikotinamidadeninukleotid), NADP<sup>+</sup> (≥90 %, nikotinamidadeninukleotidfosfát), Tween-80 (≥58,0 %, polyoxyethylensorbitan-monooleát).
- Lachema, ČR: chlorid draselný (≥99 %), hexahydrát chloridu hořečnatého (č.), hexan (p.a.).
- Pracoviště ÚOCHB AV ČR: 2,3-dihydrofarnesol (č.), bromdekan (č.).
- Penta, ČR: aceton (p. a.), dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát, p. a.), dichlormethan pro HPLC (≥99,8 %, stabilizovaný amylenem), ethylacetát (p. a.), hydroxid sodný (p. a.), chlorid sodný (≥99,9 %), chlorid vápenatý (čistota ≥98,3 %), chloroform (stabil. 1% ethylalkohol, p. a.), methanol (p. a.), .
- Sigma-Aldrich, SRN: (*E,E*)-farnesol (≥96,0 %), glycerol pro molekulární biologii (≥99 %), β-merkptoethanol (≥99 %).

#### 3.1.2 Pufry, roztoky a komerční kity

V této práci byly použity následující roztoky:

- **Extrakční pufr:** 20%v glycerol, 0,1%v Tween-80 a 10 mM β-merkptoethanol v inkubačním pufru; před použitím filtrován přes filtr s 0,22 μm póry.
- **Inkubační pufr:** 150 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> a 1 mM MgCl<sub>2</sub> v 10mM sodnofosfátovém pufru o pH = 7,0; před použitím filtrován přes filtr s 0,22 μm póry.
- **Roztok standardu substrátu:** 100 mM farnesol) v destilovaném acetonu
- **Roztok interního standardu:** 2 mM bromdekan v destilovaném ethylacetátu.
- **Roztok koenzymu:** 50 mM NAD<sup>+</sup> nebo NADP<sup>+</sup> (oxidované formy) v destilované vodě.
- **Premix:** 20 μL glukóza-6-fosfát, 20 μL enzymu glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, 922 μL inkubační pufr

- **Extrakční roztok II:** 1% NaCl, 1 M HCl, 1%(v) CF<sub>3</sub>COOH, 5%(v) HCOOH ve vodě
- **Extrakční roztok III:** 1%(v) HCOOH v 50%(v) methanolu
- **Solubilizační roztok:** 0,5%(v) kyselina trifluoroctová v 20%(v) methanolu
- **Roztok A-I:** 100 mL MilliQ H<sub>2</sub>O + 0,1%(v) amoniak
- **Roztok B-I:** 100 mL methanol + 0,1%(v) amoniak
- **Roztok A-II:** 200 mL MilliQ H<sub>2</sub>O + 0,1%(v) kyselina mravenčí
- **Roztok B-II:** 200 mL methanolu + 0,1%(v) kyselina mravenčí
- **TAE pufr:** 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA
- **FCC transformační roztok:** 260 µL 500g.L<sup>-1</sup> roztok PEG 3350, 36 µL 1M roztok LiOAc, 50 µL 2 mg.mL<sup>-1</sup> roztok jedno-vláknové nosičové DNA (ssDNA), 0,1–5 µg plazmidová DNA, 0–14 µL voda (do objemu 360 µL)
- **Komerční kity:**
  - Při transformaci *E. coli* byl využíván standardní kit *Zyppy Plasmid Miniprep Kit* (Zymo Research, USA).
  - Při Phusion PCR byl používán standardní kit *Phusion High-Fidelity PCR Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA).
  - Při TAQ PCR byl používán standardní kit *PCR Core kit with Taq DNA polymerase* (Sigma Aldrich, SRN).
  - Při extrakci DNA byly používány standardní pufrы z kitu *LightCycler 480 SYBR Green I Master*.

### 3.1.3 Biologický materiál

Samci čmeláka zemního využití v rámci této práce pocházejí z laboratorního chovu Mgr. Jiřího Kindla, Ph.D. (UOCHB AV ČR); pitva žláz, hlav a tukových těles byla provedena u různě starých jedinců, přičemž stáří jedinců se pohybovalo v rozmezí 0–10 dní po vylíhnutí, a zároveň byly pro pokusy využívány biologické vzorky odebrané v různých letech (2016–2017). Přesné datum odběru a stáří konkrétního jedince v době pitvy je uvedeno u příslušného experimentu.

Po odebrání byly tkáně z usmrcených čmeláků vždy uchovávány při –20 °C nebo –80 °C.

### 3.1.4 Přístrojové vybavení

- AnalytikJena, SRN: spektrofotometr *SPECORD 210*.
- Analytik Jena, SRN: thermocycler umožňující 3 souběžná PCR měření *TProfessional TRIO PCR Thermocycler*.
- Beckman Coulter, USA: stolní centrifuga *Allegra X-15R* s příslušenstvím.
- Biotech S.L., Kanada: systém na focení gelů *Quantum-ST4-1100*.
- Boeco, SRN: stolní centrifuga s kontrolou teploty *Bench-top U-320 R*.
- Chirana, CSR: Odstředivka média typ *B815*.
- Denville Scientific, USA: stolní centrifuga *MICRO 240A*.
- Elma, CR: sonikační lázeň *Ultrasonic LC 30*.
- Eppendorf, SRN: centrifuga *Centrifuge 5415 R* s kapacitou rotoru 18x 1,5/2,0 mL (1maximální výkon 6 873 x g).
- Hamilton, USA: pH elektroda *SlimTrode*.
- Hanna Instruments, USA: pH metr *pH 213*.
- Heidolph Instruments, SRN: rotační vakuová odparka *Laborota 4002*, lázeň k rotační vakuové odparce *WB*.
- Hermle LaborTechnik, SRN: minicentrifuga *Z 100 M Minicentrifuge* s 6x 1,5/2 mL rotorem (maximální výkon 6000 RPM).
- Hewlett-Packard, USA: plynový chromatograf *HP 6890 Series* s FID detektorem; automatický dávkovač vzorků pro GC *HP 6890 Series Injector*.
- IKA, SRN: vortex *MS2 Minishaker* (maximální výkon 3000 RPM).
- Julabo, SRN: vodní lázeň *TW2* s víkem.
- Kern, SRN: laboratorní váhy *440-35N*.
- Merck, USA: mini inkubátor *Mini Incubator*.
- Mettler Toledo, USA: analytické váhy *AT261 Delta Range*.
- Kraittek, Česká republika: průmyslová ultrazvuková vana *K-5IM*, výkon UZ 150 W, objem 6 L.
- MLW, Polsko: magnetická míchačka s ohřevem *RH3*.
- N-BIOTEK, Jižní Korea: třepací inkubátor *NB-205 (Desktop Large Shaking Incubator)*.
- New Brunswick, USA: inkubační chlazená třepačka *Innova 44*.

- Roche, CH: pro RT-qPCR byl používán *LightCycler 480 SYBR Green I Master kit* (Roche) a samotná qPCR probíhala na *LightCycler 480 Instrument II* (Roche).
- SANOclav, SRN: autokláv *K1-12-2*.
- Telstar Life-Science, IND: ochranný box třídy II mikrobiologické bezpečnosti *BioULTRA* s motorem ovládaným posuvným oknem.
- Thermo scientific, USA: plynový chromatograf *Trace 1310* s MS detektorem ISQ LT; automatický dávkovač vzorků pro GC *AI 3000*.
- Thermo Scientific, USA: semi-preparativní kapalinový chromatograf *UltiMate 3000 UHPLC focused* se zapojením dvou detektorů: *RS Variable Wavelength detector* (UV) a *Finnigan LC Deca* (MS, Thermo Quest, USA), pumpy *BOC Edwards E2M30* (Edwards, USA).
- VWR, USA: inkubační orbitální minitřepačka *Incubating Mini Shaker*.
- Wilmad-LabGlass, USA: ruční mixér *Micro Tube Homogenizer System* s polypropylenovým pístem.

### 3.1.5 Výpočetní technologie

- Chemické vzorce byly kresleny v programu *BKChem 0.13* (Beda Kosata).
- Grafy byly tvořeny v *MS Office Excel 2016*. Chybové úsečky byly zhotoveny vždy ze tří opakování, pokud není v grafu uvedena chybová úsečka, měření bylo provedeno bez opakování.
- Chromatogramy z kapalinové chromatografie byly zpracovány v programu *Xcalibur* (Thermo Fisher Scientific) a exportovány do *MS Excel*.
- Chromatogramy z plynové chromatografie byly zpracovány v programu *Clarity 8.0* (*DataApex*, ČR) a exportovány do *MS Excel*.
- Sekvence neuropeptidů byly navrhovány pomocí programu *Snap Gene 3.2.1*. (GSL Biotech LLC). Původní návrhy PBAN byly provedeny Janou Brabcovou, Ph.D. a Alešem Bučkem, Ph.D. Syntézy navržených peptidů pak probíhaly v dedikovaném pracovišti v rámci UOCHB AV ČR.
- qPCR data byla vyhodnocována pomocí *LightCycler 480 Software 1.5* (Roche) a dále analyzována pomocí *MS Excel* (Microsoft Corporation). Četnost transkriptů byla vztahována na referenční geny PLA2 a eEF1 $\alpha$  [95].

### 3.1.6 Ostatní materiál

- Macherey-Nagel, SRN: filtr ze skelných vláken *GF-6* (velikost póru 0,6  $\mu\text{m}$ ).
- Phenomenex, USA: analytická kolona pro kapilární GC *Zebtron ZB-5MS* [5% fenylarylen, 95% dimethylpolysiloxan, tloušťka filmu 0,25  $\mu\text{m}$ , (30000 $\times$ 0,25) mm]
- Whatman, USA: stříkačkové filtry *Puradisc 25 PP* (průměr pórů 0,2  $\mu\text{m}$ ).
- Varian Medical Systems, USA: hydrofobní silikagelová C-18 SPE kolona *Bond Elut SI* určená pro silně nepolární látky.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 *In vitro* inkubace labiálních žláz

Cílem inkubací labiálních žláz samců *B. terrestris* bylo zkoumat *in vitro* poslední krok biosyntézy (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu, tj. enzymovou reakci vedoucí k redukci dvojné vazby farnesolu.

K homogenátu labiálních žláz a substrátu byly přidávány koenzymy  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADP}^+$ , jež byly převedeny *in situ* na své redukované formy enzymem G6PD, díky čemuž byl umožněn průběh biosyntetické reakce ve směru redukce na rozdíl od předchozí práce [108], kdy byl studován směr oxidační.

#### 3.2.1.1 Příprava homogenátu labiální žlázy

Veškeré kroky byly prováděny na ledu, aby se předešlo degradaci enzymů. Žlázy byly skladovány i zpracovány po trojicích dle stáří (skladovány při  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ; stáří: farátní, 0denní (po vylíhnutí), jednodenní, dvoudenní, třídenní, pětidenní, sedmidenní, desetidenní).

Na každou žlázu v mikrozkuhavce (3 kusy) bylo přidáno 50  $\mu\text{L}$  extrakčního pufru. Homogenizace tkáně byla provedena pomocí ručního homogenizátoru s plastovým pístem po dobu 2 minut, dokud nepřestala být patrná vyšší struktura žláz. Následovala pětiminutová sonikace homogenátu (nejvyšší stupeň výkonu) a poté krátké míchání (2500 RPM, 10 s). V rámci některých experimentů byla část tohoto homogenátu odebrána a dále centrifugována (15000 RPM, 2 minuty), nebo filtrována přes 0,6 $\mu\text{m}$  filtr. Pokud výsledný extrakt nebyl ihned použit k experimentu, byl uchován při  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.1.2 Inkubace homogenátu CLG s alkoholovými substráty

K 945  $\mu\text{L}$  roztoku premixu bylo přidáno 15  $\mu\text{L}$  homogenátu labiální žlázy, 20  $\mu\text{L}$  roztoku substrátu a objem doplněn vodou na 1 mL. Obsah vialky byl inkubován různou dobu v orbitální třepačce (200 RPM, 30 °C). Poté byla provedena extrakce: Po přidavku 500  $\mu\text{L}$  extrakčního pufru byla směs prudce míchána (2000 RPM, 60 s) a poté krátce centrifugována pro urychlení ustavení fáze (2500 RPM). Následně bylo odebráno 300  $\mu\text{L}$  horní organické fáze před analýzou pomocí GC-FID. *In vitro* inkubace byly prováděny v dvou sériích, jejichž podmínky jsou uvedeny v tabulkách **Tab. 3.1** - **Tab. 3.2**.

**Tab. 3.1:** Série A, podmínky inkubace.

**substrát:** 100 mM farnesol

**koenzym:**  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  (50mM)

**homogenát CLG:** F, 1-denní, 2-denní, 3-denní, 5-denní, 7-denní, 10-denní (CLG po dvojicích, rok 2016)

homogenát CLG $\mu\text{L}$	ekvivalent CLG	substrát $\mu\text{mol}$	molární poměr substrát/koenzym	délka inkubace hod
5	0,5	125	5	24

**Tab. 3.2:** Série A, podmínky inkubace.

**substrát:** 100 mM farnesol

**koenzym:**  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  (50mM)

**homogenát CLG:** F, 1-denní, 2-denní, 3-denní, 5-denní, 7-denní, 10-denní (CLG po trojicích, rok 2016)

homogenát CLG $\mu\text{L}$	ekvivalent CLG	substrát $\mu\text{mol}$	molární poměr substrát/koenzym	délka inkubace hod
5	0,5	125	5	48

V rámci tohoto výzkumu byla také doplňkově zkoumána dynamika samčího feromonu v čase. Její výsledky jsou uvedeny v přílohách.

## 3.2.2 Izolace RNA, příprava cDNA a kvantitativní PCR

### 3.2.2.1 Izolace RNA z tkání

Pro účely stanovení relativní exprese mRNA a klonování sekvencí bylo provedeno několik sérií izolací RNA z různých tkání různě starých samců *B. terrestris*. Všechny kroky izolace (kromě centrifugace) byly prováděny v boxu s laminárním prouděním; pro veškeré manipulace s RNA byla použita NFW: ultračistá voda předem autoklávaná s DEPC nebo komerčně dodaná.

Jednotlivé tkáně byly pitvány kolegou J. Kindlem do mikrozkušavek s 300  $\mu\text{L}$  Trizol a před izolací uchovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Tkáň byla nejprve důkladně homogenizována ručním homogenizátorem s plastovým pístem a inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Poté byly využity dva alternativní způsoby izolace:

#### Izolace RNA pomocí chloroformu

Ke vzorku bylo dále přidáno 40  $\mu\text{L}$  chloroformu, směs byla poté cca 20 $\times$  třepána, znovu inkubována 5 min a následně centrifugována (14 000 RPM, 15 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ). Po centrifugaci bylo opatrně odebráno zhruba 50  $\mu\text{L}$  supernatantu (horní vodná fáze). Supernatant byl dále doplněn 50  $\mu\text{L}$  2-propanolu, mírně protřepán v ruce a inkubován 10 min při laboratorní teplotě; poté byl znovu centrifugován (14 000 RPM, 15 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ). Po odebrání supernatantu byla peleta propláchnuta 150  $\mu\text{L}$  75% ethanolu, protřepána a centrifugována (14 000 RPM, 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ). Nakonec byl opatrně odebrán supernatant, peleta téměř vysušena a následně rozpuštěna v 30  $\mu\text{L}$  NFW.

#### Izolace RNA pomocí kitu

Alternativně byla používána rychlejší metoda – izolace byla prováděna pomocí standardního *Direct-zol MicroPrep Kit*. 40  $\mu\text{L}$  roztoku (31  $\mu\text{L}$  DNázy + 217  $\mu\text{L}$  pufru) bylo dávkováno přímo na kolonku, inkubováno 15 minut při pokojové teplotě. Před přidávkem ethanolu v poměru 1:1 vůči množství vzorku, byla ještě provedena homogenizace biologického materiálu (1 min ručně a 30 s ručním mini-mixérem).

### 3.2.2.2 Příprava cDNA reverzní transkripcí

RNA získaná izolací z tkání *B. terrestris* byla dále přepsána do cDNA pomocí reverzní transkriptázy *Superscript III*.

Ve 0,2mL mikrozkuhavce bylo smícháno příslušné množství izolované RNA (500 ng) s přesností na 0,1 µL s NFW, aby výsledný objem byl 11 µL. Dále byl přidán primer *oligo(dT)*<sub>12-18</sub> (1 µL) a 10mM deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP; 1 µL). Vzniklý premix I (13 µL) byl inkubován při 65 °C v termocykléru a následně umístěn na led. Použitý program je uveden v **Tab. 3.3**.

K premixu I bylo dále přidáno 7 µL premixu II obsahujícího 1 µL reverzní transkriptázy *Superscript III* (200 U), 4 µL 5× koncentrovaného pufru *First Strand*, 1 µL 0,1M dithiotreitolu a 1 µL inhibitoru *RNaseOUT*. Směs byla důkladně promíchána pomocí pipety a umístěna do termocykléru; Před vrácením do termocykléru bylo kontrolováno, zda se roztok nachází na dně mikrozkuhavky; pokud ne, obsah byl krátce centrifugován.

Přesný teplotní program je uveden v Tab.1 níže.

**Tab. 3.3:** Teplotní program pro syntézu cDNA:

| 5 min při 65 °C | \* | 50 min při 50 °C | 5 min při 85 °C | 4 °C |

**Poznámka:** První krok se týká pouze premixu I. \* v tomto bodě je roztok umístěn na led (1 min) a pokračuje se přidáním premixu II.

### 3.2.2.3 Kvantitativní PCR s cDNA vybraných transkriptů

Cílem qPCR bylo stanovit relativní expresi transkriptů kandidátních receptorů a prekurzorového proteinu PBANp. Všechny vzorky cDNA byly před použitím v reakci 5× ředěny NFW.

Primery specifické pro studované transkripty (tabulka primerů je uvedena v **Tab. 3.4**) byly navrženy pomocí serveru *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Před samotným stanovením cDNA transkriptů byla ověřena specifita navržených primerů na spojených vzorcích cDNA ze všech věků použitých jedinců pro danou tkáň v ředění 1×, 10×, 100× a 1000×.

Stanovení probíhalo na 96jamkové destičce s využitím technických duplikátů. Do každé jamky bylo umístěno 20 µL reakční směsi, z toho 18 µL základního roztoku a 2 µL

templátu cDNA. Základní roztok obsahoval mastermix *LightCycler 480 SYBR Green I Master* a směs 2 příslušných primerů (každý o výsledné koncentraci 1,25  $\mu$ M).

Podmínky qPCR byly následující: vzorek byl po dobu 60 s zahříván na 95 °C, poté následovalo 45 cyklů (1 cyklus = 95°C, 30 s), následně byl vzorek po 30 s chlazen na 55°C a dále znovu 30 s zahříván na 72°C. Finální krok syntézy trval 2 minuty při teplotě 72°C.

**Tab. 3.4:** Sekvence primerů pro qPCR

Primer	Sekvence aminokyselin	T <sub>m</sub> [°C]
Bte_PBANp ( <i>forward</i> )	TCAAGCAACGCAGTTCACACT	60
Bte_PBANp ( <i>reverse</i> )	CTCGGAGTTGGTGTCCAAGG	60
Bte_NCr ( <i>forward</i> )	GGCAGGAGAAGTTGGACTACC	60
Bte_NCr ( <i>reverse</i> )	TATTCACGCCTTCTCGACCTG	60
Bte_NUr2 ( <i>forward</i> )	ACGAAACCAGTCCGACTCTG	60
Bte_NUr2 ( <i>reverse</i> )	CGAGTATTCCGAGCGTGACA	60
Bte_GNRHr ( <i>forward</i> )	TCATCATCTGCTGGACACCG	60
Bte_GNRHr ( <i>reverse</i> )	TAAGTCTGCGTTGGGTGGTG	60
PLA2 ( <i>forward</i> )	GGTCACACCGAAACCAGATT	60
PLA2 ( <i>reverse</i> )	TCGCAACACTTCGTCATTTC	60
EEF1a ( <i>forward</i> )	AGAATGGACAAACCCGTGAG	60
EEF1a ( <i>reverse</i> )	CACAAATGCTACCGCAACAG	60

Účinnost jednotlivých párů primerů byla vypočtena pomocí vzorce:

$$E (\%) = (10^{(-1/\text{slope})-1}) \times 100.$$

Kalibrační křivky (kde  $y = Ct$  a  $x = \log_{10}$ ) odpovídající množství vstupujících genů a příslušných RT-qPCR amplikonů byly následující:

$$y = -3,79x + 37,13; R_2 > 0,99$$

$$y = -3,65x + 38,29; R_2 > 0,99$$

$$y = -3,56x + 34,69; R_2 > 0,99$$

$$y = -3,65x + 38,58; R_2 > 0,99$$

$$y = -3,43x + 35,20; R_2 > 0,99$$

### 3.2.3 Klonování sekvencí z cDNA a exprese proteinů v kvasinkách

#### 3.2.3.1 PCR s Phusion DNA polymerázou

Reakční směs obsahovala 10  $\mu$ L 5 $\times$  koncentrovaného GC pufru, 3  $\mu$ L 10mM dNTP mixu, oba primery (1  $\mu$ L *reverse* + 1  $\mu$ L *forward*, každý o koncentraci 25  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ L DNA polymerázy Phusion a 1  $\mu$ L templátu. Roztok byl doplněn NFW na objem 50  $\mu$ L. Teplotní průběhy reakcí s SDR1 a PPR jsou uvedeny v tabulkách **Tab. 3.6** a **Tab. 3.7**, sekvence použitých primerů v **Tab. 3.6**.

**Tab. 3.6:** Sekvence primerů pro PCR

Primer	sekvence aminokyselin	T <sub>m</sub> [°C]
Bte_PPR ( <i>forward</i> )	ATGGATCCAGATAAAATATTATACTTATTATATTC	55
Bte_PPR ( <i>reverse</i> )	ACAATAATGCGGCCGCTTAAAAAATATAAGGAAG TAGAA	50
Bte_SDR1 ( <i>forward</i> )	ATGGATCCAATCGTTGGACCGGTAAAG	55
Bte_SDR1 ( <i>reverse</i> )	AATAATGCGGCCGCTCAATCCCGCTGTGGG	54

**Tab. 3.7:** Teplotní program PCR s Phusion DNA polymerázou pro PPR. \*opakování proběhlo 40x.

Cílová teplota °C	Rampa s	Opakování
98	60	-
98	10	+
50	20	+
72	45	+
72	600	-
4	$\infty$	-

**Tab. 3.8:** Teplotní program PCR s Phusion DNA polymerázou pro SDR1 (cDNA mozku). \*opakování proběhlo 45x.

Cílová teplota °C	Rampa s	Opakování
98	60	-
98	10	+
50	20	+
72	20	+
72	600	-
4	1200	-

### 3.2.3.2 Agarózová elektroforéza DNA

Pro vyhodnocení výsledku PCR nebo pro účely purifikace DNA byla použita elektroforéza v 1% agarózovém gelu v TAE pufru. Objem 10–50  $\mu\text{L}$  vzorku smíchaného v poměru 4:1 se vzorkovým pufrem. Jako standard bylo využito 1 kbp standardu.

Elektroforéza probíhala několik desítek minut při napětí 130 V.

### 3.2.3.3 Purifikace amplikonů po PCR

K purifikaci amplikonů byl využíván *QIAquick PCR Purification Kit*. Purifikovány byly celkem tři vzorky z PCR: PBANp-1 (200 nukleotidů, cDNA knihovna mozku), SDR1 (knihovna 22.cyklu SDR1 z qPCR) a PBANp-2 (knihovna 22.cyklu PBANp z qPCR). Ke vzorku byl nejprve přidán pětinašobek PB Binding pufru a vzorek byl centrifugován. Standardní *QIAquick spin* kolonka byla umístěna do 2 mL sběrné ependorfky, vzorek byl nadávkován na kolonu a poté 60 s centrifugován. Supernatant byl dále odstraněn a na kolonku nanášeno 750  $\mu\text{L}$  PE promývacího pufru s ethanolem, následovala další centrifugace (60 s). Supernatant byl posléze opět odstraněn a kolonka minutu centrifugována, aby došlo k odstranění veškerého promývacího pufru. Následně byla kolonka umístěna do čisté 1,5 mL ependorfky.

Eluce DNA byla prováděna 50  $\mu\text{L}$  vody (pH = 7). Kolonka byla opět minutu centrifugována. U výsledných vzorků PBANp-1 a PBANp-2 byla změřena koncentrace a vzorek SDR1 byl dále restriktivně štěpen.

#### 3.2.3.4 Extrakce amplikonů z gelu

K extrakci DNA z agarózového gelu byl použit *QIAquick Gel Extraction kit*.

Ke 100 mg výřezu gelu bylo přidáno 300  $\mu\text{L}$  *Buffer QG*. Směs byla za občasného promíchání zahřívána při 50 °C, dokud se gel zcela nerozpustil. Následně byla provedena kontrola zbarvení: pokud byl roztok žlutý, bylo k němu přidáno 100  $\mu\text{L}$  2-propanolu a směs byla důkladně promíchána. Poté byl roztok nanesen na *QIAquick* kolonu umístěnou ve sběrné zkumavce. Následovala centrifugace (15 000 RPM, 1 min). Dalším krokem bylo odstranění eluátu a aplikace 750  $\mu\text{L}$  *Buffer PE* přímo na kolonu, následovaná centrifugací (15 000 RPM, 1 min). Eluát byl poté znovu odebrán a kolona centrifugována (15 000 RPM, 1 min). V závěrečném kroku byla kolona přenesena do mikrozukavky a bylo na ni aplikováno 30  $\mu\text{L}$  NFW. Po inkubaci 1 min následovala poslední centrifugace (15 000 RPM, 1 min).

#### 3.2.3.5 Restrikční štěpení DNA

Pro restrikční štěpení SDR1/PPR bylo nejprve k roztoku přidáno 6,66  $\mu\text{L}$  standardního *NEB 3.1* pufru, dva druhy restriktáz (0,83  $\mu\text{L}$  + 0,83  $\mu\text{L}$ , pomalejší *NotI* + rychlejší *BamHI*), objem doplněn na 66,6  $\mu\text{L}$  vodou a vortexován. Vzorek byl inkubován při 37 °C po dobu 1 hodiny.

Pro analýzu pak bylo k celému objemu vzorku přidáno 5  $\mu\text{L}$  *loading* pufru.

#### 3.2.3.6 Ligace DNA

Pro ligace SDR1/PPR DNA byla nejprve připravena reakční směs, přičemž po přidání ligázy bylo s roztokem nakládáno velmi opatrně – byl míchán pouze ručně a rozhodně ne vortexován. Reakční směs obsahovala: 2  $\mu\text{L}$  pufru T4 (10 $\times$  konc.), 2,8  $\mu\text{L}$  štěpené plazmidové DNA, 15  $\mu\text{L}$  štěpené inzerované DNA, 1  $\mu\text{L}$  T4 DNA ligázy a vodu do objemu 20  $\mu\text{L}$ .

Reakční směs byla inkubována přes noc. Alikvot směsi byl následně použit pro transformaci kompetentních buněk *E. coli*.

#### 3.2.3.7 Transformace kompetentních bakterií

Byla využita transformace ligované plazmidové DNA do chemicky kompetentních buněk kmene *E. coli* DH5 $\alpha$  teplotním šokem.

Buněčná suspenze *E. coli* byla nejprve rozmrazena na ledu (cca 10 minut). Do mikrozkušavek bylo následně nadávkováno 50  $\mu\text{L}$  této buněčné suspenze, přidána plazmidová DNA o koncentraci 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Směs byla 5 $\times$  jemně promíchána (“cvrknutím“) a umístěna na dalších 20 minut na led. Poté byla bez promíchání vložena do lázně o teplotě 42  $^{\circ}\text{C}$  na 90 s. Po teplotním šoku byla směs vrácena na 2 minuty na led. Bylo přidáno 500  $\mu\text{L}$  LB média a směs byla inkubována 1 hod při teplotě 37  $^{\circ}\text{C}$ ; poté byla protřepána a podíl 100  $\mu\text{L}$  očkovan na LB agar s 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicilinem.

Nárůst *E. coli* s plazmidy probíhal po dobu 24 hod při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Vybrané kolonie byly pomocí sterilního párátko očkovány do 3 mL LB média s ampicilinem a kultivovány přes noc při 37  $^{\circ}\text{C}$ , 500 RPM.

### 3.2.3.8 PCR amplifikace sekvencí z bakterií

Přítomnost klonované sekvence v plazmidu byla ověřena PCR amplifikací z bakteriální kultury s využitím Taq DNA polymerázy.

Reakční směs obsahovala 2,5  $\mu\text{L}$  10 $\times$  koncentrovaného Taq pufru, 0,5 $\mu\text{L}$  10mM dNTP mixu, oba primery (0,5  $\mu\text{L}$  *reverse* + 0,5  $\mu\text{L}$  *forward*, každý o koncentraci 25  $\mu\text{M}$ ), 0,15  $\mu\text{L}$  Taq DNA polymerázy (5 U/ $\mu\text{L}$ ) a 1  $\mu\text{L}$  templátu. Objem byl doplněn NFW na celkový objem 25  $\mu\text{L}$ . Teplotní průběh reakcí je uveden v **Tab. 3.9**.

**Tab. 3.9:** Teplotní program pro PCR s Taq.

Cílová teplota $^{\circ}\text{C}$	Rampa s
95	600
95	25
45	30
68	120
68	600
4	pauza

### 3.2.3.9 Izolace plazmidové DNA z bakterií

Po transformaci DNA do *E. coli* byla plazmidová DNA izolována z kultur vybraných kolonií. K tomuto účelu byl použit *Zyppy Plasmid Miniprep kit*. Aby jej bylo možné využít, byl nejprve snížen objem cca 3 mL kultury pomocí centrifugace (15 000 RPM, 1 min) na 600 µL.

Buňky byly nejprve resuspendovány a po přidavku 100 µL 7× koncentrovaného lyzačního pufru suspenze opatrně 10× otočena. Následoval do 2 min přidavek 350 µL vychlazeného neutralizačního pufru, směs byla prudce promíchána a centrifugována (15 000 RPM, 3 min). Objem 900 µL supernatantu byl opatrně odebrán a aplikován na centrifugační kolonu *Zymo-Spin IIN* umístěnou ve sběrné zkumavce. Následovala centrifugace (15 000 RPM, 15 s). Po centrifugaci byl odstraněn eluát, na kolonu bylo aplikováno 200 µL *Endo-Wash Buffer* a směs byla opět centrifugována (15 000 RPM, 30 s). V dalším kroku bylo aplikováno 400 µL *Zyppy Wash Bufferu*, následováno další centrifugací (15 000 RPM, 1 min). V závěrečném kroku pak byla kolona přenesena do jímací mikrozkušavky a bylo na ni aplikováno 30 µL NFW. Po inkubaci 1 min následovala poslední centrifugace (15 000 RPM, 30 s). Výsledná koncentrace DNA byla změřena pomocí spektrofotometru *NanoDrop*.

### 3.2.3.10 Transformace kompetentních kvasinek

Suspenze kompetentních buněk *S. cerevisiae* (50 µL) byla nejprve rozmrazena a centrifugována (14000 RPM, 2 min). Peleta byla suspendována v 360 µL transformačního roztoku FCC obsahujícího 5 µg plazmidové DNA; směs byla poté důkladně promíchána. Poté proběhla inkubace (60 min při 42 °C), centrifugace (14000 RPM, 30 s) a peleta byla následně opět suspendována v 1 mL vody.

100 µL výsledné suspenze kvasinek s SDR1 a PPR bylo dávkováno v ochranném boxu pomocí skleněných kuliček na *SC-U* agar (viz. oddíl 3.2.3.11). Misky byly inkubovány 3 dny při 30 °C za stálého, pozvolného třepání na třepačce s kontrolou teploty [109].

### 3.2.3.11 Kultivace kvasinek

SC-U médium (bez uracilu) pro kultivaci kvasinek s SDR1 mělo následující složení: 20 g glukózy + 6,7 g standardní *DIFCO Yeast Nitrogen* báze (bez obsahu aminokyselin)

+ 5,7 mL 35x koncentrovaného roztoku *BRENT Supplement Mixture* bez uracilu, aby docházelo k selektivnímu tlaku na kvasinky. Média byla autoklávována. Pokud bylo médium nanášeno na petriho misky, bylo k němu před nalitím přidáváno 20 g/L agaru a 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> ionty a voda do 250 mL. K médiím byl přidáván 1 mM roztok substrátu farnesolu.

#### **3.2.3.12 Zpracování kvasinek před analýzou**

Kvasinky pro analýzu byly přelity do 50 mL falkonek a stočeny na centrifuze (2000 RPM, 4 °C, 3 min), a promývány vodou (20 mL destilované vody). Supernatant byl průběžně odléván. Peleta byla nakonec suspendována v 500 µL roztoku (20%v glycerolu + 5%v glukózy), přenesena do 1,5 mL endorfek a uložena při 4 °C.

Před SDS-PAGE byl ke vzorkům ještě navíc přidáván premix (270 µL *protein loading buffer*, 180 µL destilované vody, 18 µL *protease inhibitor cocktail*). Finální směs obsahovala 52 µL premixu a 25 µL roztoku kvasinek. Po desetiminutové sonikace byla směs před SDS-PAGE uložena v -20 °C.

#### **3.2.4 Izolace peptidů z tkání a jejich analýza**

Cílem této části práce bylo získat nativní PBAN nebo jiný neuropeptid z PBAN/pyrokininové rodiny ze tkáně čmeláka zemního.

Způsob izolace z živočišné tkáně byl zvolen zejména na základě výzkumu předchozích prací na mūrách (viz oddíl 1.2).

##### **3.2.4.1 Extrakce peptidů z hlav a labiálních žláz**

Aby bylo možné získat detekovatelné množství neuropeptidů, bylo použito velké množství biologického materiálu získaného v průběhu 3 měsíců z různě starých samců čmeláka zemního. Hlavy (vnitřek hlavy po odstranění labiální žlázy) i labiální žlázy byly uchovány při -20 °C s množstvím 50 µL acetonu na žlázu. Celkem byly kolegou J. Kindlem nasbírány zvlášť hlavy a labiální žlázy ze 750 samců. Biologický materiál byl rozdělen na dvě části (390 a 360 kusů), se kterými byla extrakce provedena zvlášť.

- **Odtučnění** (odstranění lipidů, terpenů a přebytečné tkáňové vody):

Vzorky byly po odstranění přebytečného acetonu zhruba 5 min homogenizovány v třecí misce na ledu. Homogenát byl centrifugován (9500×g, 5 min, 4 °C), supernatant odebrán a sediment znovu přenesen do třecí misky, kde byl krátce extrahován 30 mL hexanu. Po centrifugaci (9500 g, 5 min, 4 °C) a odebrání supernatantu byla peleta přenesena do třecí misky s malým množstvím acetonu. Suspenze byla filtrována přes papírové filtry, retentát byl posléze sušen na vzduchu 30 min a zvážen.

- **Kyselá extrakce I:**

Při první kyselé extrakci bylo do třecí misky k odtučněné sušině přidáno 5 mL extrakčního roztoku II, celý obsah během 5 min důkladně rozetřen a poté sonikován (maximální výkon, 10 min). K získané suspenzi bylo přidáno ještě 10 mL extrakčního roztoku II, směs byla centrifugována (9500×g, 5 min, 4 °C) a supernatant byl uschován. Přídavek extrakčního roztoku II a následná sonikace, centrifugace a uchování supernatantu byly ještě 2 opakovány; jednotlivé přídavky extrakčního roztoku II činily 15 mL a 20 mL. Supernatanty získané v průběhu extrakce byly spojeny (~50 mL) a uloženy při -20 °C.

- **Kyselá extrakce II:**

Při druhé extrakci bylo do třecí misky k výsledné peletě z první extrakce přidáno 5 mL extrakčního roztoku III a vzorek byl znovu důkladně rozetřen. Poté bylo ke směsi přidáno 5 mL extrakčního roztoku III. Směs byla sonikována (maximální výkon, 10 min) a centrifugována (9500×g, 5 min, 4 °C). V dalších dvou krocích byl zopakován předchozí postup s tím rozdílem, že v každém kroku bylo přidáno 20 mL extrakčního roztoku III. Supernatanty získané v průběhu extrakce byly spojeny (~50 mL) a uloženy při -20 °C.

### **3.2.4.2 Frakcionace peptidů pomocí SPE**

Pro účely zjednodušení identifikace peptidů ve směsi byly extrakty před analýzou pomocí LC-MS frakcionovány na reverzní fázi.

Extrakty peptidů z tkání byly aplikovány na SPE kolonu *BondElut C18* (2 g) předem ekvilibrovanou na eluent A (0,1% kyselina mravenčí ve vodě). Po promytí kolony 20 mL eluentu A byly adsorbované látky eluovány postupně 10 mL 10%, 30%, 60%, 90%

eluentu B (0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu); kolona byla nakonec promyta 50 mL eluentu B. Získané frakce byly uchovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.4.3 Příprava vzorku pro LC-MS

Z frakcí získaných po SPE byla nejprve odstraněna většina acetonitrilu pomocí rotační vakuové odparky; frakce byly poté 2 dny lyofilizovány.

Lyofilizované frakce peptidů byly nejprve zváženy a rozpuštěny v solubilizačním roztoku. K lyofilizované frakci ve 4mL vialce bylo přidáno takové množství solubilizačního roztoku, aby výsledná koncentrace suspenze byla  $<50\text{ mg/mL}$  a zároveň výsledný objem nebyl nikdy nižší než  $100\text{ }\mu\text{L}$ .

Směs byla důkladně míchána a třepána, aby došlo ke styku roztoku se všemi částicemi lyofilizátu. Poté následovalo cca 20 min sonikace (nejvyšší výkon,  $\sim 20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Suspenze byla poté sklepnuta na dno nádoby a celá přenesena do 1,5mL mikrozkušavky, v níž byla centrifugována (14 000 RPM, 3 min). Objem  $100\text{ }\mu\text{L}$  výsledného supernatantu byl převeden do  $150\text{ }\mu\text{L}$  insertu ve vialce; pokud bylo roztoku více než  $100\text{ }\mu\text{L}$ , byl zbytek uchován ve zkumavce při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Hmotnosti lyofilizovaných frakcí a použité objemy solubilizačního roztoku jsou uvedeny v **Tab. 3.10**.

**Tab. 3.10:** Solubilizace lyofilizovaných frakcí peptidů z CLG a mozků.

Vzorek / Frakce	$m_{\text{lyofilizátu}}$ [mg]	$V_{\text{Solubilizačního r.}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	Nástřik na kolonu [ $\mu\text{L}$ ]
CLG / 0%	38,06	760	2, poté 10
CLG / 10%	1,29	322,5	5
CLG / 30%	2,48	620,0	5
CLG / 60%	1,83	457,5	5
CLG / 90%	0,40	100,0	5
HLAVA / 0%	43,12	861,0	5
HLAVA / 10%	1,73	345,5	5
HLAVA / 30%	3,39	676,0	5
HLAVA / 60%	2,08	415,0	5
HLAVA / 90%	0,46	100,0	5

#### 3.2.4.4 SDS-PAGE

SDS-PAGE byla prováděna dvakrát – jednou s koncentrovanějším a podruhé s méně koncentrovaným dělicím gelem podle standardního SDS-PAGE protokolu [110].

20% dělicí gel obsahoval 0,05 mL 10%(v) SDS pro záporně nabitě peptidy/proteiny, 0,3 mL vody, 3,3 mL 30%(v) roztoku síťovaného akrylamidu, 10 µL TEMED, 1,3 mL 1,5 M Tris (pH = 8,8), a jako iniciátor asociace 0,05 mL 10%(v) peroxidisíranu amonného. Tento gel byl nadávkován a překryt vrstvičkou butanolu. 1 mL 5%(v) zaostřovacího (*stacking*) gelu obsahoval 1,1 mL Triss, akrylamidu, H<sub>2</sub>O a SDS, 0,01 mL 10%(v) peroxidisíranu amonného a 0,005 mL TEMED. Před jeho nadávkováním na dělicí gel byl odsát butanol.

Na gel byly dávkovány frakce mozku 0% a 30% (oba 10 µL) a standardy peptidů (10 µL obsahujících 1 mM *beta*-NP, *gamma*-NP, DH, PBAN1 a PBAN2) a ELFO standard (5 µL). Před dávkováním na gel bylo ještě ke všem vzorkům kromě ELFO standardu přidáno 20 µL redukčního pufru a směs zahřívána v lázni 2 min na 100 °C. Poté byly vzorky nadávkovány na gel, vana dolita Tris pufrem a byla zahájena elektroforéza (200 V, 1 h).

Výsledný gel byl promýván 2 minuty ve vodě (3x) a poté k němu bylo přidáno 50 mL *Coomasie BB stain* barvy a gel byl na 35 h umístěn na třepačku. Po ukončení barvení byl gel znovu důkladně promyt vodou a pak znovu ještě 30 minut barven v koncentrovaném *Coomasie*. U výsledných vzorků byla změřena koncentrace a stanovena kalibrační křivka, která byla využita pro účely vytvoření vhodné metody LC-MS.

Při pokusu s 12% dělicím gelem probíhala příprava obdobně, nicméně bylo dávkováno pouze 5 µL vzorků s 10 µL redukčního pufru a směs zahřívána v lázni 5 min při 100 °C. Byly dávkovány jak všechny frakce mozku, tak frakce labiální žlázy (10 vzorků).

#### 3.2.5 Analytické metody

##### 3.2.5.1 Plynová chromatografie

Pro analýzu reakční směsi po *in vitro* inkubaci byl použit plynový chromatograf vybavený analytickou kolonou pro kapilární GC (5 % fenyl-arylen, 95 % dimethylpolysiloxan) a plamenoionizačním detektorem (GC-FID).

### Plynová chromatografie s plamenoionizační detekcí

Automatickým dávkovačem nebo ručně byl do předního inletu (250 °C, splitovací poměr byl variabilní v rozmezí 1:1 až 100:1 v závislosti na koncentraci konkrétních analytů, nejčastěji byl splitovací poměr 60:1) dávkován 1 µL vzorku. V kolonovém prostoru byl použit následující teplotní program:

Gradient °C.min <sup>-1</sup>	Cílová teplota °C	Rampa min
0	50	1,00
10	200	0,00
50	300	5,00

Průtok mobilní fáze (helium) byl 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Analyty elující z kolony byly detekovány spálením v detektoru (300 °C, průtok vodíku 40 mL.min<sup>-1</sup>, průtok vzduchu 400 mL.min<sup>-1</sup>, průtok dusíku (*make-up flow*) 20 mL.min<sup>-1</sup>). Chromatogramy byly automaticky integrovány a pro výpočet stupně konverze byly použity plochy píků.

### Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Při analýze pomocí GC/MS byl dávkován 1 µL vzorku do předního inletu (250 °C, splitovací poměr 40:1). Během analýzy byl v kolonovém prostoru použit následující teplotní program:

Gradient °C.min <sup>-1</sup>	Cílová teplota °C	Rampa min
0	50	1,00
4	200	0,00
25	300	2,00

Průtok mobilní fáze (helium) byl 1,2 mL.min<sup>-1</sup>. *Transfer line* měla teplotu 260 °C. Analyty byly detekovány v pozitivním módu elektronové ionizace (iontový zdroj 200 °C, emisní proud 45 µA) pomocí kvadrupólového analyzátoru (skenovací rozmezí 29–650, frekvence 5 s<sup>-1</sup>).

### Dvourozměrná plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Pomocí dvourozměrné plynové chromatografie byly analyzovány lipidy z kvasinkových kultur PPR a SDR1. Průtok mobilní fáze (helium) byl  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Jako primární kolona byla použita nepolární kolona *Zebron ZB-5ms* ( $30 \text{ m} \times 250 \text{ }\mu\text{m I. D.} \times 0.25 \text{ }\mu\text{m}$  tloušťka filmu, *Phenomenex*), jako sekundární kolona byla použita polárnější *BPX-50* ( $1.5 \text{ m} \times 100 \text{ }\mu\text{m I. D.} \times 0.10 \text{ }\mu\text{m}$  tloušťka filmu, *SGE*). Injektor byl vyhříván na teplotu  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ . Teplotní program byl následující:

Gradient $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	Cílová teplota $^\circ\text{C}$	Rampa min
0	100	1,00
4	320	0,00
0	320	5,00

Analyty byly detekovány v pozitivním módu elektronové ionizace (iontový zdroj  $220 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-70 \text{ V}$ ) pomocí průletového analyzátoru *LECO Corp. ChromaTOF* (skenovací rozmezí 30–600, frekvence  $5 \text{ s}^{-1}$ , 1800 V). Transfer line měla teplotu  $260 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 3.2.5.2 Kapalinová chromatografie

Analýza na LC-MS byla prováděna s nástřikovým objemem  $5 \text{ }\mu\text{L}$  (pokud není uvedeno jinak) se sběrem dat pouze MS a MS+MS<sup>2</sup>. Analýza trvala celkem 60 min, průtok fáze kolonou byl  $0,2 \text{ mL}/\text{min}$  při  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (teplota nástřiku, detektoru i kolony).

Frekvence sběru dat detektoru byla 50 Hz, a skenování probíhalo v rozmezí hmot  $M_r = 100,00 - 2000,00$ , s kolizní energií  $60 \text{ }\mu\text{A}$ . Gradientový program je uveden v tabulce níže (mobilní fáze B = 0,1% kyselina mravenčí, mobilní fáze C = 0,1% methanol):

<b>Čas</b>	<b>Složení mobilní fáze</b>
min	B/C [%]
1,00	95/5
35,00	0/100
45,00	0/100
49,75	95/5
59,75	95/5

Dodatečná LC-MS analýza byla prováděna Mgr. Martinem Hubálkem, Ph.D. v rámci skupiny *Hmotnostní spektrometrie* na UOCHB AV ČR. Výsledky jsou uvedeny v oddílu 4.

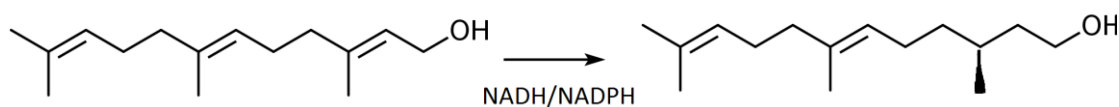
## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Biosyntéza (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu

#### 4.1.1 *In vitro* inkubace labiálních žláz *B. terrestris*

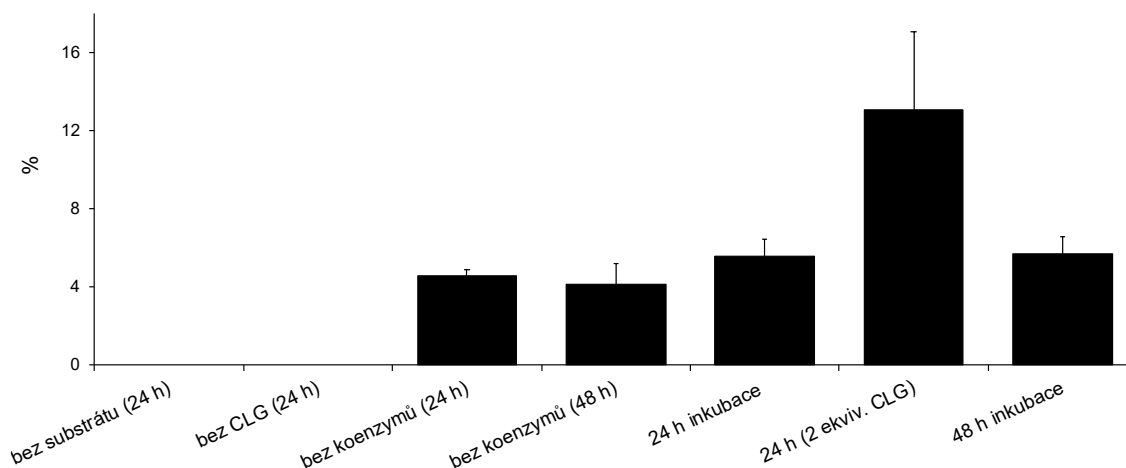
Cílem této fáze výzkumu bylo podrobněji zkoumat biosyntézu majoritní složky samčího feromonu (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu, ke které dochází v hlavové části labiální žlázy a jejímž předpokládaným posledním krokem je stereospecifická enzymová redukce 2,3-*cis*-dvojných vazby farnesolu (viz **Obr. 4.1**). Z labiálních žláz byly připraveny homogenáty a následně použity pro *in vitro* inkubace se substrátem farnesolem. Aby bylo možné zkoumat redukční proces v čase a byl zajištěn dostatek redukovaných koenzymů, byl v inkubační směsi s přidanými koenzymy NAD<sup>+</sup> a NADP<sup>+</sup> použit NADH/NADPH generující systém (enzym G6PD a glukóza-6-fosfát), jenž sloužil k *in situ* recyklování redukovaných forem.

Inkubace byly prováděny za různých podmínek v dvou sadách, jejichž výsledky, získané analýzou produktů pomocí GC-FID, jsou uvedeny na **Obr.4.2** – **Obr. 4.6**.



**Obr. 4.1:** Schéma enzymově katalyzované redukce farnesolu na (*S*)-2,3-dihydrofarnesol.

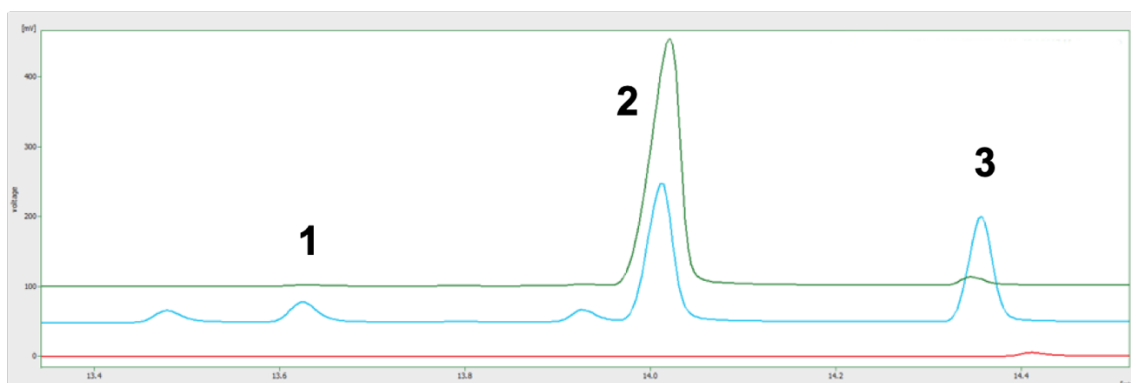
Při *in vitro* inkubacích dle předpokladu docházelo jak ke tvorbě (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu (cca 5–10 %), tak k nežádoucím oxidačním reakcím (cca 40 %), při nichž vznikala směs různých aldehydů odvozených od farnesolu. K těmto parazitickým reakcím docházelo ve všech *in vitro* inkubacích nejspíše důsledkem přítomnosti oxidovaných koenzymů, jež sloužily jako substráty pro dehydrogenázy, a také přístupem vzdušného kyslíku během inkubace. Schematický náčrt oxidačních reakcí je uveden na **Obr. 1.2.1**. Tento rovněž enzymově katalyzovaný proces byl podrobněji zkoumán v rámci předchozí studie [108].



**Obr. 4.2.** Množství vznikajícího (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu, vyjádřené jako procento původního substrátu farnesolu, v závislosti na délce inkubace a přidávaném množství homogenátu CLG při *in vitro* inkubacích.

Výsledky měření z prvních *in vitro* inkubací jsou uvedeny na **Obr. 4.2**. Ukazují, že u kontrolních vzorků bez substrátu a bez homogenátu labiální žlázy nedochází k vzniku DHF, zatímco u kontrolních vzorků bez přídavku koenzymů DHF vzniká v podobné míře jako při jejich přídavku (při 24h i 48h inkubaci). Tento poznatek je logický, neboť v rámci homogenizace nebyla provedena žádná frakcionace a homogenát tedy obsahoval všechny složky buněk CLG, tj. i příslušné koenzymy, jež zřejmě posloužily jako substráty pro reakci. Doba inkubace se neukázala jako důležitý faktor, jelikož po 24hod i 48hod inkubaci je množství DHF podobné. Markantnější rozdíl v množství DHF byl zaznamenán při přídavku 2 ekvivalentů homogenátu labiální žlázy, kdy bylo množství vzniklého alkoholu až dvojnásobné oproti běžné inkubaci. Tím se ověřil náš předpoklad, že limitujícím prvkem v inkubační směsi je množství přidaného homogenátu. Vzhledem ke zjištění, že v labiální žláze se nachází dostatečné množství kofaktorů pro průběh studované reakce, nebyly již  $\text{NAD}^+$  ani  $\text{NADP}^+$  v dalších *in vitro* inkubacích přidávány.

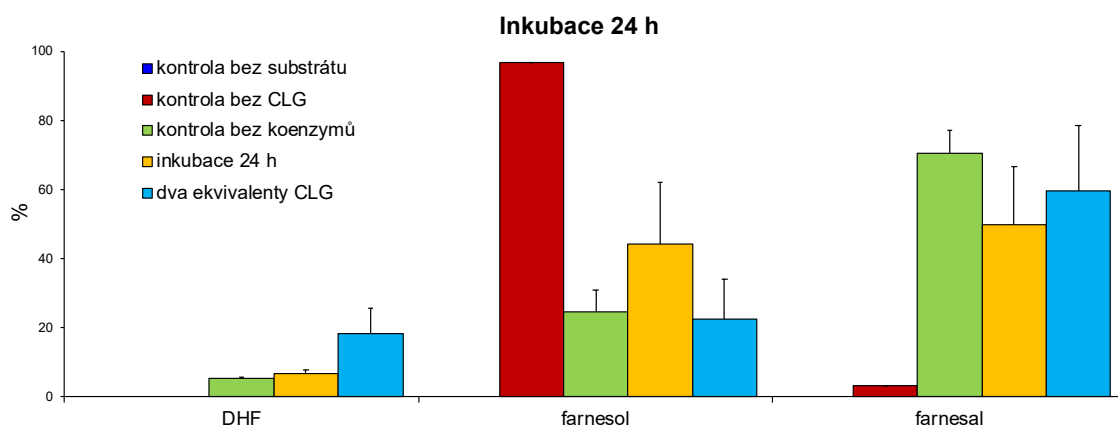
Na **Obr. 4.3** jsou uvedeny chromatogramy z GC-FID ukazující majoritní složky inkubační směsi v různých typech vzorků. Ukazuje se, že substrát farnesolu defaultně obsahoval nepatrné množství farnesalu. Ve vzorku bez přídavku CLG a bez substrátu nevznikaly žádné produkty, zatímco ve vzorku s přídavkem homogenátu CLG vznikal jak DHF, tak významné množství nežádoucího farnesalu. Zároveň ve vzorku obsahujícím substrát bez přídavku CLG nevznikaly žádné další produkty.



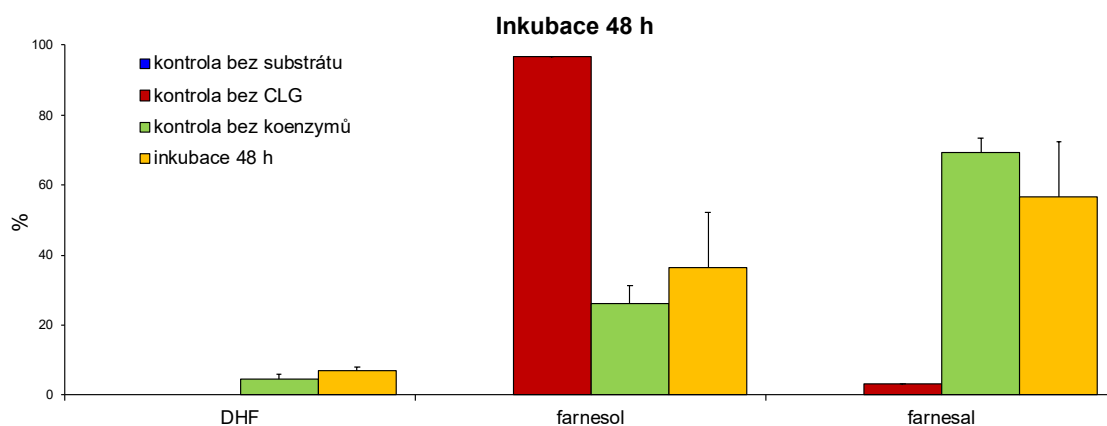
**Obr. 4.3:** Výřezy chromatogramů ze vzorků po *in vitro* inkubaci. **Červená** linie označuje chromatogram vzorku bez homogenátu CLG a bez substrátu, **modrá** linie označuje chromatogram vzorku obsahujícího substrát s CLG, **zelená** linie označuje chromatogram vzorku obsahujícího substrát farnesolu bez přidavku CLG. **1** DHF, **2** farnesol, **3** farnesal.

V grafech na **Obr. 4.4** a **Obr. 4.5** jsou uvedeny statistické údaje o hodnotách DHF, farnesolu a farnesalu, dominantních složek vznikajících při *in vitro* inkubacích a množství přidaného/zbývajícího farnesolu, po 24- a 48-hodinové inkubaci. Červený sloupec označuje kontrolní vzorek se substrátem bez přidavku ekvivalentu CLG. Je z něj jasné patrné, že ve vzorku bez enzymatické směsi nevzniká DHF a také že použitý substrát farnesolu obsahoval detekovatelné množství aldehydu farnesalu (farnesol podléhá spontánní oxidaci). Ve vzorcích bez přidavku koenzymů (zelený sloupec) probíhá redukční reakce v podobné míře jako při přidavku koenzymu (žlutý sloupec), pouze dochází k mírně menší tvorbě DHF. Dále je patrné, že pokud není k enzymatické směsi přidán substrát, nevznikají žádné produkty (tmavě modrý sloupec).

Přídavek dvou ekvivalentů CLG byl zkoumán pouze při 24-hodinových inkubacích (světle modrý sloupec). Ukazuje se, že při přidavku dvojnásobku enzymatické směsi vzniká více než dvojnásobné množství 2,3-DHF, přičemž celkové množství aldehydů zůstává zhruba stejné jako při jednom ekvivalentu CLG.



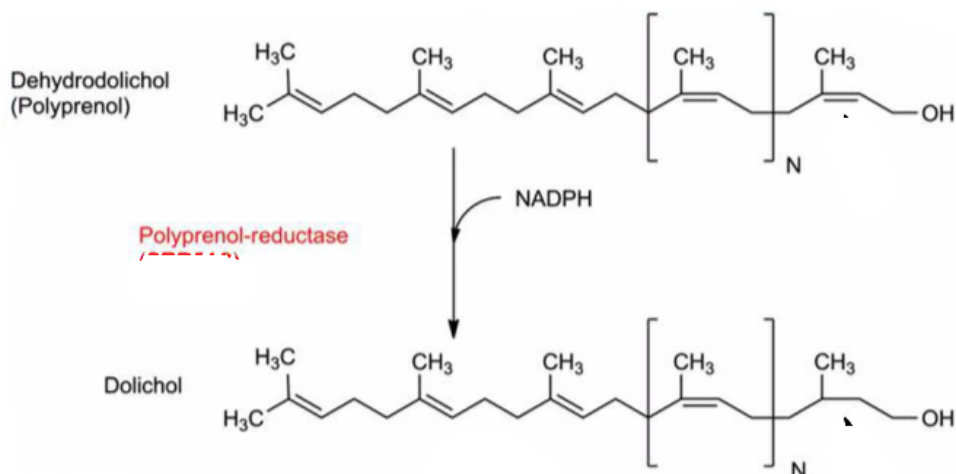
**Obr. 4.4:** Graf vývoje dominantních složek vznikajících při *in vitro* inkubacích během 24 h.



**Obr. 4.5:** Graf vývoje dominantních složek vznikajících při *in vitro* inkubacích během 48 h.

#### 4.1.2 Hledání enzymů potenciálně zapojených do biosyntézy samčího feromonu

Kromě studia biosyntézy při *in vitro* podmínkách jsme se rozhodli identifikovat enzym katalyzující redukci farnesolu na základě transkriptomických dat. Kandidátní enzymy, konkrétně se jednalo o SDR1 a PPR, byly zvoleny na základě průzkumu enzymových databází a na základě předchozího výzkumu [36] a také proto, že jejich katalytická vlastnost je popsána napříč různými organismy. Konkrétně PPR například katalyzuje přeměnu polyprenolu na dolichol (viz **Obr. 4.6**), který slouží v rámci biologických systémů jako membránová kotva. Reakce katalyzovaná PPR je z chemického hlediska totožná s redukcí farnesolu a tím rozdílem, že polyprenol je mnohem delší substrát než farnesol. Široká rodina různých SDR je navíc exprimována v labiální žláze čmeláka, což by mohlo znamenat, že některé z nich by mohly být zapojeny v biosyntéze. Z celé řady transkriptů SDR proteinů byl vybrán kandidát SDR1 s nejvyšší mírou exprese [39].



**Obr. 4.6:** Schematický náčrt redukce polyprenolu na dolichol za katalýzy PPR. Obrázek byl upraven [111].

Celkové proteinové sekvence PPR A SDR1 jsou uvedeny na **Obr. 4.7** a **Obr. 4.8**.

```

MQINIILIIIFIFASLFTGIVGLSLIYMEAYMPIILIVRLFRYKYSVITYQSIKNAEVPKR
WFKHFYVLAAPVSSYVLYLIICKFLWTGNSPKTVIWIILNCLGSRQALVSPSTFIATL
LLTLHCWKRFYETHFVNIFSDNMMNISHYLMGYIHYIGTFICIIIGESDGFVEGSEGNFSW
RRITYVQLICAIICVLSSYVQLRTNFILSNLRCNKDRKIIISTAYKIPHGGLFEYISGALQ
FTEIIIIYILLSIILWQSTNFHYITFWVIINQTVTALILTHKWYIRTFKNYPMSRRILLPYI
F

```

**Obr. 4.7:** *B. terrestris* PPR proteinová sekvence

```

MNRWTGKVAVVTGSSGGIGLAISKALASHGIKIVGLGRRIDKLQDITAEIGKDKFFPIEC
DVTKEEDILKVKWIEEKFGRLDILVNNAGVLSSTPILDSKTEDYRRVIDTNLIAPAIFA
REAVNSMKKCNACGHIINISSIAGLHLEAIAIPIGMYGPSKYGLRALGIELRHEINAACL
NVKITNISPGAVMTDMIKGVQDVVSNNFILKVGDI AEAVIYALGTPETVEIPEITVIPHG
TGFIFPQRD

```

**Obr. 4.8:** *B. terrestris* SDR1 proteinová sekvence

### 4.1.3 Klonování predikovaných enzymů PPR a SDR1

Sekvence DNA predikovaných enzymů PPR a SDR1 byly nejprve amplifikovány pomocí PCR s *Phusion* polymerázou, poté extrahovány z agarózového gelu, dále restričně štěpeny a podrobeny ligaci. Získaný alikvot směsi byl následně použit pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ . Plazmidová sekvence byla po kompletním nárůstu a sklizení *E. coli* ověřena PCR amplifikací a následně izolována. Výsledná koncentrace plazmidové DNA byla změřena spektrofotometricky pomocí *NanoDrop* spektrofotometru, výsledky měření jsou uvedeny v **Tab. 4.1**.

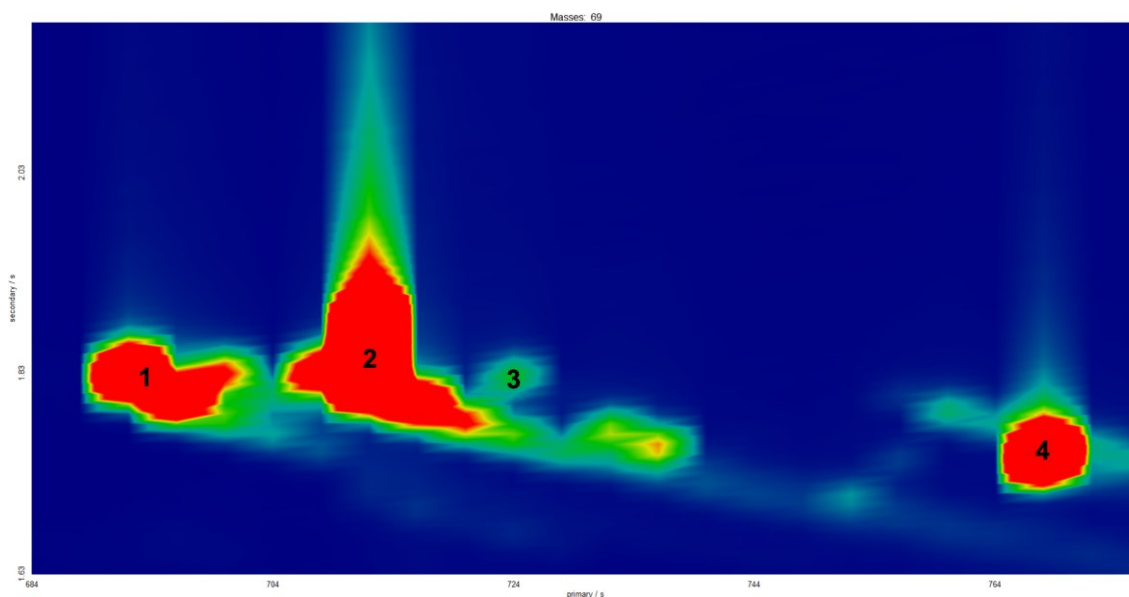
**Tab. 4.1:** Výsledné koncentrace získané DNA PPR a SDR1.

Vzorek	Koncentrace ng/ $\mu$ L	A	A
		$\lambda = 260/280$ nm	$\lambda = 260/230$ nm
PPR	730,3	1,91	2,36
SDR1	718,4	1,92	2,40

Takto získaná DNA byla v závěru transformována do kompetentních kvasinek.

#### 4.1.4 Expresse PPR a SDR1 v kvasinkách

Cílem této fáze výzkumu bylo exprimovat vybrané enzymy ze čmeláka do kvasinek a zjistit, jestli jsou kvasinky s těmito geny schopny redukovat farnesol na (*S*)-2,3-dihydrofarnesol, majoritní složku feromonu. Kvasinky byly kultivovány v přítomnosti 1mM farnesolu. Lipidový extrakt kvasinek byl analyzován pomocí dvourozměrné plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.



**Obr. 4.7:** Výsek z dvourozměrného chromatogramu vzorku extraktu z kvasinek exprimujících PPR. 1 DHF, 2 farnesol, 3 farnesal, 4 farnesylacetát.

DHF vznikal při všech kultivacích, tj. s PPR, s SDR1, i s prázdným plazmidem (negativní kontrola). Z této skutečnosti usuzujeme, že kvasinky mají schopnost přirozeně

(tj. bez uměle exprimovaného enzymu) přetvářet farnesol na DHF. Údaje jsou uvedeny na **Obr. 4.7**. Krom známých složek (DHF, farnesol, farnesal) byl na chromatogramech patrný ještě farnesylacetát, který běžně u čmeláka nevzniká, ale kvasinky jej při našich pokusech syntetizovaly v podobné míře jako DHF.

#### 4.1.5 Biosyntéza feromonu *B. terrestris*

Podařilo se získat navržené sekvence enzymů PPR a SDR1 a následně je exprimovat v kvasinkové kultuře. Kvasinky byly schopny redukovat farnesol na 2,3-DHF, nicméně se ukázalo, že použité kvasinky mají tuto schopnost i přirozeně. Pro přesný popsání enzymové aktivity SDR1 a PPR by bylo třeba pracovat s modelovým organismem, který tuto reduktázovou aktivitu nemá, avšak z časových důvodů toto nebylo provedeno.

## 4.2 PBAN a příbuzné neuropeptidy

Cílem této části výzkumu bylo získat informace o potenciální neuropeptidové regulaci biosyntézy samčího feromonu. Výzkum funkce PBAN u čmeláka zemního navazoval na dlouhodobý projekt zkoumající *de novo* biosyntézu samčího feromonu z lipidických prekurzorů a enzymy zapojené do této biosyntézy [26]. PBAN by mohl ovlivňovat aktivitu nebo expresi enzymů zapojených do tvorby feromonu a tím i celý průběh biosyntézy.

Výzkum u *B. terrestris* byl prováděn v koordinaci s dalšími kolegy a experimenty byly navrhovány na základě literární rešerše týkající se předchozích výzkumů u jiných druhů blanokřídlých nebo motýlů, například u bource *Bombyx mori*, včely medonosné *Apis Mellifera* a mravence *Solenopsis invicta*. U těchto tří druhů byly nalezeny a popsány neuropeptidy z PBAN/pyrokininové skupiny, u bource *B. mori* a mravence *S. invicta* byla navíc popsána jejich biologická aktivita.

>gi|808123036|ref|XM\_003396088.2| PREDICTED: *Bombus terrestris* PBAN-type neuropeptides-like (LOC100651564), transcript variant X1, mRNA

```
CGCACAGTCGTGCTTTTATACGAACGATGCCCGATCTCCTCTCCTTGCTCCTCGGTCTCATTTCG
TCCCGAAATTGAATTGGTTAATTGACAGACTTAATCGAGAACAGATTGTCCGACTGATCGCCTGGGGTGC
CAAGTTCGATCTGTTACAAGTGACAGGGAAAACGCCAAGGTACTATGCTGACATTTTCTGATCTAATAGA
AATTACCTCGGTAAAGCACAGGAGGAAAATCAAATTAAGAGGATTTTACAGTATACTAGCCTAGATTATC
CTATTGGACATGGATTTGTTAAAGGAAAAGTAAACGCATATAACCTAAAACCTTGTCACTTGCCAATTTAA
TAGGATTATCAATTCAATCATCTATAAGAGGTTGCAGTTATTTAGGTAATCCTATTGTATCTTATGTGT
GAACTATTAATCTTCTGTATCGATTATCTAATAAATTCATAATTTCTAATAAGTAACACATAACAAGTAGT
GATAGATTTTTTAAAGGAAAAGTTTCAAGAAATGTTTCTTAAAGGTAGGTTTTTCTGACGGAGAAAACCTATTGC
TATGGACAAGAAAACAAATGAAAATCTAAATAATTTAATTTCAAATAAATGAGAATTCAACAACCTATTCT
CTACATACACTCATCATCCACGTAAGATTCTTTCCACTGTCCACAATTGATCCATTAAAGTTACTATCCT
ATTTCTTTAGAACAGAGAGAAAAACAGAAGAAGGAAAACAATAGAAAGAGAGAGAGGCATAGCTTCGGAG
ATTGAGTTAATCCTGTTACAAATCCCGGTAGAGTCAATGAATCTATCCGTACGAACATTTCCGCCTTGCG
GTGACGACAAAAGAATGAAAGTGAGGATAGGAAAAGAAAAGAGATAAAACAACGATGAGAAAAGCAAAAAGAA
ACGATATGGGGTGGTTGCAAAGTTCTCCCAGGACGTACCCACGATCCTCATTAAAGTATGGAAGAGCGT
AGATCTCGATTGAAATTGAGATGAATCGCTTCGTGGGACGTCAGGATTGGCCTCGGTTGGGGGTGGGTGT
TTTTTCAGTTGAACTTTATTTTCGAATGAAATCGATACTGTCAAGGAAAGGAAGAAGAAAATAAGTTTTA
CTCCATGGAGGCGACAATTGGATGAAAAAGAAAAGAGAAAAGGAAAAATAGAGTAGTGTAAAGGTAGCTTGC
ACCCCTATAAAAACAGCGACTGAACACCGTATCGACATCATTCGCCGACAACGTTCCGCGATAACGACAC
TCAAACGAAGCGATGATCGGTTCCGTTCGCTTTTTGTCTTTCAACCGCCTTATGACCATCACAGTTTGC
TACTGCTATGTGTGGTCTATTTGGTGTCTTCCGCGTTCGGGAGAATACGAAGGTAGAGATTCCTCGAGTAG
CATGAGCAATGACAGAACACCGAGCAACGAGTTCGGCTCGTGCAGCGACGGCAAGTGCATCAAACGTACC
TCGCAGGATATCACCAGCGGTATGTGGTTTGGCCACGATTGGACGACGACGCAGGGCGGACAGAAAAC
CGGAGATCGATTCTGACATTGAAACTCTGGCCAACGCGCTCGATGGGTACGTTGGGCCGTATCACGAT
TCCAGGATCAGATAGGCGTCAAGCAACGCAGTTCACACCCCGTTTGGAAGA GAATCAGGTGAGGAATAT
TTCTCTTACGGGTTTCCAAAAGGATCAAGAAGAGTTGTACGCGGAGGAACAAATTTCCACCTTTGTTTG
CACCACGTTTGGACGTAAA GTACCTTGGACACCAACTCCGAGGCTTGGACGTGAGTTGCACAATATAAT
TGATAAATCTCGACAGAACTTCGATGATGCACGCTTTTAAAGACTGGTTCGACCTGCTGGATGATTAATAG
CTAATGATATAGTGAATTAAGACCATATTTAAGAAAATAAAGGACTTGTATTTATTTGTATTATAATCG
AGGAATGCTCGATACTTTTCCTGT
```

**Obr. 4.2.1:** nukleotidová sekvence transkriptu PBANp, sekvence PBAN a dalších neuropeptidů jsou označeny barevně. Podtržením je zvýrazněn translatovaný úsek.

Prvotní bioinformatická analýza a predikce jednotlivých peptidů u čmeláka byla provedena Ing. Janou Brabcovou, Ph.D. a Mgr. Alešem Bučkem, Ph.D [39]. Porovnáním genomu včely *A. mellifera* a mravence *S. invicta* s genomem a transkriptomem čmeláka byl hledán takzvaný PBANp (PBAN polypeptidový prekurzor, **Obr. 4.2.1**), jehož sekvence obsahuje několikrát aminokyselinový motiv FxPRL (**Obr. 4.2.2**), z nějž se u různých organismů v různých oblastech vyštěpují specifickou proteázou různě dlouhé sekvence PBAN (hormon) a dalších neuropeptidů (viz **Obr. 4.2.3**), které všechny nesou na C-konci konzervovaný motiv FxPRLamid.

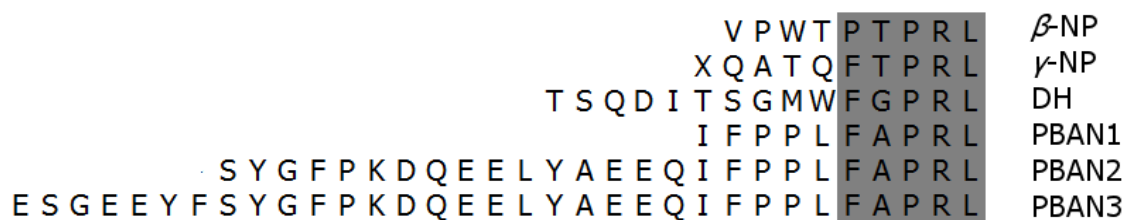


**Obr. 4.2.2:** alignment proteinových sekvencí proteinového prekursoru PBANp u různých druhů hmyzu. Černě označené části vyznačují konzervované C-koncové motivy neuropeptidů. \* sekvence, které byly použity při návrhu syntetických peptidů u čmeláka. \* sekvence u čmeláka *B. terrestris* [60].

Jednotlivé peptidy u čmeláka byly navrženy na základě podobnosti s výše zmíněnými organismy. Krátký PBAN1 byl navržen na základě PBAN včely medonosné, dlouhý PBAN3 na základě mravence *S. invicta*. NP a DH peptidy byly odvozeny od různých druhů mūr. Navržené peptidy byly uměle syntetizovány v laboratoři peptidové syntézy na UOCHB (viz **Tab. 4.2.1**).

**Tab. 4.2.1:** Vyštěpené PBAN-podobné neuropeptidy u *B. terrestris*:

Název	AK	Sekvence	M <sub>w</sub>	pI
DH	15	TSQDITSGMWFGPRL-amid	1694.93	11.0
β-NP	10	(PyrQ)QATQFTPRL-amid	1171.32	14.0
PBAN1	10	IFPPLFAPRL-amid	1169.48	14.0
γ-NP	9	VPWTPTPRL-amid	1065.28	14.0
PBAN2	26	SYGFPKDQEELYAEEQIFPPLFAPRL-amid	3084.48	4.4
PBAN3	33	ESGEEYFSYGFPKDQEELYAEEQIFPPLFAPRL-amid	3926.25	3.9



**Obr. 4.2.3:** Predikované neuropeptidy odvozené z PBANp prekurzoru u čmeláka *B. terrestris*, které byly uměle syntetizovány.

#### 4.2.1 RNA interference

Pro účely popsání biologické funkce neuropeptidů jsme se rozhodli vyzkoušet umlčování genů pomocí techniky RNA interference. Byla izolována RNA ze tří typů tkání čmeláka, a to konkrétně z CLG, mozku a tukového tělesa. Cílem bylo získat nativní DNA sekvenci PBANp přímo z tkáně, aby mohla být posléze převedena na 2vláknovou RNA pro interferenci. Největší koncentrace PBANp byla předpokládána v hlavě, kde nejspíše dochází k jeho biosyntéze.

Původní RNA se podařilo získat velmi čistou (viz. **Tab. 2.1.2**), nicméně četné pokusy o amplifikaci sekvence PBANp pomocí PCR za různých podmínek byly neúspěšné. Stejná RNA přitom sloužila jako základ pro klonování SDR1 a PPR (viz **oddíl 4.1**), což dokazuje její dostatečnou kvalitu.

**Tab. 4.1.2:** Výsledné koncentrace izolovaných RNA.

Vzorek	Koncentrace ng/μL	A	
		λ = 260/280 nm	λ = 260/230 nm
mozek	162,8	2,19	1,97
CLG	130,8	2,18	1,82

Pokusy o RNA interferenci byly rovněž prováděny Mgr. Michalem Tupcem v rámci jiného projektu pro reduktázu mastných kyselin FAR5 u čmeláka *Bombus lapidarius*. Dvouvláknovou RNA proti sekvenci FAR5 se podařilo získat, ovšem veškeré pokusy o její umlčení byly neúspěšné.

Celkové složení samčího feromonu (a časová dynamika tvorby feromonu) je uvedeno v přílohách. Měření všech složek feromonu a dynamiky produkce feromonu bylo prováděno jako doplňková část práce zejména proto, aby bylo možné vybrat vhodné vzorky pro qPCR.

#### 4.2.2 *In vivo* a *in vitro* stanovení feromonotropní aktivity

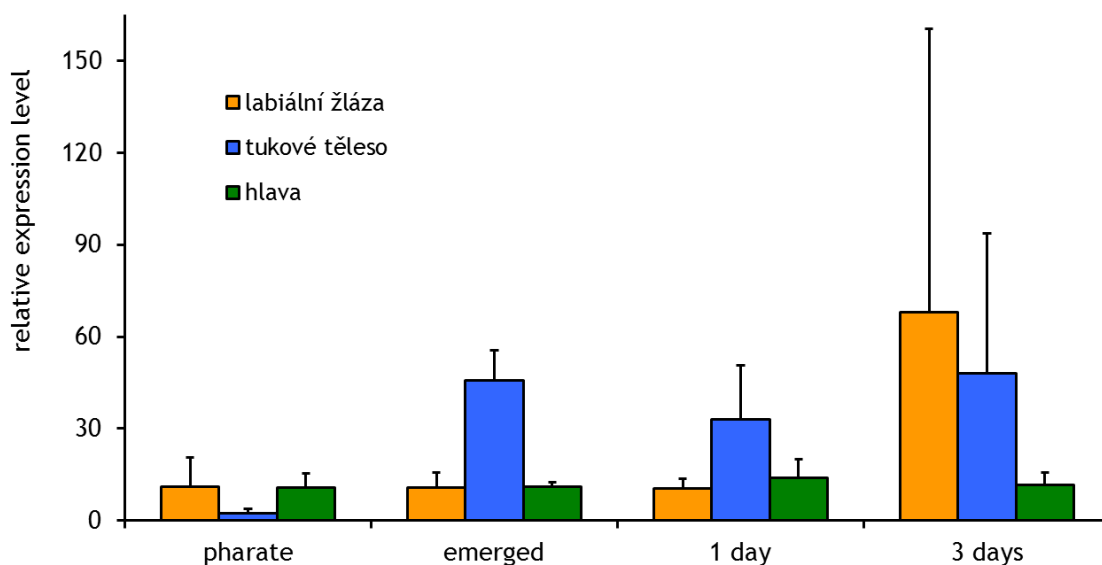
*In vivo* inkubace byly prováděny Mgr. Michalem Tupcem a Mgr. Jiřím Kindlem, Ph.D. PBAN (a další syntetické peptidy) byly *in vivo* injekčně vpraveny do hlav různě starých čmeláčích samců (farátní, 0denní, 1denní, 2denní), a to v koncentracích od 0,1 pmol do 1000 pmol, a následně kvantitativně analyzováno složení feromonové směsi (na čemž se podílela i autorka této diplomové práce). Podobné experimenty byly prováděny i v *in vitro* podmínkách s izolovanými labiálními žlázami v živném roztoku. Při vyšších koncentracích docházelo k úhynu jedinců, při nižších koncentracích samci sice přežívali, nicméně výsledné množství jejich feromonů se buď mírně snížilo (u vyšších koncentrací), nebo zůstalo nezměněné (u nižších koncentrací).

Při těchto inkubacích nebylo potvrzeno zapojení PBAN v biosyntéze feromonu čmeláka, proto bylo dále přistoupeno ke zkoumání toho, jestli jsou PBAN a jeho potenciální receptory ve čmelákovi vůbec exprimovány.

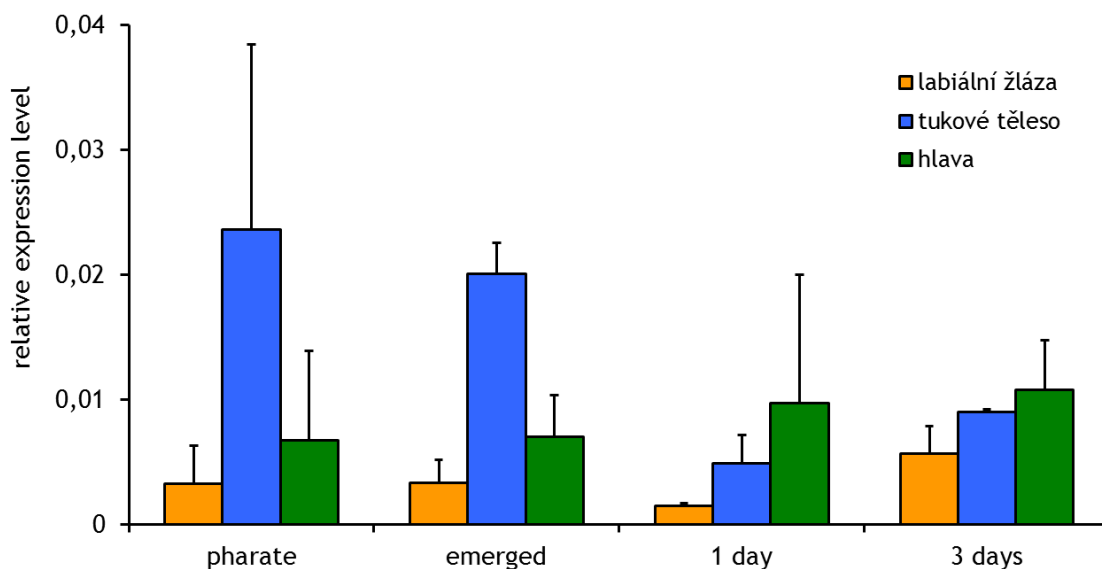
#### 4.2.3 Stanovení relativní exprese

Byla izolována RNA z hlav, CLG a tukového tělesa různě starých čmeláčích samců (farátní, 0denní, 1denní, 3denní). Získané vzorky RNA byly přepsány do cDNA pomocí reverzní transkriptázy a s takto získanou cDNA byla prováděny opakované sady qPCR stanovení. Aby bylo možno určit relativní míru exprese, bylo qPCR provedeno vůči referenčnímu elongačnímu faktoru (eEF1 $\alpha$ ) a fosfolipáza-A2-receptoru (PLA2). Cílem bylo stanovit relativní expresi transkriptů potenciálních receptorů NUr2, NCr a GRHr a

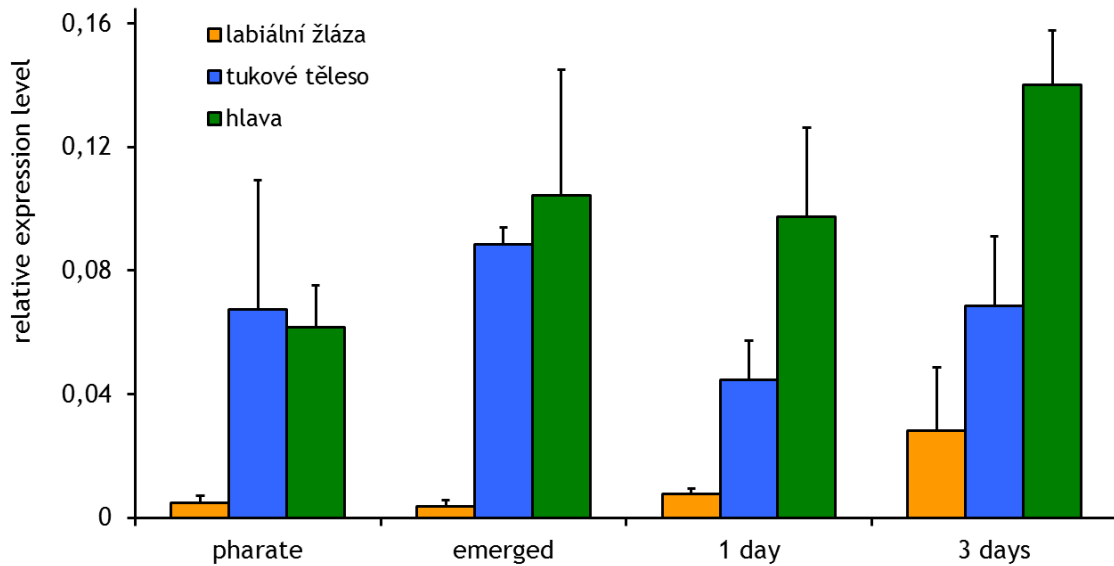
prekursorového proteinu PBANp. Při navrhování potenciálních receptorů pro PBAN se vycházelo z podobnosti s popsáním a funkčně charakterizovaným PBAN receptorem u *Helicoverpa zea* a *Helicoverpa armigera* (NCr, NUr2) [61, 79] a dále z míry exprese v hlavě čmeláka (GNRHr). Výsledky qPCR jsou uvedeny na obrázcích níže.



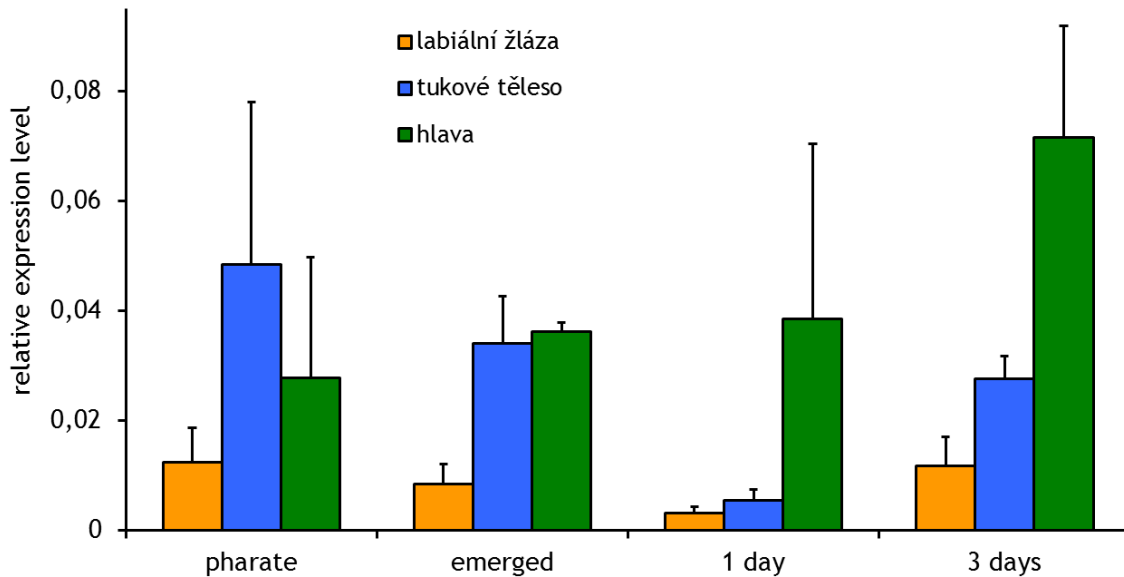
**Obr. 4.2.4:** Relativní exprese GRHr v tkáních různě starých čmeláků.



**Obr. 4.2.5:** Relativní exprese NCr v tkáních různě starých čmeláků.



Obr. 4.2.6: Relativní exprese NUR2 v tkáních různě starých čmeláků.



Obr. 4.2.6: Relativní exprese PBANp v tkáních různě starých čmeláků.

Hodnoty expresí jednotlivých transkriptů uvedené na **Obr. 4.2.4 – Obr. 4.2.6** nevykazovaly významné trendy, co se týče tkáňové nebo věkové specifity. Nebylo tedy možné jednoznačně určit, jestli je PBANp nebo jeden ze tří navržených receptorů specificky exprimován v nějakém konkrétním věku čmeláka nebo v konkrétní tkáni. Tím se nepotvrdil i náš původní předpoklad, že PBANp bude syntetizován v hlavě a u čerstvě vylíhlých jedinců, neboť k tvorbě feromonu dochází už v rané fázi života jedince (viz **Přílohy – Dynamika tvorby feromonu *B. terrestris***).

Zvláště u PBANp míra exprese kolísá v průběhu života čmeláka ve všech tkáních a obecně je nejnižší v labiální žláze. V rámci receptorů lze říci, že exprese NCr2 a NUr je stabilně velmi nízká zejména v labiální žláze a NUr2 je významněji exprimováno pouze v hlavě. U řádově více exprimovaného GRHr je situace zhruba obrácená, nicméně zde byly pozorovány nejvýraznější směrodatné odchylky. Směrodatné odchylky v qPCR měřeních obecně byly zřejmě výsledkem rozdílů mezi jedinci (čmeláky), z nichž byly získány vzorky pro analýzu, neboť jednotlivá qPCR měření samostatně vykazovala přesné hodnoty (sjednocené *melting peaks*).

Závěrem lze pouze říci, že míra exprese jak receptorů, tak PBAN je ve všech tkáních a věcích víceméně stabilní a nedochází k žádným píkům exprese. To může být způsobeno tím, že výsledné peptidy v hemolymfě podléhají degradaci proteázou a exprese je stabilní proto, aby zajistila konstantní množství peptidů po celou dobu života čmeláka. Zároveň lze předpokládat, že k regulaci systému stačí pouze stopové množství PBAN (v řádu pmol, jak je tomu například u řady mūr), které je ovšem našimi metodami nezaznamenatelné. Další možností je, že existuje další, jiný neurohormon regulující celý systém.

#### 4.2.4 Extrakce peptidů

Cílem této části práce bylo získat nativní PBAN nebo jiný neuropeptid z PBAN/pyrokininové rodiny ze tkáně čmeláka zemního. Prováděný postup izolace byl analogický k dříve publikovaným postupům u mūr a včely *A. mellifera*.

K extrakci byly použity mozky a labiální žlázy ze 750 samců čmeláka různého stáří. Všechny biologický materiál byl čerstvý, pocházející z roku 2016. Bylo záměrně zvoleno velké množství biologického materiálu, aby se zvýšila pravděpodobnost detekce PBAN. Homogenát tkání byl nejprve odtučněn organickými rozpouštědly (váha odtučněné sušiny z CLG: 366 mg, váha odtučněné sušiny z mozků: 225 mg), poté extrahován kyselým roztokem, a dále frakcionován na C-18 SPE koloně. Získané frakce byly lyofilizovány, zváženy a pro účely LC-MS měření následně solubilizovány methanolem s TFA. V **Tab. 2.1.3** jsou uvedeny hmotnosti lyofilizovaných vzorků po frakcionaci. Všechny lyofilizované vzorky měly nějakou míru zabarvení přecházející od

slonovinově bílé po žlutou a oranžovou a množství získané směsi peptidů bylo jasně okem viditelné.

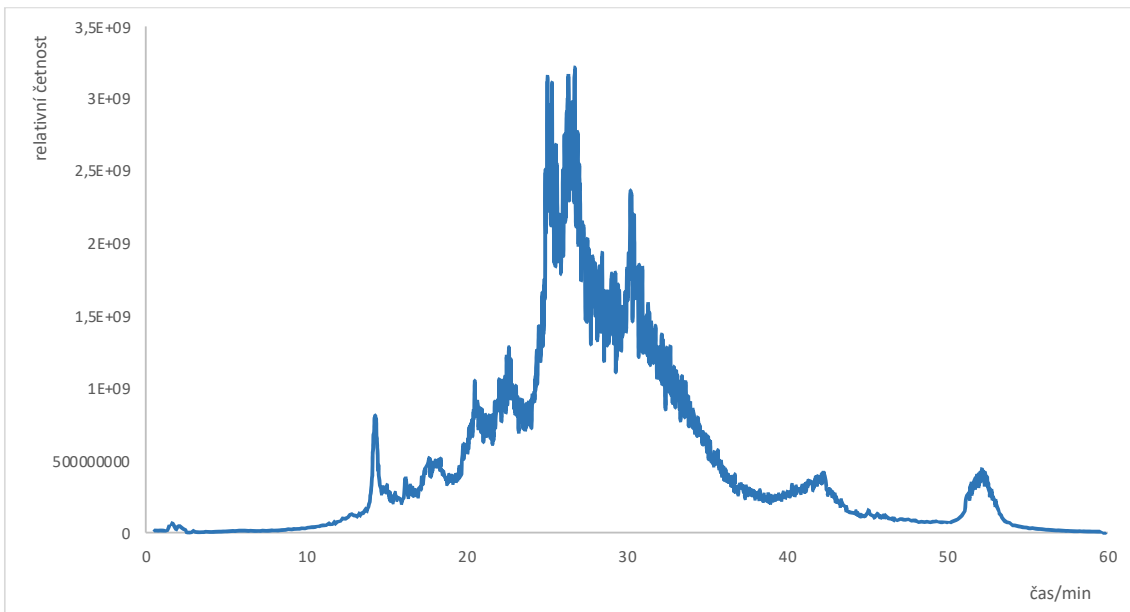
**Tab. 4.1.3:** Váhy peptidů z mozků a CLG po lyofilizaci.

<b>Vzorek</b>	<b>Hmotnost</b> mg	<b>Frakce</b> %
mozek	43,12	0
mozek	1,73	10
mozek	3,39	30
mozek	2,08	60
mozek	0,46	90
CLG	38,06	0
CLG	1,29	10
CLG	2,48	30
CLG	1,83	60
CLG	0,40	90

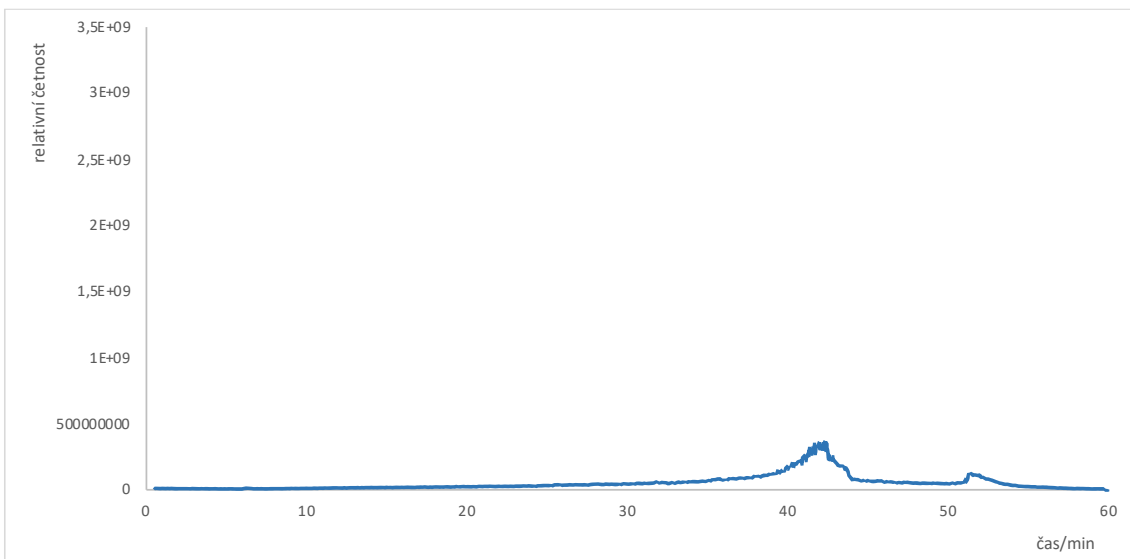
#### 4.2.5 Analýzy peptidů

Pro analýzu byla zvolena metoda LC-MS, aby bylo možné selektivně sledovat hmoty pocházející z predikovaných peptidů. Detekce byla optimalizována pomocí syntetických standardů neuropeptidů. V žádném ze vzorků z frakcí z mozků ani žláz se nepodařilo detekovat PBAN ani jiný z navržených neuropeptidů, nejspíše proto, že docházelo k výrazné interferenci těchto málo zastoupených analytů s nežádoucími, parazitně extrahovanými peptidy a proteiny, které se nepodařilo odstranit v rámci extrakčního a frakcionačního procesu a zůstaly tak ve frakcích.

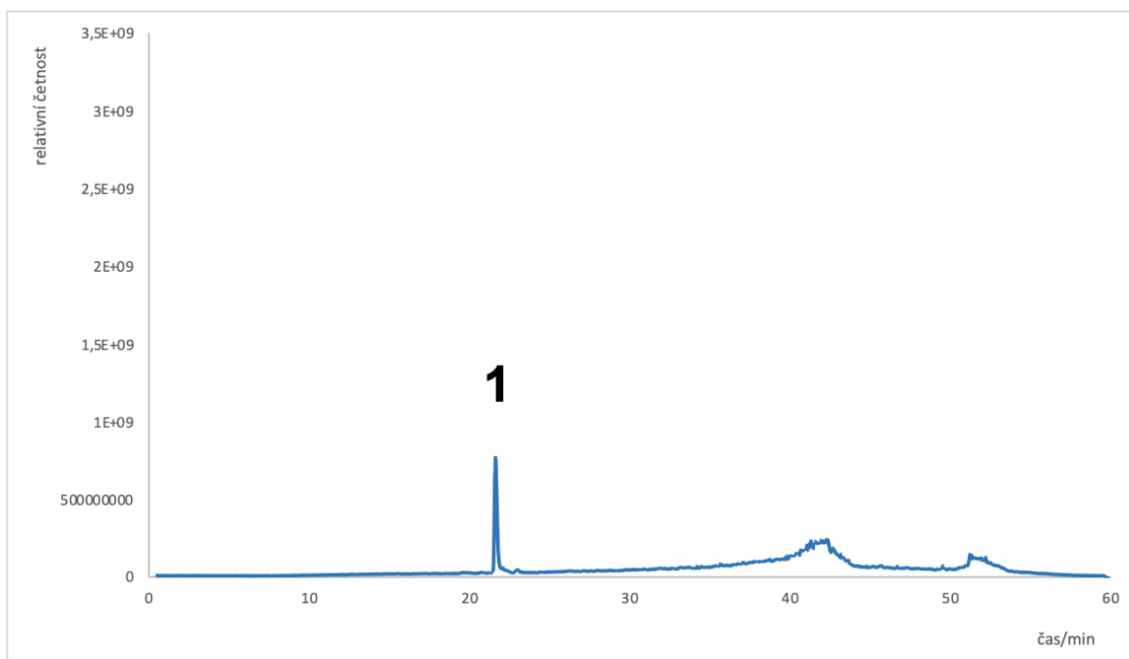
Vybrané chromatogramy frakcí jsou uvedeny na **Obr. 4.2.7 – Obr. 4.2.9.**



**Obr. 4.2.7:** Chromatogram frakce mozku čmeláka zemního (eluováno 30% acetonitrilem s 0,1% kyselinou mravenčí).



**Obr. 4.2.8:** Chromatogram 40% frakce standardu predikovaných peptidů po SPE (eluováno 40% acetonitrilem s 0,1% kyselinou mravenčí).



**Obr. 4.2.9:** Chromatogram standardu 0,1 mM PBAN, měření vzorku bez SPE. **1** PBAN.

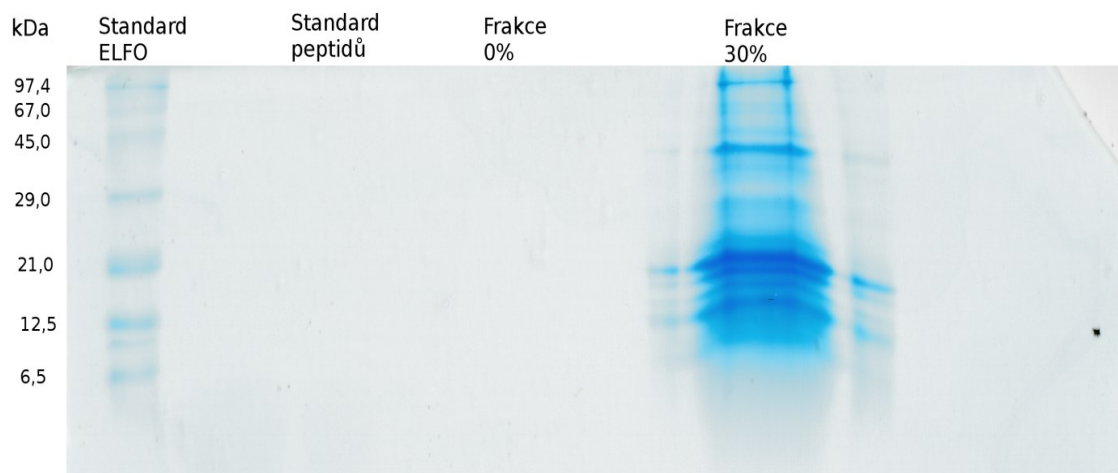
Jedním z předpokladů neúspěchu detekce PBAN, respektive jeho nízké koncentrace, byl nevhodně zvolený frakcionační krok, který mohl způsobit snížení koncentrace neuropeptidů nespecifické adsorpce na kolonu. Tento fakt byl ověřen provedením kontrolní SPE frakcionace se syntetickými peptidy s kyselou i zásaditou elucí. Ani s peptidovými standardy se nepodařilo ve frakcích detekovat příslušné peptidy (viz **Obr. 4.2.8**).

Jak je vidět na **Obr. 4.2.9** roztok standardu PBAN bez SPE je vybranou metodou stanovitelný, ovšem v roztocích získaných SPE nebyl jeho pík zaznamenán. Na **Obr. 4.2.7** je navíc jasně patrné, že nežádoucí peptidy a proteiny se vyskytovaly v tak vysoké míře, že i kdyby PBAN byl po SPE úspěšně eluován, nebyl by touto metodou detekovatelný. Dále můžeme z chromatogramů různých koncentrací odhadnout, že PBAN se ve vzorku zřejmě nenacházel ve větší koncentraci než 0,1 mM, protože jinak by jeho pík mohl být zaznamenán i přes interferenci dalších peptidů. Z těchto důvodů byly vzorky předány k citlivější LC-MS analýze na oddělení hmotnostní spektrometrie na UOCHB AV ČR.

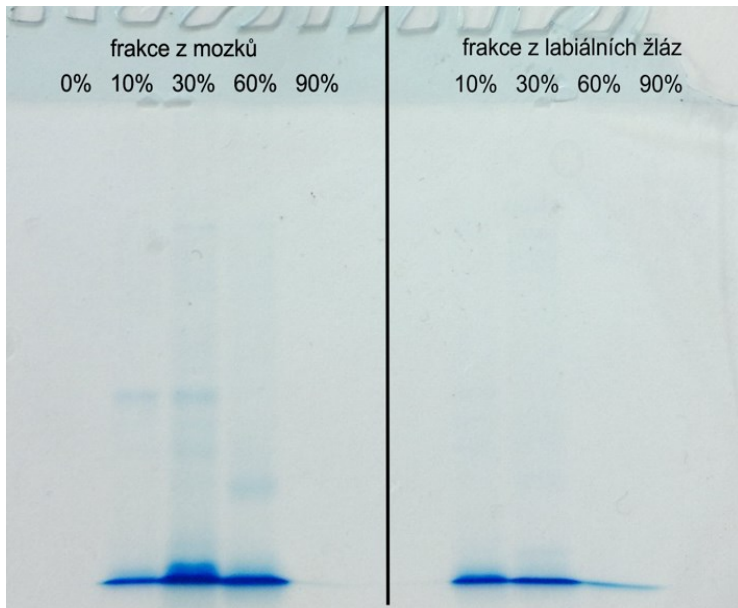
MIGSVAFLSFNRLMTITVCVLLCVVYLVSCASGEYEGRDSSSSSMSNDR  
 DH  
 TPSNEFGSCSDGKCIKRTSQDITSGMWFGPRLGRRRRADRKPEIDSDI  
 β-NP  
 ETLANALDGSRWAVITIPGSDRRQATQFTPRLGR<sup>ESGEEYFSYGFPKD</sup>  
 PBAN γ-NP  
<sup>QEELYAEEQIFPPLFAPRL</sup>GRKVPWTPTPRLGRQLHNIIDKSRQNFDDA  
 RF

**Obr. 4.2.10:** Sekvence aminokyselin PBANp. Predikované neuropeptidy jsou označeny barevně, sekvence nalezená hmotnostní analýzou v 60% frakci mozku je označena šedou barvou.

Pro účely určení frakcí s největším potenciálem výskytu PBAN byly provedeny dvě SDS-PAGE analýzy. Proteinové zastoupení jednotlivých frakcí na polyakrylamidovém gelu je uvedeno na **Obr. 4.2.11** a **Obr. 4.2.12**.



**Obr. 4.2.11:** fotografie po separaci na 20% polyakrylamidový SDS-PAGE gel (10 µL vzorku frakce mozku).



**Obr. 4.2.12:** fotografie po separaci na 12% polyakrylamidový SDS-PAGE gel (5  $\mu$ L vzorku frakcí).

Kolegou Mgr. Martinem Hubálkem, Ph.D., byly provedeny analýzy jak intaktních frakcí, tak i frakcí po štěpení trypsinem. Analýzami na citlivějším přístroji se podařilo detekovat pouze koncovou část PBANp (viz **Obr. 4.2.10**, šedivě zvýrazněná část sekvence), ale jednotlivé hledané neuroptidy detekovány nebyly. Lze tedy říci, že PBANp z mozků extrahován byl, ale vyštěpené peptidy buď nebyly eluovány z SPE kolonky, nebo se ve vzorku nenacházely, nebo nejpravděpodobněji jejich koncentrace byla pod limitem detekce. Ilustrační výsledky hmotnostní analýzy jsou uvedeny v **Tab. 4.1.4**; kromě PBANp byly identifikovány i další interferující proteiny.

**Tab. 4.1.4:** Hmotnostní analýza vzorku 60% frakce mozku čmeláka čmeláka zemního.

Procento pokrytí sekvence	Název proteinu, organismus	Počet identifikovaných peptidů
72.0	Hymenoptaecin (Fragment) OS=Bombus terrestris	20
54.5	Hymenoptaecin OS=Bombus ignitus	20
65.6	Odorant-binding protein OS=Bombus ignitus	12
93.0	Abaecin (Fragment) OS=Bombus terrestris	9
69.0	Abaecin OS=Bombus ignitus	4
31.8	Apidaecin OS=Bombus ignitus	1
14.3	Digestive organ expansion factor homolog [Bombus impatiens] OS=Lepeophtheirus salmonis	1
30.8	PBANprecursor	1
18.7	Serine proteinase stubblelike [Bombus impatiens] (Fragment) OS=Lepeophtheirus salmonis	1
10.7	Guanine nucleotide exchange factor DBSlike [Bombus terrestris] OS=Lepeophtheirus salmonis	1
34.7	50S ribosomal protein L7/L12 OS=Bombella intestini GN=rplL	0

#### 4.2.6 Shrnující diskuze

Tato studie probíhala ve dvou směrech:

1. izolace RNA z různých tkání čmeláka, jejíž cílem bylo získat příslušnou cDNA a následně stanovit relativní míru exprese PBANp a potenciálních neuropeptidových receptorů. Rovněž měla být cDNA použita pro účely RNA interference.
2. izolace nativního PBAN přímo ze hlav čmeláků.

I přes řadu opakování s různými podmínkami se nejprve nepodařilo fyzicky získat DNA sekvenci PBAN. Tím pádem dále nebyla získána ani 2-vláknová RNA pro interferenci. Exprese PBANp a vybraných receptorů sice byla prokázána v různých tkáních i stářích, nicméně nebyl potvrzen žádný směrodatný trend. Nepotvrdil se tak ani náš předpoklad, že největší exprese PBANp bude v hlavách čerstvě vylíhnutých jedinců. Ani při použití velkého množství vstupního biologického materiálu se nepodařilo izolovat dostatečné množství PBAN, které by bylo použitými metodami identifikovatelné, neboť docházelo k interferenci s nežádoucími nativními peptidy, které jsou ve vzorku zastoupeny v mnohem větších koncentracích, a nepodařilo se je selektivně odstranit. Navazujícím citlivějším měřením se sice podařilo odhalit úsek PBANp, ale ani zde se

nepodařilo detekovat kterýkoliv ze syntetizovaných neuropeptidů odvozených od PBANp.

Pro účely identifikace potenciálních neuropeptidů by bylo v budoucích experimentech vhodné pracovat s ještě vyšším počtem jedinců, využít selektivnější techniky extrakce krátkých peptidů, nebo použít citlivější hmotnostní detektory.

## 5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zkoumat biosyntézu majoritní složky samčího feromonu čmeláka zemního (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu, ke které dochází v hlavové části labiální žlázy. Zásadním krokem této biosyntézy je stereospecifická enzymová redukce 2,3-*cis*-dvojná vazba farnesolu, která probíhá za katalýzy enzymatické směsi. Regulační mechanismus této biosyntetické dráhy je neznámý.

Bylo dosaženo následujících výsledků:

1. Při *in vitro* inkubacích s homogenátem labiální žlázy docházelo k redukci farnesolu a vzniku DHF, dominantní složky samčího feromonu, a také k parazitické oxidační reakci za vzniku farnesalu.
2. Enzymy PPR a SDR1, které by mohly být obsaženy v enzymatické směsi, se podařilo exprimovat v kvasinkové kultuře, přičemž výsledné kvasinky byly schopny redukovat farnesol na DHF. Kvasinky mají tuto schopnost přirozeně – bylo by tedy vhodné v budoucnosti zvolit jiný modelový organismus, nebo provést podpůrné studie s kvasinkovými kulturami.
3. Z různých tkání čmeláka byla izolována RNA za účelem provedení navazující RNA interference. K té nakonec nedošlo, neboť se i přes řadu opakování s různými podmínkami nepodařilo získat DNA sekvenci PBAN.
4. Byla stanovena relativní míra exprese PBANp a potenciálních neuropeptidových receptorů, která ovšem nevykazovala žádný jednoznačný trend.
5. I přes použití značného množství biologického vzorku se nepodařilo izolovat nativní PBAN, neboť docházelo k interferenci s nežádoucími nativními peptidy a proteiny, které byly zřejmě ve vzorcích zastoupeny ve výrazně větším množství než PBAN.
6. Citlivějšími metodami se podařilo odhalit pouze koncovou část sekvence PBANp. V budoucích experimentech by bylo vhodné buď pracovat s ještě větším množstvím jedinců, nebo použít selektivnější techniky extrakce krátkých peptidů.

## 6 Seznam použité literatury

- [1] Slessor, K. N., Winston, M. L. & Le Conte, Y. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Chemical Ecology* **31**, 2731–2745 (2005).
- [2] Tillman, J. A., Seybold, S. J., Jurenka, R. A. & Blomquist, G. J. Insect pheromones - An overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 481–514 (1999)
- [3] Jurenka, R. in 97–132 (2006). doi:10.1007/b95450.
- [4] Rafaeli, A. in *International Review of Cytology* **213**, 49–91 (Academic Press Inc., 2002).
- [5] Chang, J. C. & Ramasamy, S. Identification and expression analysis of Diapause Hormone and Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide (DH-PBAN) in the legume pod borer, *maruca vitrata fabricius*. *PLoS ONE* **9**, (2014).
- [6] Schulz, S. The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II. *Topics in Current Chemistry* **239**, 209–240 (2004).
- [7] Blomquist, G. J. & Vogt, R. G. *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*. *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology* 522–532 (Elsevier Inc., 2003). doi:10.1016/B978-0-12-107151-6.X5000-2
- [8] Williams, I. H., Birch, M. C. & Haynes, K. F. Insect Pheromones. *The Journal of Applied Ecology* **20**, 997 (2006).
- [9] Trhlin, M. & Rajchard, J. Chemical communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.): A review. *Veterinarni Medicina* **56**, 265–273 (2011).
- [10] Yew, J. Y. & Chung, H. Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. *Progress in Lipid Research* **59**, 88–105 (2015).
- [11] Landolt, P. J. & Phillips, T. W. Host Plant Influences On Sex Pheromone Behavior Of Phytophagous Insects. *Annual Review of Entomology* **42**, 371–391 (2002).
- [12] Reddy, G. V. P. & Guerrero, A. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends in Plant Science* **9**, 253–261 (2004).

- [13] Eliyahu, D., Applebaum, S. & Rafaeli, A. Moth sex-pheromone biosynthesis is inhibited by the herbicide diclofop. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **77**, 75–81 (2003).
- [14] Robinson, E. J. H., Jackson, D. E., Holcombe, M. & Ratnieks, F. L. W. Insect communication: “No entry” signal in ant foraging. *Nature* **438**, 442 (2005).
- [15] Luxová, A., Valterová, I.: Biosynthesis of Insect Pheromones. *Chemické Listy*. 2006, **100**:243–255.
- [16] Tillman, J. A., Seybold, S. J., Jurenka, R. A. & Blomquist, G. J. Insect pheromones - An overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 481–514 (1999).
- [17] Christensen, T. A. & Hildebrand, J. G. Pheromonal and host-odor processing in the insect antennal lobe: How different? *Current Opinion in Neurobiology* **12**, 393–399 (2002).
- [18] Persaud, K. in 1–58 (2013). doi:10.1201/b14670-2
- [19] Dahanukar, A., Hallem, E. A. & Carlson, J. R. Insect chemoreception. *Current Opinion in Neurobiology* **15**, 423–430 (2005).
- [20] Vogt, R. G. in *Comprehensive Molecular Insect Science* 753–803 (Elsevier, 2005). doi:10.1016/b0-44-451924-6/00047-8.
- [21] Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T. & Touhara, K. Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science* **307**, 1638–1642 (2005).
- [22] Modified from Jacquin-Joly and Merlin, (2004) [https://www.researchgate.net/figure/Main-olfactory-sensory-organs-of-the-silkmoth-Bombyx-mori-A-A-male-silkmoth-with-its\\_fig1\\_261764615](https://www.researchgate.net/figure/Main-olfactory-sensory-organs-of-the-silkmoth-Bombyx-mori-A-A-male-silkmoth-with-its_fig1_261764615)
- [23] Moto, K. *et al.* Involvement of a bifunctional fatty-acyl desaturase in the biosynthesis of the silkmoth, *Bombyx mori*, sex pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 8631–8636 (2004).
- [24] Matsumoto, S. Molecular Mechanisms Underlying Sex Pheromone Production in Moths. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**, 223–231 (2010).
- [25] Du, M. *et al.* Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase is required for PBAN-induced sex pheromone biosynthesis in *Bombyx mori*. *Scientific reports* **5**, 8110 (2015).
- [26] Tupec, M. *et al.* Expansion of the fatty acyl reductase gene family shaped pheromone communication in Hymenoptera. *eLife* **8**, (2019).

- [27] Moto, K. *et al.* Pheromone gland-specific fatty-acyl reductase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 9156–9161 (2003).
- [28] Stern, P. S. *et al.* Molecular modeling of the binding of pheromone biosynthesis activating neuropeptide to its receptor. *Journal of Insect Physiology* **53**, 803–818 (2007).
- [29] Abrol, D. P. *Pollination Biology: Biodiversity conservation and agricultural production. Pollination Biology: Biodiversity Conservation and Agricultural Production* **9789400719422**, 597–655 (Springer Netherlands, 2011).
- [30] Woodard, S. H. *et al.* Molecular tools and bumble bees: Revealing hidden details of ecology and evolution in a model system. *Molecular Ecology* **24**, 2916–2936 (2015).
- [31] Cvačka, J. *et al.* Analysis of triacylglycerols in fat body of bumblebees by chromatographic methods. *Journal of Chromatography A* **1101**, 226–237 (2006).
- [32] Kindl, J., Hovorka, O., Urbanová, K. & Valterová, I. Scent marking in male pre-mating behavior of *Bombus confusus*. *Journal of Chemical Ecology* **25**, 1489–1500 (1999).
- [33] Ayasse, M. & Jarau, S. Insect Molecular Biology and Ecology: *Annu. Rev. Entomol.* 2014, **59**:299–319.
- [34] Morgan, E. D. *Biosynthesis in Insects. Chromatographia* (2004). doi:10.1039/9781847550262
- [35] Mullen, E. K. & Thompson, G. J. *Genomics, Physiology and Behaviour of Social Insects. Advances in Insect Physiology* **48**, 325–354 (Elsevier, 2015).
- [36] Žáček, P. *et al.* De Novo Biosynthesis of Sexual Pheromone in the Labial Gland of Bumblebee Males. *ChemBioChem* **14**, 361–371 (2013).
- [37] Valterová, I. & Urbanová, K. Chemical Signals of Bumblebees. *Chemické Listy* **91**, 856–857 (1997).
- [38] Luxová, A., Urbanová, K., Valterová, I., Terzo, M. & Borg-Karlson, A. K. Absolute Configuration of Chiral Terpenes in Marking Pheromones of Bumblebees and Cuckoo Bumblebees. in *Chirality* **16**, 228–233 (2004).
- [39] Buček, A. *et al.* Exploring complex pheromone biosynthetic processes in the bumblebee male labial gland by RNA sequencing. *Insect Molecular Biology* **25**, 295–314 (2016).

- [40] Field, L. M., Pickett, J. A. & Wadhams, L. J. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Molecular Biology* **9**, 545–551 (2000).
- [41] Choi, M. Y. & Vander Meer, R. K. Identification of a new member of the PBAN family of neuropeptides from the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Insect Molecular Biology* **18**, 161–169 (2009).
- [42] Raina, A. K. Neuroendocrine Control of Sex Pheromone Biosynthesis in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* **38**, 329–349 (2003).
- [43] Lee, D. W. *et al.* RNA interference of pheromone biosynthesis-activating neuropeptide receptor suppresses mating behavior by inhibiting sex pheromone production in *Plutella xylostella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **41**, 236–243 (2011).
- [44] Jurenka, R. & Nusawardani, T. The pyrokinin/ pheromone biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN) family of peptides and their receptors in Insecta: Evolutionary trace indicates potential receptor ligand-binding domains. *Insect Molecular Biology* **20**, 323–334 (2011).
- [45] Ohnishi, A. *et al.* Hormone signaling linked to silkworm sex pheromone biosynthesis involves Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated phosphorylation of the insect PAT family protein *Bombyx mori* lipid storage droplet protein-1 (BmLsd1). *Journal of Biological Chemistry* **286**, 24101–24112 (2011).
- [46] Choi, M.-Y., Fuerst, E.-J., Rafaeli, A. & Jurenka, R. Identification of a G protein-coupled receptor for pheromone biosynthesis activating neuropeptide from pheromone glands of the moth *Helicoverpa zea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 9721–9726 (2003).
- [47] Modified from Jacquin-Joly and Merlin, (2004): [https://en.wikipedia.org/wiki/Suboesophageal\\_ganglion#/media/File:Robal.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Suboesophageal_ganglion#/media/File:Robal.png)
- [48] Seybold, S. J. & Vanderwel, D. in *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology* 137–200 (Elsevier Inc., 2003). doi:10.1016/B978-012107151-6/50008-6 .
- [49] Tsfadia, O. *et al.* Pheromone biosynthetic pathways: PBAN-regulated rate-limiting steps and differential expression of desaturase genes in moth species. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 552–567 (2008).

- [50] Matsumoto, S. *et al.* Functional diversity of a neurohormone produced by the suboesophageal ganglion: Molecular identity of melanization and reddish colouration hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide. *Journal of Insect Physiology* **36**, 427–432 (1990).
- [51] Yamashita, O. Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, gene expression and function. *Journal of Insect Physiology* **42**, 669–679 (1996).
- [52] Altstein, M., Hariton, A. & Nachman, R. J. in *Handbook of Biologically Active Peptides* 255–266 (Elsevier, 2013). doi:10.1016/b978-0-12-385095-9.00037-3 .
- [53] Wurm, Y. *et al.* The genome of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 5679–5684 (2011).
- [54] Choi, M. Y. & Vander Meer, R. K. Ant Trail Pheromone Biosynthesis Is Triggered by a Neuropeptide Hormone. *PLoS ONE* **7**, (2012).
- [55] Choi, M. Y., Estep, A., Sanscrainte, N., Becnel, J. & Vander Meer, R. K. Identification and expression of PBAN/diapause hormone and GPCRs from *Aedes aegypti*. *Molecular and Cellular Endocrinology* **375**, 113–120 (2013).
- [56] Hummon, A. B. *et al.* From the genome to the proteome: Uncovering peptides in the *Apis* brain. *Science* **314**, 647–649 (2006).
- [57] Buček, A. *et al.* Evolution of moth sex pheromone composition by a single amino acid substitution in a fatty acid desaturase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 12586–12591 (2015).
- [58] Brabcová, J. *et al.* Characterization of neutral lipase BT-1 isolated from the labial gland of *Bombus terrestris* males. *PLoS ONE* **8**, (2013).
- [59] Buček, A. *et al.* Tracking down the divergence of fatty acid derived components of bumblebee marking pheromone. *Annual Meeting of International Society of Chemical Ecology* (2012). doi:10.1073/pnas.1514566112
- [60] Buček, A. *et al.* The role of desaturases in the biosynthesis of marking pheromones in bumblebee males. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **43**, 724–731 (2013).
- [61] Raina, A. K. *et al.* Identification of a neuropeptide hormone that regulates sex pheromone production in female moths. *Science* **244**, 796–798 (1989).

- [62] Teal, P. E. A. & Tumlinson, J. H. Neurohormonal Induction Of Pheromone Biosynthesis By *Heliothis Zea* (Boddie) During The Photophase. *The Canadian Entomologist* **121**, 43–46 (1989).
- [63] Raina, A. K. & Kempe, T. G. A pentapeptide of the C-terminal sequence of PBAN with pheromonotropic activity. *Insect Biochemistry* **20**, 849–851 (1990).
- [64] Raina, A. K. & G. Kempe, T. Structure activity studies of PBAN of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **22**, 221–225 (1992).
- [65] Cripps, C., Blomquist, G. J. & de Renobales, M. De novo biosynthesis of linoleic acid in insects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism* **876**, 572–580 (1986).
- [66] Hanin, O., Rubin, B., Applebaum, S. W. & Rafaeli, A. Structure-activity relationships of pheromonostasis induced by ACCase-inhibitor herbicides in the moth *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **91**, 153–159 (2008).
- [67] Czosnek, H. & Ghanim, M. Management of insect pests to agriculture: Lessons learned from deciphering their genome, transcriptome and proteome. *Management of Insect Pests to Agriculture: Lessons Learned from Deciphering their Genome, Transcriptome and Proteome* 154–160 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-24049-7
- [68] Bober, R., Azrielli, A. & Rafaeli, A. Developmental regulation of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide-receptor (PBAN-R): Re-evaluating the role of juvenile hormone. *Insect Molecular Biology* **19**, 77–86 (2010).
- [69] Fan, A. M. & Ting, D. in *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* 898–901 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.01065-4 .
- [70] Ishaaya, I. & Horowitz, A. R. Biorational control of arthropod pests: Application and resistance management. *Biorational Control of Arthropod Pests: Application and Resistance Management* 69–72 (Springer Netherlands, 2009). doi:10.1007/978-90-481-2316-2
- [71] Altstein, M. Role of neuropeptides in sex pheromone production in moths. *Peptides* **25**, 1491–1501 (2004).
- [72] Altstein, M. *et al.* Induction of Cuticular Melanization in *Spodoptera littoralis* Larvae by PBAN/MRCH: Development of a Quantitative Bioassay and Structure Function Analysis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **31**, 355–370 (1996).

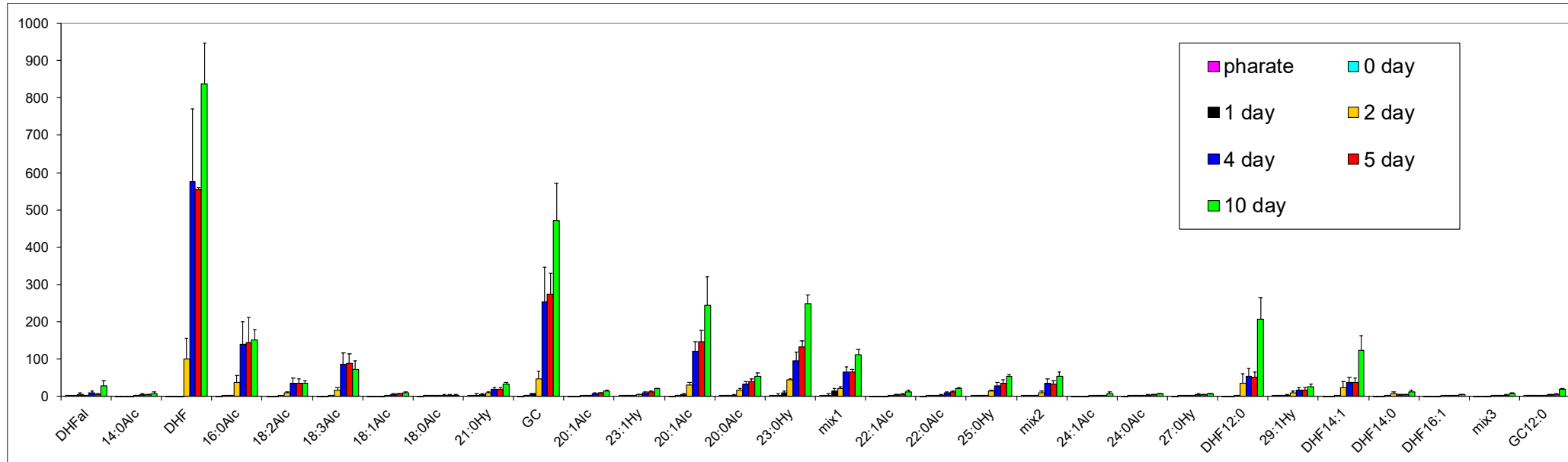
- [73] Nagasawa, H. *et al.* Structure and activity of Bombyx PBAN. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **25**, 261–270 (1994).
- [74] Du, M. *et al.* Transcriptome analysis of *Helicoverpa armigera* male hairpencils: Alcohol biosynthesis and requirement for mating success. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **87**, 154–164 (2017).
- [75] Fodor, J. *et al.* Identification and functional characterization of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide receptor isoforms from *Mamestra brassicae*. *General and Comparative Endocrinology* **258**, 60–69 (2018).
- [76] Villorbina, G., Rodríguez, S., Camps, F. & Fabriàs, G. Comparative sex pherome biosynthesis in *Thaumetopoea pityocampa* and *T. processionea*: A rationale for the phenotypic variation in the sex pherome within the genus *Thaumetopoea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 155–161 (2003).
- [77] Tsfadia, O., Zada, A. & Roelofs, W. Regulation of the pheromone biosynthetic pathway in the Indian meal moth. in *Proceedings of the 10th International Working Conference on Stored Product Protection* (eds. Carvalho, M. O. et al.) 181 (2010). doi:10.5073/jka.2010.425.114
- [78] Hanin, O., Azrielli, A., Applebaum, S. W. & Rafaeli, A. Functional impact of silencing the *Helicoverpa armigera* sex-peptide receptor on female reproductive behaviour. *Insect Molecular Biology* **21**, 161–167 (2012).
- [79] Köblös, G. *et al.* The regulation of  $\delta 11$ -desaturase gene expression in the pheromone gland of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera; Noctuidae) during pheromonogenesis. *General and Comparative Endocrinology* **221**, 217–227 (2015).
- [80] Nusawardani, T., Kroemer, J. A., Choi, M. Y. & Jurenka, R. A. Identification and characterization of the pyrokinin/pheromone biosynthesis activating neuropeptide family of G protein-coupled receptors from *Ostrinia nubilalis*. *Insect Molecular Biology* **22**, 331–340 (2013).
- [81] Hornáková, D., Matoušková, P., Kindl, J., Valterová, I. & Pichová, I. Selection of reference genes for real-time polymerase chain reaction analysis in tissues from *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum* of different ages. *Analytical Biochemistry* **397**, 118–120 (2010).
- [82] Potty, V. H. & Bruemmer, J. H. Oxidation of geraniol by an enzyme system from orange. *Phytochemistry* **9**, 1003–1007 (1970).

- [83] Luan, F., Mosandl, A., Münch, A. & Wüst, M. Metabolism of geraniol in grape berry mesocarp of *Vitis vinifera* L. cv. Scheurebe: Demonstration of stereoselective reduction, E/Z-isomerization, oxidation and glycosylation. *Phytochemistry* **66**, 295–303 (2005).
- [84] Iijima, Y., Wang, G., Fridman, E. & Pichersky, E. Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **448**, 141–149 (2006).
- [85] Sato-Masumoto, N. & Ito, M. Two types of alcohol dehydrogenase from *Perilla* can form citral and perillaldehyde. *Phytochemistry* **104**, 12–20 (2014).
- [86] Hassan, M. *et al.* Monoterpene Alcohol Metabolism: Identification, Purification, and Characterization of Two Geraniol Dehydrogenase Isoenzymes from *Polygonum minus* Leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **76**, 1463–1470 (2012).
- [87] Inoue, H., Tsuji, H. & Uritani, I. Characterization and activity change of farnesol dehydrogenase in black rot fungus- infected sweet potato. *Agricultural and Biological Chemistry* **48**, 733–738 (1984).
- [88] Sekiwa-Iijima, Y., Aizawa, Y. & Kubota, K. Geraniol dehydrogenase activity related to aroma formation in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5902–5906 (2001).
- [89] Sekiwa, Y., Mikami, N., Kubota, K. & Kobayashi, A. in 305–312 (2007). doi:10.1039/9781847550859-00305 .
- [90] Iijima, Y. The Biochemical and Molecular Basis for the Divergent Patterns in the Biosynthesis of Terpenes and Phenylpropenes in the Peltate Glands of Three Cultivars of Basil. *PLANT PHYSIOLOGY* **136**, 3724–3736 (2004).
- [91] Frank, N., Kent, J. O., Meier, M. & Kraus, J. P. Purification and characterization of the wild type and truncated human cystathionine  $\beta$ -synthase enzymes expressed in *E. coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **470**, 64–72 (2008).
- [92] Silva, F. D. A. *et al.* Biochemical, physicochemical and molecular characterization of a genuine 2-Cys-peroxiredoxin purified from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers] leaves. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1820**, 1128–1140 (2012).
- [93] Ishaaya, I., Palli, S. R. & Horowitz, A. R. *Advanced technologies for managing insect pests. Advanced Technologies for Managing Insect Pests* 1–326 (Springer Netherlands, 2013). doi:10.1007/978-94-007-4497-4 .

- [94] Sen, S. E., Sperry, A. E., Childress, M. & Hannemann, D. E. Juvenile hormone biosynthesis in moths: Synthesis and evaluation of farnesol homologs as alternate substrates of farnesol oxidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 601–607 (2003).
- [95] Sperry, A. E. & Sen, S. E. Farnesol oxidation in insects: Evidence that the biosynthesis of insect juvenile hormone is mediated by a specific alcohol oxidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**, 171–178 (2001).
- [96] Sahu, D., Kumar, A. & Pandey, D. M. In silico analysis of enzyme involved in enrichment of citronella oil. *International Journal of Computational Biology and Drug Design* **4**, 332 (2011).
- [97] Case, G. L., He, L., Mo, H. & Elson, C. E. Induction of geranyl pyrophosphate pyrophosphatase activity by cholesterol-suppressive isoprenoids. *Lipids* **30**, 357–359 (1995).
- [98] SSaito, Y., Ito, S., Koltunow, A. M. & Sakai, H. Crystallization and preliminary X-ray analysis of geraniol dehydrogenase from *Backhousia citriodora* (lemon myrtle). *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* **67**, 665–667 (2011).
- [99] Lüddecke, F. *et al.* Geraniol and Geranial Dehydrogenases Induced in Anaerobic Monoterpene Degradation by *Castellaniella defragrans*. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 2128–2136 (2012).
- [100] Yuan, T.-T. *et al.* Identification of enzymes responsible for the reduction of geraniol to citronellol. *Natural Products and Bioprospecting* **1**, 108–111 (2011).
- [101] Banthorpe, D. V., Long, D. R. S. & Pink, C. R. Biosynthesis of geraniol and related monoterpenes in *Pelargonium graveolens*. *Phytochemistry* **22**, 2459–2463 (1983).
- [102] Winkler, C. K., Tasnádi, G., Clay, D., Hall, M. & Faber, K. Asymmetric bioreduction of activated alkenes to industrially relevant optically active compounds. *Journal of Biotechnology* **162**, 381–389 (2012).
- [103] Filling, C. *et al.* Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 25677–25684 (2002).
- [104] Jörnvall, H. *et al.* Short-Chain Dehydrogenases/Reductases (SDR). *Biochemistry* **34**, 6003–6013 (1995).
- [105] Cantagrel, V. *et al.* SRD5A3 Is Required for Converting Polyprenol to Dolichol and Is Mutated in a Congenital Glycosylation Disorder. *Cell* **142**, 203–217 (2010).

- [106] Sagami, H., Kurisaki, A. & Ogura, K. Formation of dolichol from dehydrodolichol is catalyzed by NADPH-dependent reductase localized in microsomes of rat liver. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 10109–10113 (1993).
- [107] Tang, J., Kobayashi, K., Suzuki, M., Matsumoto, S. & Muranaka, T. The mitochondrial PPR protein lovastatin insensitive 1 plays regulatory roles in cytosolic and plastidial isoprenoid biosynthesis through RNA editing. *Plant Journal* **61**, 456–466 (2010).
- [108] Bártová, A., Enzymatic Oxidations Of Alcohols In Biosynthesis Of Bumblebee Pheromones, Bakalářská práce, dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/80334>
- [109] Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. Frozen competent yeast cells that can be transformed with high efficiency using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols* **2**, 1–4 (2007).
- [110] Laemmli. Laemmli buffer Background. *Nature* 5–6 (1970).
- [111] Gründahl, J. E. H. *et al.* Life with too much polyprenol: Polyprenol reductase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* **105**, 642–651 (2012).

## 7 Příloha 1: Složení samčího feromonu *Bombus terrestris*



## 8 Příloha 2: Dynamika produkce feromonu *Bombus terrestris*

