

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Petra Wenzelová

Identifikace a charakterizace reduktas mastných kyselin
podílejících se na biosyntéze feromonů čmeláků

Identification and characterization of fatty acid reductases
involved in biosynthesis of pheromones bumblebees

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Jan Konvalina, CSc.

Konzultant: PhDr. Iva Pichová CSc.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou 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.

V Praze dne 19. května 2016

.....
Podpis

Abstrakt

V období páření čmeláků na své letové trase značkuje samec různé objekty druhově specifickým samčím značkovacím feromonem k nalákání samičky. Na syntéze feromonů, která probíhá v labiální žláze čmeláčích samců, se podílejí enzymy zvané reduktasy mastných kyselin (dále jen reduktasy). Katalyzují redukci mastných kyselin vázaných ve formě acyl-koenzymu A na jejich alkoholy. V této práci jsem funkčně charakterizovala dvě reduktasy vysoce exprimované v labiální žláze s cílem ověřit jejich úlohu v biosyntéze druhově specifických feromonů, u dvou nejběžnějších druhů českých čmeláku *Bombus lucorum* (čmelák hájový) a *Bombus terrestris* (čmelák zemní).

Exprimovala jsem zmíněné reduktasy v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Potvrdila jsem heterologní expresi reduktas a připravila lipidové extrakty z kvasinkových buněk, ve kterých byly pomocí metody hmotnostní spektrometrie ve spojení s plynovou chromatografií identifikovány alkoholy odvozené od mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem.

Nejvíce zastoupeným analyzovaným alkoholem extraktu z kvasinek, které heterologně exprimovaly čmeláčí reduktasy, byl oktadekanol, ikosanol a dokosanol. Tyto výsledky nás vedou k závěru, že enzymy reduktasy se podílí na biosyntéze alkoholů s dlouhými uhlovodíkovými řetězci, které jsou složkami značkovacích feromonů zmiňovaných českých druhů čmeláků. Tyto dílčí výsledky poslouží v budoucí studii, která si klade za cíl odhalit molekulární mechanismy evoluce feromonového složení prostřednictvím studia biosyntézy značkovacích feromonů napříč různými druhy samců čmeláků s rozdílným feromonovým složením.

Klíčová slova: *Bombus lucorum*, *Bombus terrestris*, reduktasy mastných kyselin

Abstract

In the mating season, bumblebee males leave pheromone track on different objects on their flight routes to attract females of the same species. Synthesis of pheromones, which takes place in the labial gland of bumblebee males, involves enzymes called fatty acid reductases (hereinafter reductases). They catalyse the reduction of fatty acids bound in the form of acyl-coenzyme A to the alcohols. In this work, I functionally characterized two reductases highly expressed in labial gland of the two most common species of bumblebees *Bombus lucorum* and *Bombus terrestris* in order to verify their role in the biosynthesis of species specific male pheromones.

I expressed these reductases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. I confirmed the heterologous expression of reductases and prepared lipid extracts from yeast cells, in which we identified by gas chromatography with mass spectrometric detection (GC/MS) alcohols derived from fatty acids with long chain. These were octadecanol, icosanol and docosanol. These results lead us to conclusion that reductases are involved in the biosynthesis of alcohols with long hydrocarbon chains, which are components of marking pheromones of mentioned bumblebee species. These partial results will be used in a future study that wants to reveal the molecular mechanisms of male bumblebee pheromone evolution.

Key words: *Bombus lucorum*, *Bombus terrestris*, reductase fatty acids

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji PhDr. Ivě Pichové CSc. za umožnění práce v její laboratoři na ÚOCHB AV ČR a garantovi práce panu doc. RNDr. Janu Konvalinkovi CSc.

Ze srdce chci poděkovat mému konzultantovi Mgr. Aleši Bučkovi za bezednou trpělivost, hodiny strávené v laboratoři a odborné vedení této bakalářské práce. Bez něho bych do svého cíle nedošla.

Poděkování patří též všem kolegům z laboratoře, kteří mi vytvořili příjemné prostředí pro práci.

A v neposlední řadě děkuji svým báječným rodičům a nejbližším za podporu, trpělivost, lásku a umožnění studia.

Obsah

Obsah	6
Seznam použitých zkratk a symbolů.....	8
1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 Souhrn základních informací o čmelácích	10
2.1.1 Taxonomické zařazení čmeláka	10
2.1.2 Čmelák jako významný opylovač	10
2.1.3 Sezónní cyklus čmeláka	10
2.1.4 Parazité čmeláka	11
2.1.5 Páření čmeláka	11
2.2 Chemická komunikace	12
2.2.1 Feromony	13
2.2.1.1 Značkovací feromony čmeláků	14
2.2.2 Reduktasy mastných kyselin zapojené v biosyntéze feromonů ...	16
2.2.3 Reduktasy mastných kyselin zapojené v biosyntéze značkovacích feromonů čmeláků	18
3 Cíl práce	19
4 Materiál	20
4.1 Biologický materiál	20
4.2 Chemikálie	20
4.3 Vektory	20
4.4 Roztoky, pufrы a média	21
4.5 Komerční kity	23
4.6 Mikroorganismy	23
4.7 Přístrojové vybavení	23
5 Metody	25
5.1 Transformace plasmidové DNA do <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
5.2 Kultivace <i>S. cerevisiae</i> a heterologní exprese reduktas	25

5.3 SDS-PAGE	25
5.4 Imunochemická detekce (Western blot) s konjugovanými protilátkami proti histidinové kotvě	26
5.5 Methanolýza a příprava vzorků pro analýzu obsahu alkoholů pomocí GC/MS	26
5.6 Bioinformatika	27
6 Výsledky	28
6.1 Porovnání sekvencí reduktas	28
6.2 Kvasinkové kmeny transformované expresními vektory s reduktasovými kódujícími úseky	29
6.3 Detekce heterologně exprimovaných reduktas pomocí western blotu ...	30
6.4 Analýza obsahu alkoholů pomocí GC/MS.....	31
7 Diskuse	33
8 Závěr	36
Přílohy	37
Seznam použité literatury	40

Seznam použitých zkratk a symbolů

BSM	Brent Supplement Mixture
CoA	koenzym A
FAR	reduktasa mastných kyselin
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
YNB	Yeast Nitrogen Base

1 ÚVOD

Poslední desetiletí byl zaznamenán nárůst zájmu o skupinu čmeláků. Pro etology je tato skupina přínosem ve studiu mechanismů vzniku a vývoje sociální hierarchie živočichů. Zájem o čmeláky ze stran zemědělců je díky schopnosti opylovat zemědělské rostliny. [1]

Čmeláci jsou komerčně využíváni pro pěstování plodin. Největší ekonomický přínos má čmeláčí skupina při opylování rajčat a paprik. Druh se umí přizpůsobit uzavřeným prostorům, jako jsou např. klece pro množení osiv či skleníky. Čmeláci zde nepodléhají stresu na rozdíl od včel. Další z výhod oproti včelám je ta, že jsou schopni létat při poměrně nízkých teplotách (až 6 °C) i za mírného deště. [2]

Z těchto důvodů i z důvodů chovatelského zájmu široké veřejnosti je poptávka po uměle vytvořených koloniích na vzestupu. [3]

Tento druh hmyzu je také jedním z modelů pro studium komunikace sociálního hmyzu. [4]

Mnohé studie dokázaly, že za vzájemnou komunikací, sexuální přitažlivostí a hledáním vhodného partnera v rámci jednoho živočišného druhu mohou feromony. Specifické složení sexuálních feromonů ovlivňuje život a rozmnožování blanokřídlého hmyzu, tedy i čmeláků. Chemické složení čmeláčích samčích značkovacích feromonů mimo jiné závisí i na enzymech, zvaných reduktasy.

Tato bakalářská práce se věnuje studiu genů kódujících reduktasy mastných kyselin druhů čmeláků *Bombus lucorum* (čmelák hájový) a *Bombus terrestris* (čmelák zemní) exprimovaných v jejich labiálních žlázách, které produkují samčí značkovací feromony. Tato práce je součástí projektu, jehož cílem je odhalit, jak se reduktasy podílí na druhově specifickém složení samčích značkovacích feromonů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Souhrn základních informací o čmelácích

2.1.1 Taxonomické zařazení čmeláka

Čmeláky řadíme do rodu *Bombus* v rámci nadčeledi Apoidea (včely) řádu Hymenoptera (blanokřídlí). Ve skupině najdeme polospolečenské, společenské, samotářské i parazitické skupiny. Pravá společenství tvoří nejen včely ale i čmeláci. Žijí v nich jak matky, tak samečci (trubci) a dělnice. [4]

2.1.2 Čmelák jako významný opylovač

Čmeláci jsou ekologicky a ekonomicky významnými opylovači rostlin v mírných a chladných pásmech. Jsou využíváni jako modelové organismy ve výzkumu např. opylování a chemické komunikace. [4]

Čmeláci přispívají k udržení genové rozmanitosti přírody, sbírají nektar a pyl z rostlin, např. jetelovin, některých bylin, ovocných stromů, rybízu či paprik a rajčat. Čmeláci jsou chováni uměle jako opylovači skleníkových rostlin. Využívají se tedy k umělým chovům. [2], [5]

Čmeláci jsou významní opylovači zejména těch rostlin, které vyžadují k opylení delší jazýček, než jaký má například včela medonosná. [1]

2.1.3 Sezónní cyklus čmeláka

V době rozkvětu prvních vrb jsou viděny čmeláčí matky, které samostatně přezimovaly v zemi. Často se jedná o opuštěná místa hlodavců v zemi (např. *B. lucorum*, čmelák hájový, *B. terrestris*, čmelák zemní). Prostor si čmeláčí královna zpracuje v oválnou komůrku, kterou utěsní. Jako ochranu před vysycháním komůrky a vyhladověním kolonie si matky někdy stěny vystelou nektarem. Ke vchodu je postaven medový džbáneček. Dno komůrky je potíráno voskem, který matka vylučuje mezi články zadečku. Vajíčka pokládá do voskové buňky. V ní plod, přikryje buňku zadečkem a dochází k inkubaci na zhruba 30

°C. Medový džbáneček je během inkubace spotřebovaný. Dospělé larvy si tvoří kolem sebe pevný kokon. Z něho matka seškrábe vosk a pak postaví po obou stranách buněk další voskové komůrky. Slouží jako nádoby pro zásoby medu a pylu. První dělnice se líhnou po dvaceti čtyřech dnech a na první orientační let za potravou se vydávají za 4 dny od jejich narození. Starají se o hnízdo a pečují o mladé larvy. Při zásahu vnějšího činitele hnízdo brání. Matka s dělnicemi zkonzumují po vylíhnutí pyl, který byl přichystán dělnicemi. Nově vylíhnuté matky se žádné práce v hnízdě neúčastní. Živí se po narození pylem, čtvrtý až pátý den létají na orientační prolety. Od šestého dne jsou pohlavně dospělé. Hledají si vhodné místo k dalšímu přezimování, pak natrvalo opouštějí svoji rodinu. Stará matka, zakladatelka rodiny, do podzimu umírá. Z dalších vajíček, nakladených matkou, se líhnou už jen samečkové. Samečkové opouštějí hnízdo v dospělosti, po čtvrtém dni od svého vylíhnutí. Do hnízda se nevracejí. Hnízdo do zimy vymírá. Přezimují pouze oplozené matky. [6]

2.1.4 Parazitě čmeláka

Vedle čmeláků je rozeznávána ještě skupina pačmeláků z rodu *Psithyrus*. Řadí se mezi hnízdní parazity čmeláků. Do jejich hnízd nakladou pačmeláčí matky vajíčka, z nichž se rodí pohlavní jedinci a jsou vychováváni čmeláčími dělnicemi, jelikož pačmelák nemá své vlastní. [7]

2.1.5 Páření čmeláků

Obdobím páření je léto a začátek podzimu. V tomto období jsou kolonie značně rozrostlé. Jsou schopny již vychovávat mladé matky a samečky. Samečci ve své dospělosti opouští hnízda a již se nevrací. Samičky se mohou pářit jen s jedním samečkem za život, kdežto samečkové mohou oplodnit více samiček. Vajíčka se oplodní až příštím rokem na jaře. Spermie se ukládají do chitinové schránky, spermatéky. Ta je součástí samičího pohlavního ústrojí. Ve spermatéce musí zůstat spermie životaschopné po celou dobu života samičky. Pro udržení spermií při životě až do samotného oplození vajíček je nejvhodnější, aby se samička spářila s co nejsilnějším jedincem druhého pohlaví.

Různé druhy čmeláků využívají rozdílné strategie pro vyhledání samičky, a to patrolování, vyčkávání u hnízd a číhání. Patrolující čmeláci si značkují zastávková místa. V jedné lokalitě (biotopu) může patrolovat více druhů čmeláků. Různé druhy čmeláků značkují v různých výškách. Pokud více čmeláčích druhů patroluje ve stejných výškách, vybírají si různé typy rostlin. Liší se délka letového okruhu i časový interval mezi značkováním jednotlivých míst. Letový okruh může být dlouhý od padesáti do tři sta metrů a může na něm být až 20 označovaných míst s rozstupem od dvou do padesáti metrů. Některé okruhy jednotlivých jedinců se mohou překrývat. Na jednotlivých stanovištích zanechává samec pachovou stopu svým specifickým značkovacím feromonem. Tím láká panenské královny svého druhu, které rozeznají feromon příslušného jedince. Značkovací feromony působí na panenskou královnu jako atraktant a arestant. Měly by tedy samičku zdržet do přiletu samečka. Vyčkávání u hnízda není tak rozšířená mezi rodem *Bombus*. Samečci číhají před hnízdy na panenské královny, které se vrací z potravy. Chtějí získat nejlepší pozici u hnízda. U hnízd čmeláka *Bombus fervidus* bylo pozorováno až 20 nashromážděných samečků. Ve větším množství jsou čmeláčcí samci vůči sobě agresivní. Na první vylétající samičku z hnízda se vrhnou všichni číhající samci u vchodu do hnízda. Čmelák se přichytí samičce na záda a ta s ním odlétá. K samotné kopulaci dochází již mimo čmeláččí roj. Třetím způsobem nalezení samičky je číhání. Samci, kteří číhají na samičky, mají velké oči. Potřebují je pro dobré vidění ze svých stanovišť. V biotopech si vybírají samečci vyvýšená místa, ze kterých pozorují okolí. Často jde o vyšší uschlé rostliny, větve stromů a keřů aj. Své pozorovatelné a okolní vegetaci mají označkovány svým pohlavním feromonem pro delší zadržení samičky na místě. Z úkrytu vylétá za zpozorovanými objekty.

[8]

2.2 Chemická komunikace

Významnou roli v životním cyklu vývoje hmyzu hrají chuťové a čichové vjemy. Díky nim vyhledávají např. partnera pro páření, či místo k naklazení vajíček. U

včel (a nejen u nich) chemické signály napomáhají ke komunikaci a organizaci života hnízda, jelikož obsahují řadu informací pro hnízdo potřebných. [9]

Člověk může využít hmyzí chování ve svůj prospěch. Na základě poznání principů chemické komunikace daného druhu hmyzu můžeme využít jeho chování např. při integrované ekologické ochraně zemědělských produktů. [10]

2.2.1 Feromony

Ke komunikačním prostředkům živočichů mimo optických, akustických či dotykových signálů řadíme i ty chemické. Komunikují tak živočichové na základě přenosu informací pomocí semiochemikálií. Mezi semiochemikálie řadíme i feromony, jejichž funkcí je zprostředkování interakcí v rámci jednoho druhu. [11]

Feromony se mohou dělit dle typů interakcí, které zprostředkovávají, na sexuální, poplašné, agregační, stopovací nebo značkovací. [10]

Feromony jsou jednotlivé chemické látky nebo jejich směsi. Po chemické stránce jsou feromony heterocyklické látky, alifatické nasycené i nenasycené látky (terpeny, deriváty mastných kyselin), aromatické látky aj. [12]

Důležitým aspektem je také stereochemické uspořádání chemických sloučenin. Např. látky s odlišnou stereoisomerií mohou způsobit rozdílně chování u hmyzu. Mají tedy též jinou biologickou funkci. [13]

Informace o biosyntéze unikátních feromonových struktur umožňují celkový náhled na principy sekundárního metabolismu nejen u hmyzu. Poznání funkce enzymů katalyzující klíčové kroky biosyntézy feromonů napomáhá lépe rozeznat evoluční vztahy mezi metabolismem primárním a sekundárním, který je vývojově mladší. Hmyz byl zvolen jako model pro jeho snadnou experimentální manipulaci. Pracuje se s dostupným materiálem, který je získán z laboratorních chovů. [12]

Velká skupina feromonů jsou směsici alifatických sloučenin, které mají dlouhý řetězec s různým stupněm nenasycení. Většinou tvoří uhlovodíky, alkoholy, aldehydy aj. Právě díky dlouhým řetězcům feromonových látek jde jejich biosyntéza ruku v ruce s metabolismem mastných kyselin. [14]

2.2.1.1 Značkovací feromony čmeláků

Rozhodujícím faktorem vzájemné sexuální náklonosti dvou partnerů opačného pohlaví je feromonová výbava. Často i reprodukční izolace je založena na rozdílném složení pohlavních feromonů. Feromonové signály se v průběhu vývoje živočišných druhů mění. Příčinou jsou genetické mechanismy, které jsou do značné míry neznámé. [15]

Čmeláčí samci produkují druhově specifický sekret cefalické (hlavové) části labiální žlázy nazývaný značkovací feromon. (Morse DH.: 1979)

Obecně se tyto značkovací feromony skládají z terpenoidů a alifatických sloučenin odvozených od mastných kyselin. Alifatické sloučeniny mají různé délky řetězců a většina obsahuje jednu nebo žádnou dvojnou vazbu. Nenasycené sloučeniny odvozené od mastných kyselin značkovacích feromonů jsou produkovány desaturasami mastných kyselin. Čmeláčí samci většiny druhů lákají značkovacími feromony panenské královny svého druhu. [16]

Labiální žlázy byly zkoumány u samců některých druhů čmeláků. (*B. terrestris*, *B. lapidarius*, *B. lucorum*, aj.)



Bombus lucorum ♂

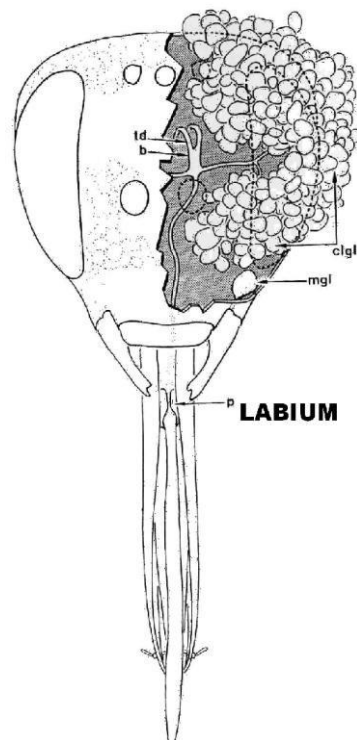


Bombus terrestris ♂

Obrázek 1: Fotografie nejčastěji se vyskytujících čmeláků na území České republiky (© Aleš Buček)

Největší samčí exokrinní orgán je právě labiální žláza. Hlavová část labiální žlázy se skládá ze stovek lalůček (acinů) a kanálů spojující lalůčky. Každý lalůček má v sobě uloženy buňky s vysokým obsahem (až miligramy na jednoho samce) značkovacího feromonu. [17]

Labiální žláza vyplňuje téměř celý prostor kolem mozku v týlu. [18]



Obrázek 2: Cefalická (hlavová) část labiální žlázy. Čelní pohled na hlavu čmeláčího samce, u kterého je vidět labiální žláza, která je tvořena soustavou lalůček. Převzato z [18].

Jednotlivé druhy samců čmeláka můžeme rozlišit dle rozdílného složení sekretu labiální žlázy. [17]

Na základě rozdílného chemického složení značkovacího feromonu lze rozlišit mezi sebou i druhy, které si jsou morfologicky velice blízké. Jedná se o druhově specifické složení značkovacího feromonu, kterého je využíváno v taxonomii. [19]

Značkovací feromony většiny druhů čmeláků obsahují izoprenoidní látky. Byly zjištěny seskviterpeny, monoterpeny a diterpeny. Jejich formou jsou alkoholy, aldehydy nebo estery. Nejčastějšími zástupci terpenických látek jsou dihydrofarnesol, geranyl- citronellol či citronellol. Labiální žláza dále obsahuje aldehydy, alkoholy a estery mastných kyselin, nasycené a nenasycené uhlovodíky s délkami uhlíkatých řetězců 21-27 atomů. [20], [21]

2.2.2 Reduktasy mastných kyselin zapojené v biosyntéze feromonů

Reduktasy mastných kyselin (dále jen reduktasy) patří mezi enzymy, které jsou katalyzátory redukce mastných kyselin vázaných ve formě acyl-koenzymu A na odpovídající alkohol. Tato reakce je klíčovým krokem v biosyntéze hmyzích feromonů. Předpokládá se, že tyto reduktasy mají významnou roli při určování podílů jednotlivých složek ve směsi feromonů. [14]

Mechanismus reakce FAR není stále zcela jasný. Mastný alkohol je obvykle hlavním produktem redukce mastných kyselin. Byly purifikovány ale i reduktasy, které uvolňují jako produkty mastné aldehydy. Redukce mastných kyselin pokračuje přes ATP-dependentní tvorby acylových meziproductů, jako jsou acyl-koenzymy A, a acyly proteinů s následnou redukcí na aldehyd a alkohol za použití NADPH. Redukce mastných kyselin na jejich alkoholy je v přírodě použita jako mezikrok syntézy pro vosk u zvířat a rostlin. Reduktasy mastných kyselin byly lokalizovány ve frakcích mikrosomů rostlin a zvířat. [22]

Pro FAR je důležité poznání membránové topologie a lokalizace pro porozumění toho, jak jsou feromony syntetizovány a uvolňovány z těla ven. Je známo velice málo strukturních informací o reduktasách mastných kyselin. Studie o subcelulární lokalizace FAR *Heliothis virescens* ukazují, že tento enzym se nachází v endoplasmatickém retikulu. Na základě této studie byla přijata hypotéza, že hmyzí reduktasy jsou proteiny asociované s membránou. [14]

Stále není znám počet genů pro FAR, které jsou zapojeny do redukčních biosyntéz feromonů u zkoumaných druhů hmyzu. Feromonové složky u malých hmyzích druhů *Yponomeuta evonymellus*, *Yponomeuta padellus* a *Yponomeuta*

rorellus (Lepidoptera: Yponomeutidae) obsahují hlavně 14-uhlíkaté a 16-uhlíkaté alkoholy a jejich deriváty. [23]

Reduktasy se jeví jako vysoce flexibilní enzymy. U mnohých druhů z řádu Lepidoptera (včetně malých můr) dokáží redukovat různorodé mastné kyseliny. [24]

Geny kódující reduktasy byly izolovány i z jednobuněčných organismů *Euglena gracilis* (krásnoočko štíhlé). Reduktasy se u krásnoočka podílí na syntéze skladovacích voskových esterů. [25]

Vedle alkoholů se ve feromonech objevují další chemické látky jako např. estery nebo jejich deriváty či ethery lipidů. Např. u druhu *Blattella germanica* (Rus domácí) je hlavní složkou 3,11-dimethylnonakosan-2-one. Součástí sexuálního feromonu mastných kyselin samic *Tenebrio molitor* (Potemník moučný z řádu Coleoptera) je 4-methyl-1-nonanol. Můry používají druhově specifické kombinace desaturačních a redukčních reakcí. [26]

Samice můr (*Lepidoptera*), když se chtějí pářit, vydávají druhově specifickou směs sexuálních feromonů, která přitahuje samce stejného druhu na dlouhé vzdálenosti. [27]

První hmyzí reduktasa, která vyrábí feromony, byla identifikována u druhu můry *Bombyx mori* (bourec morušový). Další reduktasy, potenciaálně zapojené do biosyntézy mastných kyselin ve feromonech u hmyzu, byly identifikovány u můr *Ostrinia scapulalis*, *Ostrinia nubilalis*. [15], [28] a *Spodoptera littoralis*. [14]

Feromonová žláza hmyzího druhu *Bombyx mori* (Bourec morušový) se nachází mezi osmým a devátým břišním segmentem. Produkuje pohlavní feromon bombykol, (E,Z)-10,12 hexadekadien-1-ol. Bombykol je syntetizován *de novo* z acetyl-koenzymu A přes palmitát za přítomnosti enzymů desaturas a následně reduktas. V předchozích experimentech byla zjištěna přítomnost aktivity reduktas z homogenátu feromonové žlázy bource morušového za použití palmitoyl-

koenzymu A jako substrátu. A bylo zjištěno, že nedochází k uvolňování hypotetických meziproductů v podobě aldehydů mastných kyselin. [29]

2.2.3 Reduktasy mastných kyselin zapojené v biosyntéze značkovacích feromonů čmeláků

Základní uspořádání a ultrastrukturální organizace hlavové oblasti labiální žlázy u samců *B. terrestris* obecně koresponduje s těmi, které již byly popsány u jiných druhů čmeláků a včel. [18]

Jedním z prvních kandidátů pro zkoumání značkovacího feromonu u čmeláků byl *B. terrestris*. Jeho hlavními extrakty labiální žlázy jsou 2,3-dihydrofarnesol, geranylcitronellool, 2,3-dihydrofarnesal, deriváty mastných kyselin, včetně mastných alkoholů s nejvyšším zastoupením hexadekan-1-olu a oktadeka-9,12,15-trien-1-olu. Zatím ovšem není známa přesná dráha přeměny koenzymů A mastných kyselin na alkoholy s dlouhými řetězci. Deriváty mastných kyselin slouží jako feromony pro komunikaci na delší vzdálenosti díky své vysoké těkavosti. [30]

Reduktasy katalyzující redukci mastných acyl-koenzymů A jsou pravděpodobně zapojené také v biosyntéze feromonů u včely medonosné. Nejvíce zastoupenými alkoholy jsou 14 – 22 uhlíkaté. [31]

3 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo:

- 1) Transformovat předem připravené expresní vektory nesoucí kódující úseky pro reduktasy mastných kyselin FAR1 a FAR2 ze čmeláků *B. terrestris* a *B. lucorum* (BterFAR1, BlucFAR1, BterFAR2, BlucFAR2) do kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2) Heterologně exprimovat reduktasy v kvasinkovém expresním systému.
- 3) Pomocí protilátek proti histidinové kotvě ověřit heterologní expresi reduktas v kvasinkovém expresním systému technikou western blot.
- 4) Kvalitativně posoudit aktivitu heterologně exprimovaných reduktas v kvasinkových kmenech na základě akumulace alkoholů s řetězcem mastné kyseliny v kvasinkových buňkách.

4 MATERIÁL

4.1 Biologický materiál

Pro identifikaci kódujících sekvencí genů pro reduktasy mastných kyselin v druzích *Bombus lucorum* a *Bombus terrestris* byla použita cDNA připravená z RNA, která byla izolována z labiálních žláz samců čmeláků. Labiální žlázy byly vypitvány Dr. Jiřím Kindlem (vědecká skupina Infochemikálie, ÚOCHB AV ČR) ze čmeláků odchovaných Dr. Alenou Votavovou (Výzkumný ústav pícninářský, Troubsko).

4.2 Chemikálie

Difco: Yeast Nitrogen Base (YNB)

Fermentas: Brent Supplement Mixture (BSM) bez uracilu

Fluka: SDS (dodecylsulfát sodný)

Lachema: dichlormethan

Roche: Pefabloc

Sigma: akrylamid, ampicilin, koktejl proteas, molekulové standardy pro SDS elektroforézu – (1 kbp, 100 bp), N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), tergitol, tris(hydroxymethyl)aminomethanu, TWEEN-20, a další běžné anorganické soli, kyseliny, zásady a organická rozpouštědla

Sigma-Aldrich: protilátka proti His-kotvě konjugovaná s peroxidázou

TopBio: směs deoxyribonukleotidů

4.3 Vektory

Byly použity kvasinkové expresní vektory pYEXTHS-BN (Clontech) s vloženými kódujícími úseky vybraných genů reduktas – BlucFAR1, BlucFAR2, BterFAR1, BterFAR2 zkoumaných druhů čmeláků s připojenou N-

koncovou kotvou tvořenou šesti histidinovými zbytky (vektory pYEXTHS-BN_BlucFAR1, pYEXTHS-BN_BlucFAR2, pYEXTHS-BN_BterFAR1 a pYEXTHS-BN_BlucFAR2 dále jen BlucFAR1, BlucFAR2, BterFAR1, BterFAR2). Kódující úseky reduktas FAR1 jsou zaklonované mezi restrikční místa SphI a NotI vektoru pYEXTHS-BN, kódující úseky reduktas FAR2 jsou zaklonované mezi restrikční místa BamHI a NotI vektoru pYEXTHS-BN. Proteinové sekvence kódujících úseků genů reduktas FAR1 a FAR2 jsou v příloze 1. Vektor pYEXTHS-BN je odvozen od komerčního vektoru pYEX-BX dodaný firmou Clontech, který obsahuje CUP1 promotor pro indukci exprese prostřednictvím Cu^{+2} . Součástí vektoru je i ura3 gen, který slouží jako selekční marker – komplementuje uracilovou auxotrofii použitého kvasinkového kmene [32]. Mapa plasmidu pYEXTHS-BN je uvedena v Příloze 2.

4.4 Roztoky, pufrů a médií

Pro přípravu roztoků, pufrů a médií byla použita destilovaná voda. Média byla sterilována autoklávováním.

YNB médium tekuté	0,67% YNB bez aminokyselin a se síranem amonným 2% glukóza 1x BSM bez uracilu (0,156 %)
YNB médium pevné	0,67% YNB bez aminokyselin se síranem 2% glukóza 1x BSM bez uracilu (0,156 %) 2% agar

Roztoky pro SDS PAGE:

Rozdělovací gel: 3,3 ml H_2O

4 ml 30% AA
2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8)
0,1 ml 10% SDS
0,1 ml 10% APS
4 µl TEMED

Zaostřovací gel:

2,1 ml H₂O
0,5 ml 30% AA
0,4 ml 1,0M Tris (pH 6,8)
0,03 ml 10% SDS
0,03 ml 10% APS
3 µl TEMED

Pufry pro Western Blot:

Odbarvovací roztok: 40% methanol
10% kys. octová
30% AA

Vzorkový pufr 2x (PLB 2x): 100mM Tris pH 6,8

3% β-merkaptoethanol
4% SDS
bromphenolBlue
20% glycerol

Tris-glycinový pufr pro SDS PAGE 1x: 250mM Tris-Cl

250mM glycin

0,1% SDS

Transferový pufr 10x: 390mM glycin
480mM TrisCl
0,37% SDS

PBS 10x: 1,37M NaCl
27mM KCl
135mM K₂HPO₄
57,6mM NaH₂PO₄

4.5 Komerční kity

EasyComp sada pro transformaci kvasinek - Invitrogen

West Femto Maximum Sensitivity Substrate - SuperSignal™

4.6 Mikroorganismy

Saccharomyces cerevisiae (kmen BY 4741), genotyp: MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0

4.7 Přístrojové vybavení

analytické váhy - ARA 520, Adventurer™

autokláv – Labo Autoclave, Sanyo

centrifugy – Coulter J-301, Beckman, Multifuge 3SR, Heraeus, MicroCentaur,

Sanyo

CCD kamera LAS-3000 – Fujifilm

flowbox – Clean Air

fotoaparát – DC 290 Zoom, Kodak

inkubátor – Merck

lyofilizátor VirTis sentry 2.0 – BioTRADE

MiniProtean 3 – Bio-Rad

NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis – Thermo Scientific

třepačky Innova 44 – New Brunswick

transiluminátor – Herolab UVT-20, GmbH

soupravy pro elektroforézu – Bio-Rad

spektrofotometr - HELIOS α , Unicam

5 METODY

5.1 Transformace plasmidové DNA do *Saccharomyces cerevisiae*

Všechny kroky byly prováděny ve sterilním nádobí a ve flowboxu. Bylo postupováno podle návodu výrobce komerční sady EasyComp (Invitrogen) pro přípravu a transformaci kompetentních *S. cerevisiae*. Transformační směsi vždy obsahovaly 50 μ l kvasinek (rozmražených buněk), 400 ng příslušného vektoru (BlucFAR1, BlucFAR2, BterFAR1, BterFAR2 a pYEXTHS-BN). Transformační směsi byly vysety na agarové misky s YNB médiem s BSM bez uracilu a kultivovány 3 dny při 30 °C. Z narostlých kolonií byly vybrány tři kandidátní kolonie, se kterými bylo dále pracováno.

5.2 Kultivace *S. cerevisiae* a heterologní exprese reduktas

Kvasinkové kmeny byly kultivované v tekutém médiu YNB, do něhož byl přidán síran měďnatý, (výsledná koncentrace 0,5 mM) a BSM bez uracilu. Kultivace byla prováděna tři dny při teplotě 30 °C ve třepačce.

5.3 SDS-PAGE

Z tekutých medií po nárůstu kvasinek byl odebrán 1 ml pro následnou analýzu proteinů pomocí SDS-PAGE a western blotu. Média byla centrifugována (14 000g, 3 min) a k získané kvasinkové peletě bylo přidáno 30 μ l vody a 30 μ l PLB 2x. Vzorky byly sonikovány 10 min v sonikační lázni. 6 μ l z takto připravených vzorků kultivovaných kvasinek transformovaných plasmidy - BlucFAR1, BlucFAR2, BterFAR1, BterFAR2, pYEXTHS a 8 μ l molekulového standardu - bylo nanášeno na SDS PAGE, a separováno 45 min při 200 V. Byl využit 12% polyakrylamidový gel (80 x 65 x 1 mm) a elektroforéza byla provedena pomocí přístroje MiniProtean 3 (Bio-Rad).

5.4 Imunochemická detekce (Western blot) s konjugovanými protilátkami proti histidinové kotvě

SDS-PAGE gel se nechal 10 min namáčet v 50 ml transferového pufru. Před přenesením proteinů byly i filtrační papíry krátce namočený do tohoto pufru. Na přístroj pro přenos proteinů na membránu byly pokládány vrstvy v následujícím pořadí: filtrační papír, polyakrylamidový gel po elektroforéze, nitroceluloseová membrána pro vizualizaci proteinových proužků a další filtrační papír. Přenos trval 20 min při 20 V. Následně byla membrána inkubována 1 h v kaseinu a poté 1 h v kaseinu s protilátkou (1:2000), vždy při 4 °C. Potom byla membrána promývána třikrát 10 min v 50 ml 1x PBS pufru s 0,05% detergentem TWEEN-20. Membrána byla vyvolávána pomocí komerční sady West Femto Maximum Sensitivity Substrate (SuperSignal™) po dobu 1 až 2 minuty. Membrána byla následně uložena do průhledné folie a vyfocena na přístroji CCD kamera LAS-3000 (Fujifilm) v režimu viditelného světla (pro zaznamenání barevných proužků proteinového standardu) a v chemiluminiscenčním režimu. Výsledný obrázek vznikl překryvem obou fotografií v počítači.

5.5 Methanolýza a příprava vzorků pro analýzu obsahu alkoholů pomocí GC/MS

Cca 9 ml kultivačního média s kvasinkami bylo centrifugováno (3000g, 3 min) při pokojové teplotě. Peleta byla jednou promyta v 10 ml 0,1% tergitolu a jednou v 10 ml destilované vody. Opět byla suspenze centrifugována za stejných podmínek. Pelety v nových vialkách byly zmrazeny při -80 °C. Pelety byly ponechány na lyofilizaci přes noc. Druhý den bylo ke každé suspenzi přidáno cca 0,1 g skleněných kuliček a 1 ml čerstvě připravené směsi dichlormethan/methanol v poměru 2:1. Vialky se nechaly třepat na třepačce při cca 20 Hz 1 h při pokojové teplotě. Obsahy vialek byly přefiltrovány přes vat, která byla třikrát extrahována chloroformem, do čistých vialek. Po třepání bylo přidáno do všech skleněných vialek 200 µl 0,5M hydroxidu draselného v methanolu. Třepalo se následně opět 1 h při frekvenci 20 Hz za pokojové

teploty. V následující fázi bylo přidáno ke každému vzorku 200 μ l pufru, který se skládal z 100 μ l 0,5M dihydrogenfosforečnanu draselného a ze 100 μ l 0,5M fosforečnanu sodného. Do každé směsi bylo přidáno 500 μ l hexanu. Posledním přídatkem bylo 30 μ l 4M kyseliny chlorovodíkové. Směsi byly ponechány se třepat 2 min za stejných podmínek jako v předcházejících krocích. Směs byla ponechána cca 5 min bez třepání, aby se rozdělila hexanová a vodná fáze. Hexanové fáze byly předány PhD. Kláře Urbanové (ÚOCHB AV ČR) pro analýzu alkoholů mastných kyselin a methylesterů mastných kyselin na hmotnostní spektrometrii ve spojení s plynovou chromatografií.

5.6 Bioinformatika

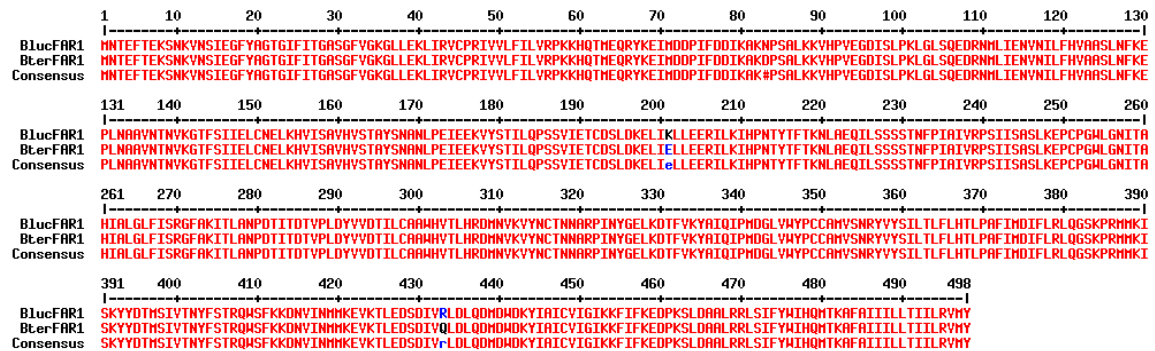
Velikosti hledaných proteinů byly zjištěny z aminokyselinových sekvencí pomocí nástroje Protein molecular weight v programu Sequence Manipulation Suite (http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html).

K porovnání jednotlivých proteinových sekvencí reduktas posloužil program MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Srovnání procentuální identity a podobnosti reduktas jsem učinila v programu Pairwise Sequence Alignment prostřednictvím algoritmu Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/).

6 VÝSLEDKY

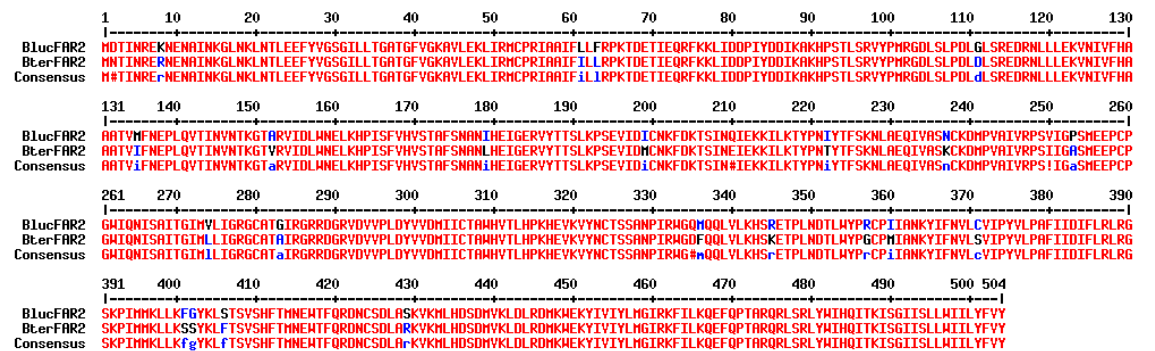
6.1 Porovnání sekvencí reduktas

Na obrázku 4 jsou porovnány FAR1 z druhu *B. lucorum* a *B. terrestris*. Jejich procentuální identita je 99,4%, podobnost 100%. Vysoká podobnost reduktas je v souladu s příbuzností zkoumaných druhů čmeláků.



Obrázek 3: Porovnání proteinových sekvencí FAR1 z *Bombus lucorum* a *Bombus terrestris*.

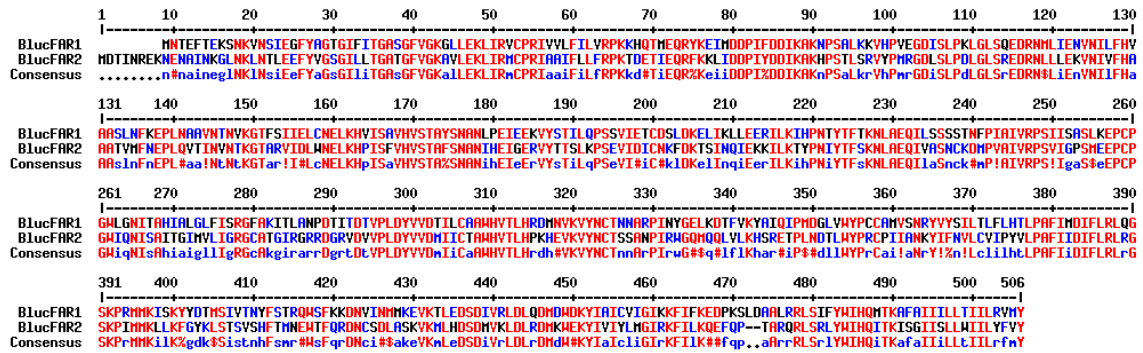
V programu MultAlin byly porovnány proteinové sekvence FAR2 (obrázek 4). Nástrojem Pirwise protein alignment jsem zjistila, že jejich procentuální identita je 94,8% a podobnost 97,0%.



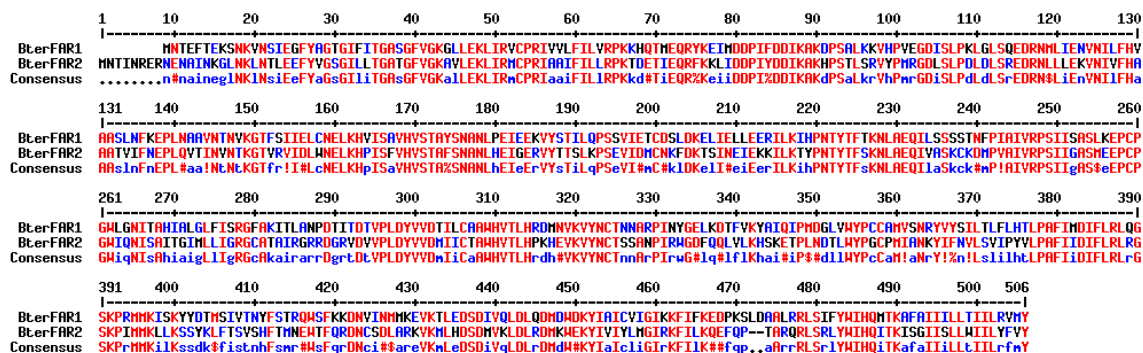
Obrázek 4: Porovnání proteinových sekvencí FAR2 z *Bombus lucorum* a *Bombus terrestris*.

Na obrázcích 5 a 6 jsem porovnávala vzájemně i sekvence FAR1 a FAR2 každého druhu zvlášť. Tato porovnání ukazují, že jejich podobnost je nižší než vzájemná

podobnost FAR1 respektive FAR2. U *B. lucorum* je procentuální identita FAR1 a FAR2 52,4% a podobnost 73,9%. U *B. terrestris* procentuální identita činí 53,6 % a podobnost 73,9 %.



Obrázek 5: Porovnání proteinových sekvencí zkoumaných reduktas FAR1 a FAR2 z *Bombus lucorum*.



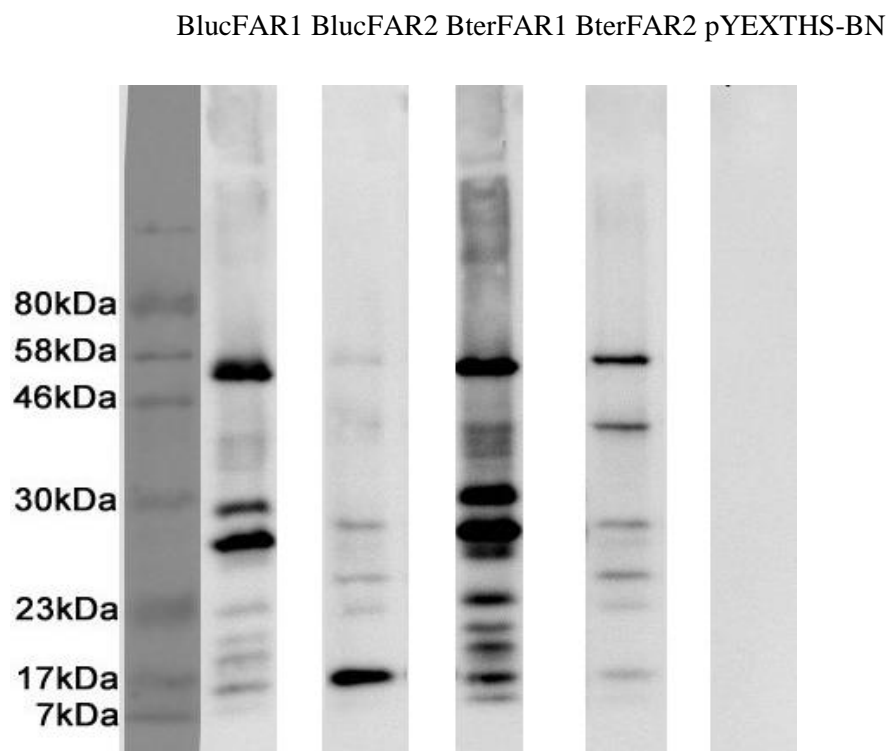
Obrázek 6: Porovnání proteinových sekvencí zkoumaných reduktas FAR1 a FAR2 z *Bombus terrestris*

6.2 Kvasinkové kmeny transformované expresními vektory s reduktasovými kódujícími úseky

Kvasinky byly transformovány vektory BlucFAR1, BlucFAR2, BterFAR1, BterFAR2 (které obsahují kódující úseky zkoumaných reduktas) a také prázdným vektorem pYEXTHS-BN, který sloužil jako kontrola. Tři vybrané kolonie pro každý transformovaný kvasinkový kmen byly zaočkovány do tekutého YNB média a vyčárkovány na zásobní agarové misky s YNB médiem a BSM bez uracilu.

6.3 Detekce heterologně exprimovaných reduktas pomocí western blotu

SDS-PAGE gel se separovanými proteiny byl přenesen pomocí metody Western blot na nitrocelulosovou membránu. Pomocí CCD kamery LAS-3000 byla membrána vyfotografována nejdříve v režimu viditelného světla (pro vizualizaci proužků proteinového standardu) a následně v chemiluminiscenčním režimu pro vizualizaci ostatních proteinových proužků (obrázek 7). Na nitrocelulosoové membráně byly detekovány proteiny s histidinovou kotvou v extraktech z kvasinek transformovaných vektory BlucFAR1, BlucFAR2, BterFAR1 a BterFAR2. V lyzátu kvasinek transformovaných prázdným plasmidem nejsou vidět žádné proteinové proužky. Velikost největších proteinových viditelných proužků odpovídala předpokládané molekulové hmotnosti reduktas. 57 kDa pro FAR1, 58 kDa pro FAR2. Na membráně byly detekovány také zkrácené proteiny.



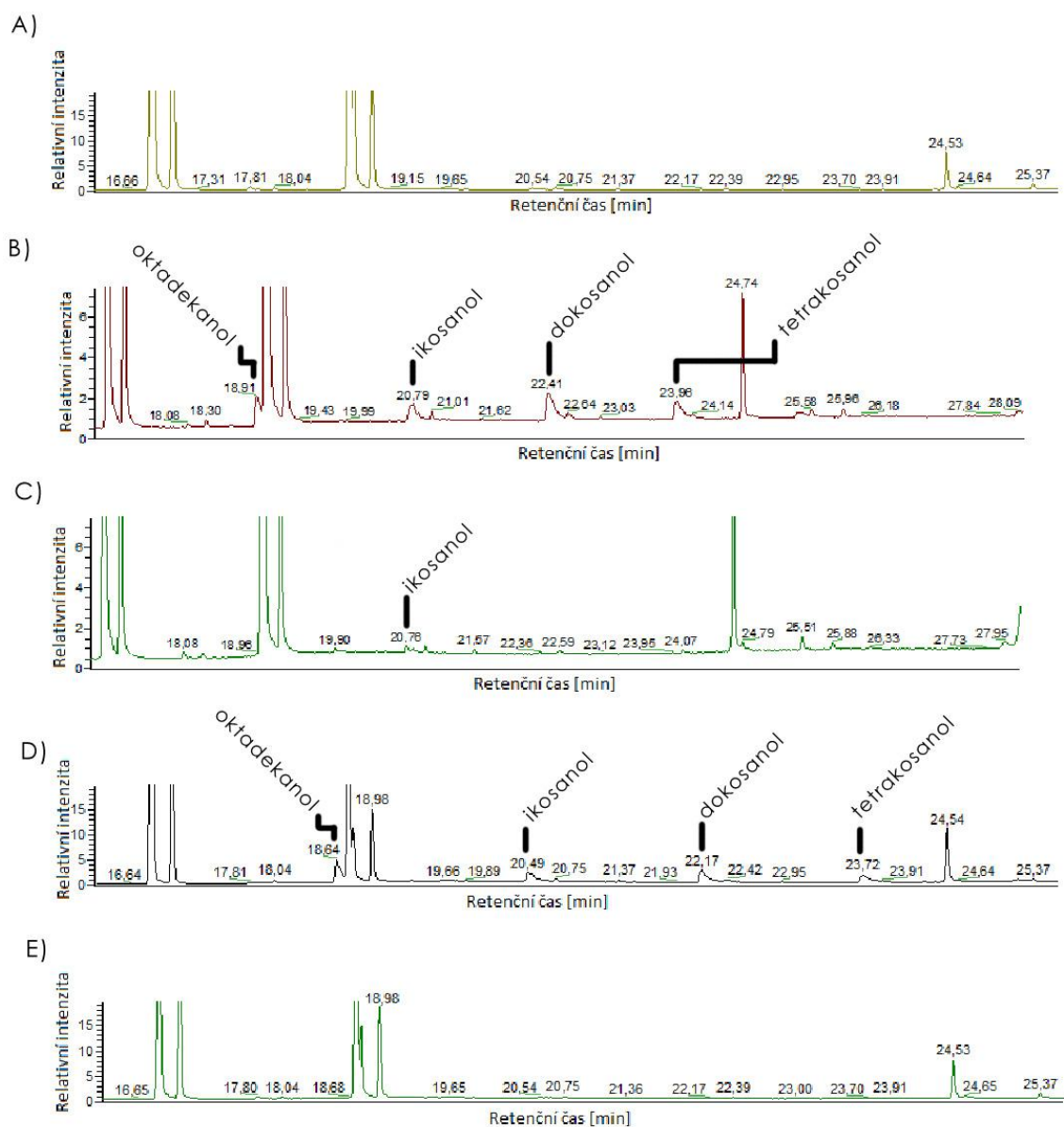
Obrázek 7: Výsledek detekce heterologně exprimovaných reduktas pomocí western blotu. V první cestě je proteinový standard molekulových hmotností, ve

2.-6. cestě byly nanášeny lyzáty kvasinkových kmenů transformovaných *BlucFAR1*, *BlucFAR2*, *BterFAR1*, *BterFAR2* a *pYEXTHS-BN*. Proteiny byly rozděleny SDS elektroforesou a detekovány protilátkou proti histidinové kotvě. Experimentální detaily viz kapitoly 5.3 a 5.4.

6.4 Analýza obsahu alkoholů pomocí GC/MS

1 ml čerstvě připravené směsi dichlormethan/methanol byl přidán k předem lyofilizovaným vzorkům v poměru 2:1. Společně bylo ponecháno na třepače 1 h při cca 20 Hz za pokojové teploty. Přidáno bylo 200 μ l 0,5M hydroxidu draselného v methanolu k přefiltrovaným vzorkům. Opět se nechalo třepat 1 h při cca 20 Hz za pokojové teploty. Po třepání bylo přidáno ke každému vzorku 200 μ l pufru, složeného z 100 μ l 0,5M dihydrogenfosforečnanu draselného a ze 100 μ l 0,5M fosforečnanu sodného. Naposledy bylo přidáváno 500 μ l hexanu a 30 μ l 4M kyseliny chlorovodíkové. Další 2 min se směsi třepaly za stejných podmínek jako v minulých krocích. 5 min se směsi nechaly ustát v klidu. Horní hexanové fáze byly předány Ph.D. Kláře Urbanové (ÚOCHB AV ČR) pro analýzu alkoholů mastných kyselin a methylesterů na hmotnostní spektrometrii ve spojení s plynovou chromatografií.

Předběžné výsledky ukazují, že kvasinkové kmeny transformované výše popsanými plasmidy produkují alkoholy mastných kyselin, které nejsou produkovány kontrolními kvasinkovými kmeny (transformovanými prázdným vektorem *pYEXTHS-BN*). Kvasinky s vektorem *BlucFAR2* nevyprodukovaly detekovatelné množství alkoholu (*obrázek 8, panel E*). U kvasinek s vektorem *BterFAR2* byl nejvíce zastoupeným alkoholem ikosanol (*obrázek 8, panel C*). Kvasinky transformované plasmidem *FAR1* *B. terrestris* i *B. lucorum* produkovaly stejné alkoholy s dlouhými řetězci, a to oktadekanol, ikosanol, dokosanol a tetrakosanol (*obrázek 8, panel B a D*).



Obrázek 8: GC/MS chromatogram z extraktů kvasinkových kmenů, které byly transformovány plasmidy *BlucFAR1* (D), *BlucFAR2* (E), *BterFAR1* (B), *BterFAR2* (C) a *pYEXTHS-BN* (A) v kvasinkách. Na obrázku jsou popsány detekované alkoholy.

7 DISKUZE

Po sekvenování transkriptomů labiální žlázy a tukového tělesa čmeláčích druhů *Bombus lucorum* a *Bombus terrestris* byly identifikovány ty reduktasy, které byly hojně exprimované v labiální žláze. Z těchto kandidátů byly v této práci funkčně charakterizovány v kvasinkovém kmenu reduktasy BlucFAR1, BlucFAR2, BterFAR1 a BterFAR2. Labiální žláza je exokrinní žláza, jež produkuje alkoholy a estery mastných kyselin, které přispívají k druhově specifickému složení feromonů jednotlivých druhů čmeláků. V labiální žláze probíhá redukce koenzymů A mastných kyselin s dlouhými řetězci na alkoholy s dlouhými řetězci. mRNA reduktasy zapojené v biosyntéze feromonů by tedy měly být exprimovány především v labiální žláze a vůbec či velice málo v tukovém tělese. Ve značkovacích feromonech obou druhů čmeláků jsou zastoupeny alkoholy a estery s dlouhými řetězci. BlucFAR1 i BterFAR1 produkovaly v kvasinkovém expresním systému alkoholy s dlouhým řetězcem (< 20 uhlíků). Na základě produkce alkoholů mastných kyselin v kvasinkách exprimujících tyto reduktasy a na základě jejich vysoké míry exprese v labiální žláze (zjištěné dříve pomocí RNA-sekvenováním; neuvedené výsledky) může být řečeno, že se jedná o geny reduktas, který jsou pravděpodobně zodpovědny za výrobu těchto alkoholů a tudíž zodpovědny i za příslušné složení feromonů čmeláků.

V kvasinkách exprimujících čmeláčí reduktasy bylo pomocí metody Western blot a protilátky proti histidinové kotvě detekováno velké množství proteinů kratších než očekávaná délka kompletních FAR1 a FAR2 proteinů. V kvasinkách mohou být příslušné tRNA pro určité kodony méně zastoupeny, než je tomu u hmyzu. Kvasinkové ribosomy tedy čtou mRNA do chvíle, než narazí na kodon, jehož odpovídající tRNA se v kvasinkách vyskytuje jen vzácně. Na tomto místě pravděpodobně dochází k předčasnému ukončení proteosyntézy. To má za následek produkci zkrácených proteinů. Tyto zkrácené proteiny jsou s největší pravděpodobností heterologně exprimované proteiny obsahující histidinovou kotvu. Pokud by detekované krátké proteiny byly výsledkem nespecifické

interakce protilátek proti histidinové kotvě s něčím jiným, než je histidinová kotva – např. s jiným kvasinkovým proteinem – musely by být tyto zkrácené proteiny přítomny i v kontrolním kvasinkovém kmenu transformovaným prázdným plasmidem. Zkrácené proteiny byly detekovatelné i přesto, že byly přidávány inhibitory proteas. Krátké proteiny tedy pravděpodobně nejsou výsledkem proteolytické degradace kompletního proteinu.

Dodatečně se gen nechal syntetizovat sekvencí, která je optimální pro *S. cerevisiae*. Po tomto kroku byl detekován jen jediný proteinový proužek, odpovídající nezkrácené proteinové velikosti reduktasy. Tento důkaz vede k závěru, že zkrácené detekované proteiny jsou důsledek přerušení proteosyntézy kvůli přítomnosti kodonu v původních hmyzích genech, které nejsou preferované kvasinkou. Tato práce byla dodělána dodatečně jinými pracovníky laboratoře. Jejich výsledky v bakalářské práci nejsou uvedeny.

Výsledky GC/MS ukázaly nejvíce zastoupené látky, které byly detekovány v kvasinkách transformovaných vektory exprimujícími reduktasy BlucFAR1, BlucFAR2, BterFAR1 a BterFAR2. Nejvyšší zastoupení měly alkoholy oktadekanol, ikosanol a dokosanol.

GC/MS analýza extraktů z kvasinek exprimujících FAR1 reduktasy ukázala, že jsou jako produkty zastoupeny v expresním kvasinkovém systému alkoholy s dlouhými řetězci.

Reduktasy FAR2 exprimované v kvasinkách produkovaly minimální množství alkoholů. Jedná se o reduktasy, které jsou na základě RNA-sekvenačních dat hojně exprimované v labiální žláze. Je možné, že kvasinkový systém nemusí být optimální pro expresi FAR2 reduktas. Druhým možným vysvětlením může být, že reduktasy FAR2 nejsou příliš aktivní ani ve čmeláčí labiální žláze.

Výsledky sekvenací reduktas ukazují, že reduktasy FAR1 mají vysoce podobné aminokyselinové sekvence. Dá se očekávat, že budou katalyzovat biosyntesu podobných alkoholů, což se potvrdilo ve výsledcích GC/MS. Lze se domnívat, že

enzymové specifity reduktas v jednotlivých druzích zajišťují druhovou specifitu feromonového složení. A tak se podílejí na zabránění mezidruhovému křížení.

V průběhu své bakalářské práce jsem se podílela také na dohledání kompletních kódujících úseků reduktas u druhu čmeláka *B. lapidarius* (čmelák skalní). V labiální žláze *B. lapidarius* jsou hlavní složkou alkoholy se středně dlouhými řetězci (16 – 18 uhlíků). [16] Lze tedy předpokládat, že u *B. lapidarius* budou v labiální žláze exprimovány reduktasy preferující jako substrát 16 – 18 uhlíkaté mastné kyseliny – tedy enzymy významně se lišící od reduktas FAR1 a FAR2.

Dohledání neznámých 5' a 3' koncových kódujících sekvencí u reduktas, pro které byla známa pouze částečná sekvence, probíhalo pomocí metody RACE (Rapid amplification of cDNA ends). Výsledky této práce budou využity v dalších experimentech (výsledky nejsou prezentovány v této bakalářské práci).

Náplní dalšího výzkumu bude funkční charakterizace dalších reduktas, které jsou hojně exprimovány v labiální žláze, a které by se mohly podílet na biosyntéze dalších složek feromonů.

8 Závěr

Alkoholy s dlouhými řetězci byly nalezeny v kvasinkovém kmenu, který exprimoval zkoumané FAR1 a FAR2 z čmeláčích druhů *Bombus lucorum* a *Bombus terrestris*. Mezi nejvíce zastoupené alkoholy v extraktu kvasinek patřily oktadekanol, ikosanol a dokosanol. Tyto látky jsou součástí sekretu labiální žlázy. Předpokládáme tedy, že FAR1 a FAR2 se podílí u čmeláků *B. lucorum* a *B. terrestris* na biosyntéze alkoholů s dlouhými uhlovodíkovými řetězci. Alkoholové látky jsou minoritní složkou značkovacích feromonů výše zmíněných čmeláčích druhů. Tyto výsledky v dalším výzkumu umožní porovnání reduktas u druhů *B. lucorum*, *B. terrestris* a *B. lapidarius*, a zodpovězení otázky, jestli se rozdílné enzymové specifity reduktas podílejí na druhově specifickém složení značkovacích feromonů čmeláků.

Přílohy

Příloha 1: Kódující úseky genů reduktas FAR1 a FAR2 druhů čmeláků B.

lucorum a B. terrestris

>BlucFAR1

MNTEFTEKSNKVNSIEGFYAGTGIFITGASGFVKGKGLLEKLIRVCPRIVV
LFILVRPKKHQTMEQRYKEIMDDPIFDDIKAKNPSALKKVVHPVEGDISLP
KLGLSQEDRNMLIENVNILFHVAASLNFKEPLNAAVNTNVKGTFSIIELC
NELKHVISAVHVSTAYSANANLPEIEEKVYSTILQPSSVIETCDSLKELI
KLEERILKIHNTYTFTKNLAEQILSSSSTNFPPIAIVRPSIISASLKEP
CPGWLGNITAHIALGLFISRGFAKITLANPDTITDTVPLDYVVDTILCAA
WHVTLHRDMNVKVYNCTNNARPINYGELKDTFVKYAIQIPMDGLVWYPCC
AMVSNRYVYSILTFLHTLPAFIMDIFLRLQGSKPRMMKISKYYDTMSIV
TNYFSTRQWSFKKDNVINMMKEVKTLESDIVRLDLQDMDWDKYIAICVI
GIKKFIFKEDPKSLDAALRRLSIFYWIHQMTKAFAI I ILLTII LRVMY*

>BterFAR1

MNTEFTEKSNKVNSIEGFYAGTGIFITGASGFVKGKGLLEKLIRVCPRIVV
LFILVRPKKHQTMEQRYKEIMDDPIFDDIKAKDPSALKKVVHPVEGDISLP
KLGLSQEDRNMLIENVNILFHVAASLNFKEPLNAAVNTNVKGTFSIIELC
NELKHVISAVHVSTAYSANANLPEIEEKVYSTILQPSSVIETCDSLKELI
ELLEERILKIHNTYTFTKNLAEQILSSSSTNFPPIAIVRPSIISASLKEP
CPGWLGNITAHIALGLFISRGFAKITLANPDTITDTVPLDYVVDTILCAA
WHVTLHRDMNVKVYNCTNNARPINYGELKDTFVKYAIQIPMDGLVWYPCC
AMVSNRYVYSILTFLHTLPAFIMDIFLRLQGSKPRMMKISKYYDTMSIV
TNYFSTRQWSFKKDNVINMMKEVKTLESDIVQLDLQDMDWDKYIAICVI
GIKKFIFKEDPKSLDAALRRLSIFYWIHQMTKAFAI I ILLTII LRVMY*

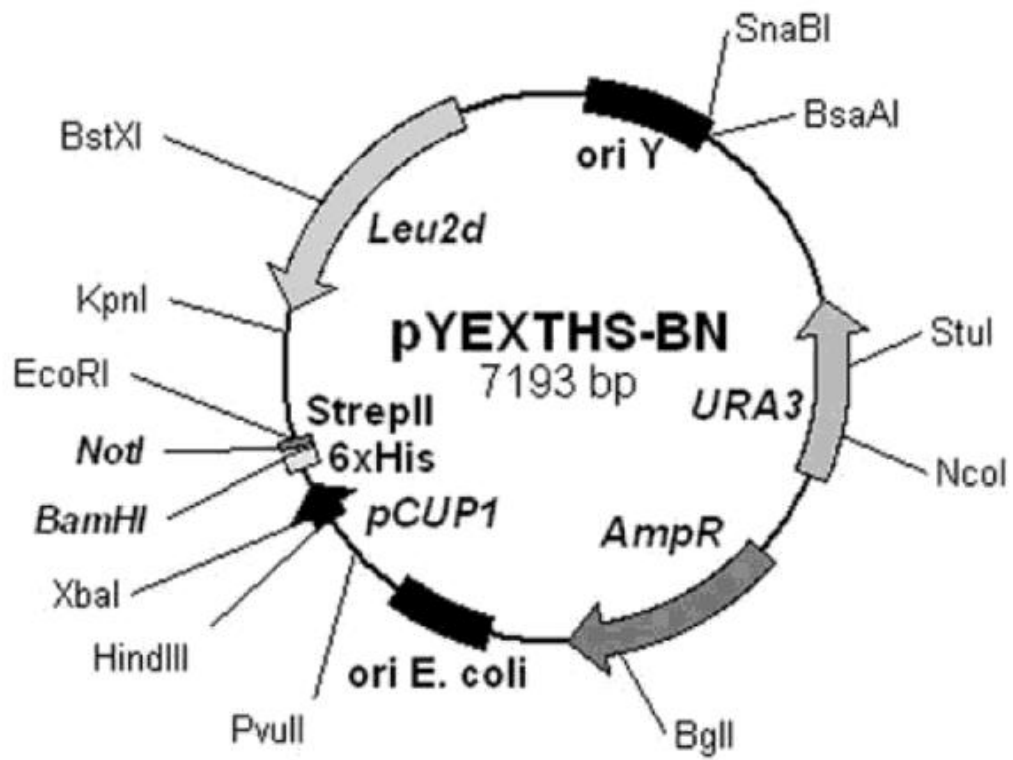
>BlucFAR2

MDTINREKNENAINKGLNKLNTLEEFYVGS GILLTGATGFVKGKAVLEKLI
RMCPRIAAIFLLFRPKTDETIEQRFKKLIDDPIYDDIKAKHPSTLSRVYP
MRGDLSPDLGLSREDRNLLLEKVNIVFHAAATVMFNEPLQVTINVNTKG
TARVIDLWNEKHPISFVHVSTAFSNANIHEIGERVYTTSLKPSEVIDIC
NKFDKTSINQIEKKILKTYPNITYTFSKNLAEQIVASNCKDMPVAIVRPSV
IGPSMEEPCPGWIQNISAITGIMVLI GRGCATGIRGRRDGRVDVPLDYV
VDMI ICTAWHVTLHPKHEVKVYNCTSSANPIRWGQMQLVLKHSRETPLN
DTLWYPRCPIIANKYIFNVL CVIPYVLPAFI IDIFLRLRGSKPIMMKLLK
FGYKLSTSVSHFTMNEWTFQRDNCSDLASKVKMLHDSMDVKLDRDMKWE
KYIVIYLMGIRKFIKQEFQPTARQRLSRLYWIHQITKISGIISLLWIIL
YFVY*

>BterFAR2

MNTINRERNENAINKGLNKLNTLEEFYVGS GILLTGATGFVVGKAVLEKLI
RMCPRIAAIFILLRPKTDETIEQRFKKLIDDPIYDDIKAKHPSTLSRVYP
MRGDLSPDLDSREDRNLLLEKVNIVFHAAATVIFNEPLQVTINVNTKG
TVRVIDLWNEKHPISFVHVSTAFSNANLHEIGERVYTTSLKPSEVIDMC
NKFDKTSINEIEKKILKTYPNYTF SKNLAEQIVASKCKDMPVAIVRPSI
IGASMEEPCPGWIQNISAITGIMLLIGRGCATAIRGRRDGRVDVPLDYV
VDMIICTAWHVTLHPKHEVKVYNCTSSANPIRWGDFQQLVLKHSKETPLN
DTLWYPGCPMIANKYIFNVLSVIPYVLPAFIIDIFLRLRGSKPIMMKLLK
SSYKLFTSVSHFTMNEWTFQRDNCS DLARKVKMLHDSDMVKLDLRDMKWE
KYIVIYLMGIRKFILKQEFQPTARQRLSRLYWIHQITKISGIISLLWIIL
YFVY*

Příloha 2: Mapa použitého vektoru pYEXTHS-BN



Seznam použité literatury

- [1] M. Pavelka and V. Smetana, *Čmeláci*. ZO ČSOP, Valašské Meziříčí, 2003.
- [2] O. Komzáková, “Laboratorní chov čmeláků a jeho význam,” *Živa*, vol. 1, pp. 27–29, 2010.
- [3] V. Ptáček, *Chov čmeláků v laboratoři*. Brno: Tribun EU, 2008.
- [4] M. Ayasse and S. Jarau, “Chemical ecology of bumble bees.,” *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 59, pp. 299–319, 2014.
- [5] V. Ptáček, “Co víme o čmelácích,” *Včelařství*, vol. 01, pp. 37–38, 2013.
- [6] V. Ptáček, “Sezónní cyklus čmeláků,” *Včelařství*, vol. 02, pp. 73–74, 2013.
- [7] D. Goulson, “Bumblebees: behaviour, ecology and conservation,” p. 317, 2010.
- [8] J. Kindl, I. Valterová, and O. Hovorka, “Námluvy čmeláků a pačmeláků,” *Živa*, vol. 4, pp. 169–172, 1998.
- [9] I. Valterová and K. Urbanová, “Chemické signály čmeláků,” *Chem. List.*, vol. 91, no. 10, pp. 846 – 857, 1997.
- [10] M. Hoskovec, “Chemická komunikace hmyzu pohledem organického chemika,” *Chem. List.*, vol. 94, no. 10, pp. 897–904, 2000.
- [11] T. D. Wyatt, *Pheromones and Animal Behaviour: Chemical Signals and Signatures*. Cambridge University Press, 2003.
- [12] I. Valterová and A. Luxová, “Biosyntéza hmyzích feromonů,” *Chem. List.*, vol. 100, no. 4, pp. 243–255, 2006.
- [13] K. Mori, *Chemical Synthesis of Hormones, Pheromones and Other Bioregulators*, vol. 53, no. 9. 2013.
- [14] G. Carot-Sans, L. Muñoz, M. D. Piulachs, A. Guerrero, and G. Rosell, “Identification and characterization of a fatty acyl reductase from a *Spodoptera littoralis* female gland involved in pheromone biosynthesis,” *Insect Mol. Biol.*, vol. 24, no. 1, pp. 82–92, 2015.
- [15] J. M. Lassance, A. T. Groot, M. A. Lienard, B. Antony, C. Borgwardt, F. Andersson, E. Hedenstrom, D. G. Heckel, and C. Lofstedt, “Allelic variation in a fatty-acyl reductase gene causes divergence in moth sex pheromones,” *Nature*, vol. 466, no. 7305, pp. 486–491, 2010.

- [16] A. Buček, H. Vogel, P. Matoušková, D. Prchalová, P. Žáček, V. Vrkoslav, P. Šebesta, A. Svatoš, U. Jahn, I. Valterová, and I. Pichová, “The role of desaturases in the biosynthesis of marking pheromones in bumblebee males,” *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 43, no. 8, pp. 724–731, 2013.
- [17] J. Šobotník, B. Kalinová, L. Cahlíková, F. Weyda, V. Ptáček, and I. Valterová, “Age-dependent changes in structure and function of the male labial gland in *Bombus terrestris*,” *J. Insect Physiol.*, vol. 54, no. 1, pp. 204–214, Jan. 2008.
- [18] L. Ågren, B. Cederberg, and B. G. Svensson, “Changes with age in ultrastructure and pheromone content of male labial glands in some bumble bee species (Hymenoptera, Apidae),” *Zoon*, vol. 7, pp. 1–14, 1979.
- [19] A. Bertsch, H. Schweer, A. Titze, and H. Tanaka, “Male labial gland secretions and mitochondrial DNA markers support species status of *Bombus cryptarum* and *B. magnus* (Hymenoptera, Apidae),” *Insectes Soc.*, vol. 52, no. 1, pp. 45–54, 2005.
- [20] G. Bergström, P. Bergman, M. Appelgren, and J. O. Schmidt, “Labial gland chemistry of three species of bumblebees (Hymenoptera: Apidae) from North America,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 4, no. 3, pp. 515–519, 1996.
- [21] P. Abdoli and A. Monfared, “Identification and Analysis of the Labial Gland Secretions of the Male *Bombus (Psithyrus) vestalis* (Hymenoptera: Apidae) native Iran,” *Linzer Biol. Beiträg*, vol. 45, no. 1, pp. 1471–1478, 2013.
- [22] D. Riendeau and E. Meighen, “Enzymatic reduction of fatty acids and acyl-CoAs to long chain aldehydes and alcohols,” *Experientia*, vol. 41, pp. 707–713, 1985.
- [23] M. a Liénard, A. K. Hagström, J.-M. Lassance, and C. Löfstedt, “Evolution of multicomponent pheromone signals in small ermine moths involves a single fatty-acyl reductase gene,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 24, pp. 10955–10960, 2010.
- [24] M. a Liénard and C. Löfstedt, “Functional flexibility as a prelude to signal diversity?: Role of a fatty acyl reductase in moth pheromone evolution,”

- Commun. Integr. Biol.*, vol. 3, no. 6, pp. 586–8, 2010.
- [25] P. Teerawanichpan and X. Qiu, “Fatty acyl-coA reductase and wax synthase from euglena gracilis in the biosynthesis of medium-chain wax esters,” *Lipids*, vol. 45, no. 3, pp. 263–273, 2010.
- [26] J. a Tillman, S. J. Seybold, R. a Jurenka, and G. J. Blomquist, “Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation,” *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 29, no. 6, pp. 481–514, 1999.
- [27] A. von Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm, and E. Hecker, “Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners Bombyx mori. Reindarstellung und Konstitution,” *Zeitschrift für Naturforschung. B, J. Chem. Sci.*, vol. 14b, pp. 283–284, 1959.
- [28] B. Antony, T. Fujii, K. Moto, S. Matsumoto, M. Fukuzawa, R. Nakano, S. Tatsuki, and Y. Ishikawa, “Pheromone-gland-specific fatty-acyl reductase in the adzuki bean borer, Ostrinia scapulalis (Lepidoptera: Crambidae),” *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 39, no. 2, pp. 90–95, 2009.
- [29] K. Moto, T. Yoshiga, M. Yamamoto, S. Takahashi, K. Okano, T. Ando, T. Nakata, and S. Matsumoto, “Pheromone gland-specific fatty-acyl reductase of the silkworm, Bombyx mori.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 16, pp. 9156–61, 2003.
- [30] A. Buček, J. Brabcová, H. Vogel, D. Prchalová, J. Kindl, I. Valterová, and I. Pichová, “Exploring complex pheromone biosynthetic processes in the bumblebee male labial gland by RNA sequencing,” *Insect Mol. Biol.*, vol. 25, no. 3, pp. 295–314, 2016.
- [31] P. Teerawanichpan, A. J. Robertson, and X. Qiu, “A fatty acyl-CoA reductase highly expressed in the head of honey bee (*Apis mellifera*) involves biosynthesis of a wide range of aliphatic fatty alcohols,” *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 40, no. 9, pp. 641–649, 2010.
- [32] C. Holz, O. Hesse, N. Bolotina, U. Stahl, and C. Lang, “A micro-scale process for high-throughput expression of cDNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 25, no. 3, pp. 372–378, 2002.

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.“

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka