

Autoreferát
DISERTAČNÍ PRÁCE

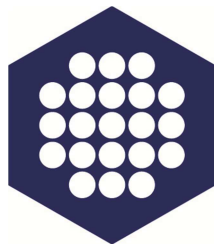
Studium evoluce desaturas mastných kyselin zapojených v biosyntéze hmyzích feromonů

Mgr. Aleš Buček

Školitel: Iva Pichová, PhD



Katedra Biochemie
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze



Ústav organické chemie a biochemie
Akademie věd České republiky, v.v.i.

Praha 2016

Abstrakt

Hmyz čítající více než jeden milion popsaných druhů představuje skupinu organismů s ekologickým a ekonomickým významem disproporčně větším než je jejich často zanedbatelná tělesná velikost. Mezi faktory, které zásadní měrou přispěly k evoluční úspěšnosti hmyzu, je počítána schopnost produkovat řadu sekundárních metabolitů, jako jsou obranné látky a chemické signály. Tato disertační práce se věnuje studiu molekulárních mechanismů evoluce jedné široce zastoupené skupiny hmyzích chemických signálů – pohlavních feromonů – tedy látek, které zprostředkovávají vyhledávání pohlavních partnerů a páření jedinců téhož druhu. Téma práce je zaměřeno na membránové desaturasy mastných kyselin (dále jen desaturasy), oxidoreduktasy, které zavádí dvojně vazby do uhlovodíkových řetězců mastných kyselin a tak produkují nenasycené prekurzory pohlavních feromonů odvozených od mastných kyselin. Desaturasy jsou zapojeny v biosyntéze pohlavních feromonů například u můr (Lepidoptera), dvoukřídlých (Diptera), blanokřídlých (Hymenoptera), švábů a termitů (Blattodea) – tedy jedněch z druhově nejbohatších hmyzích řádů. Jelikož pohlavní feromony slouží jako reprodukční bariéry u mnohých blízce příbuzných druhů či subpopulací, odhalení molekulárních základů biosyntézy feromonů může pomoci zodpovědět klíčové otázky týkající se ekologie a evoluce hmyzu. Hmyzí desaturasy s různorodými enzymovými specifitami také představují přirozeně dostupný zdroj pro studium evoluce enzymů.

Disertační práce se věnuje desaturasam blanokřídlých (čmeláci - *Bombus*), můr (lišaj tabákový - *Manduca sexta*) a pro srovnání také jednobuněčných organismů (patogenní kvasinka *Candida parapsilosis*). Výsledky práce ukazují, že schopnost produkovat široké spektrum nenasycených mastných kyselin je sdílena desaturasami napříč biologickými říšemi (Publikace I a III). Desaturasy zapojené v biosyntéze feromonů mohou získat schopnost produkovat nové nenasycené mastné kyseliny důsledkem substituce jediného aminokyselinového zbytku – mechanismus, který má značný potenciál v evoluci feromonového složení můr (Publikace I). Zjištění, že tato aminokyselina se v desaturase lišaje tabákového nachází v ohybu tunelu, který váže substrát, poskytuje nový vhled do mechanismů určujících desaturasovou specifitu (Publikace I). Studium desaturas u třech druhů čmeláků odhaluje post-transkripční regulaci aktivity desaturas jako možný alternativní mechanismus určující druhově specifické feromonové složení u blanokřídlých (Publikace II). Tato disertační práce tak na genetické úrovni poodhaluje roli desaturas v evoluci feromonové komunikace u můr a blanokřídlých.

Obsah

1	CÍLE PRÁCE	4
2	PUBLIKACE	5
2.1	<i>Publikace I:</i> Evoluce pohlavních feromonů mūr prostřednictvím substituce jediného aminokyselinového zbytku v desaturase mastných kyselin	6
2.2	<i>Publikace II:</i> Role desaturas v biosyntéze značkovacích feromonů samců čmeláků.....	9
2.3	<i>Publikace III:</i> $\Delta 12$ desaturasa z kvasinky <i>Candida parapsilosis</i> je multifunkční desaturasa, která produkuje řadu vícenenasycených a hydroxylovaných mastných kyselin	12
3	LITERATURA	16
4	CURRICULUM VITAE	18

1 Cíle práce

- Odhalit molekulární základy evoluce pohlavních feromonů můr prostřednictvím identifikace a charakterizace desaturas mastných kyselin, které jsou u lišaje tabákového (*Manduca sexta*) zapojené v biosyntéze vzácných feromonových složek se třemi dvojnými vazbami (Publikace I).
- Zhodnotit, do jaké míry je druhově specifické složení samčích značkovacích feromonů u třech evropských druhů čmeláků (*Bombus terrestris*, *B. lucorum* a *B. lapidarius*) ovlivněno substrátovými specifitami hypotetických desaturas mastných kyselin zapojených v biosyntéze nenasycených feromonových složek (Publikace II).
- Identifikovat desaturasy mastných kyselin zapojené v biosyntéze vícenasycených mastných kyselin u oportunisticky patogenní kvasinky *Candida parapsilosis* a na základě detailní analýzy desaturasových produktů zhodnotit současnou kategorizaci kvasinkových desaturas (Publikace III).

2 Publikace

Publikace zahrnuté v disertační práci

- I. Buček A, Matoušková P, Vogel H, Šebesta P, Jahn U, Weißflog J, Svatoš A, Pichová I (2015) *Evolution of moth sex pheromone composition by a single amino acid substitution in a fatty acid desaturase*. Proc Natl Acad Sci **112**(41): 12586–12591.
- II. Buček A, Vogel H, Matoušková P, Prchalová D, Záček P, Vrkoslav V, Šebesta P, Svatoš A, Jahn U, Valterová I, Pichová I (2013) *The role of desaturases in the biosynthesis of marking pheromones in bumblebee males*. Insect Biochem Mol Biol **43**(8): 724–31.
- III. Buček A, Matoušková P, Sychrová H, Pichová I, Hrušková-Heidingsfeldová O (2014) *$\Delta 12$ -fatty acid desaturase from *Candida parapsilosis* is a multifunctional desaturase producing a range of polyunsaturated and hydroxylated fatty acids*. PLoS One **9**(3):e93322.

Publikace nezahrnuté v disertační práci

- I. Prchalová D, Buček A, Brabcová J, Záček P, Kindl J, Valterová I, Pichová I (2016) *Regulation of isoprenoid pheromone biosynthesis in bumblebee males*. ChemBioChem **17**(3), 260–267.
- II. Bourguignon T, Šobotník J, Brabcová J, Sillam-Dussès D, Buček A, Krasulová J, Vytisková B, Demianová Z, Mareš M, Roisin Y, Vogel H (2016) *Molecular mechanism of the two-component suicidal weapon of *Neocapritermes taracua* old workers*. Mol Biol Evol **33**(3), 809–819
- III. Buček A, Brabcová J, Vogel H, Prchalová D, Kindl J, Valterová I, Pichová I (2016) *Exploring complex pheromone biosynthetic processes in the bumblebee male labial gland by RNA sequencing*. Insect Mol Biol. **25**(3), 295-314

2.1 *Publikace I*: Evoluce pohlavních feromonů mūr prostřednictvím substitutce jediného aminokyselinového zbytku v desaturase mastných kyselin

Úvod

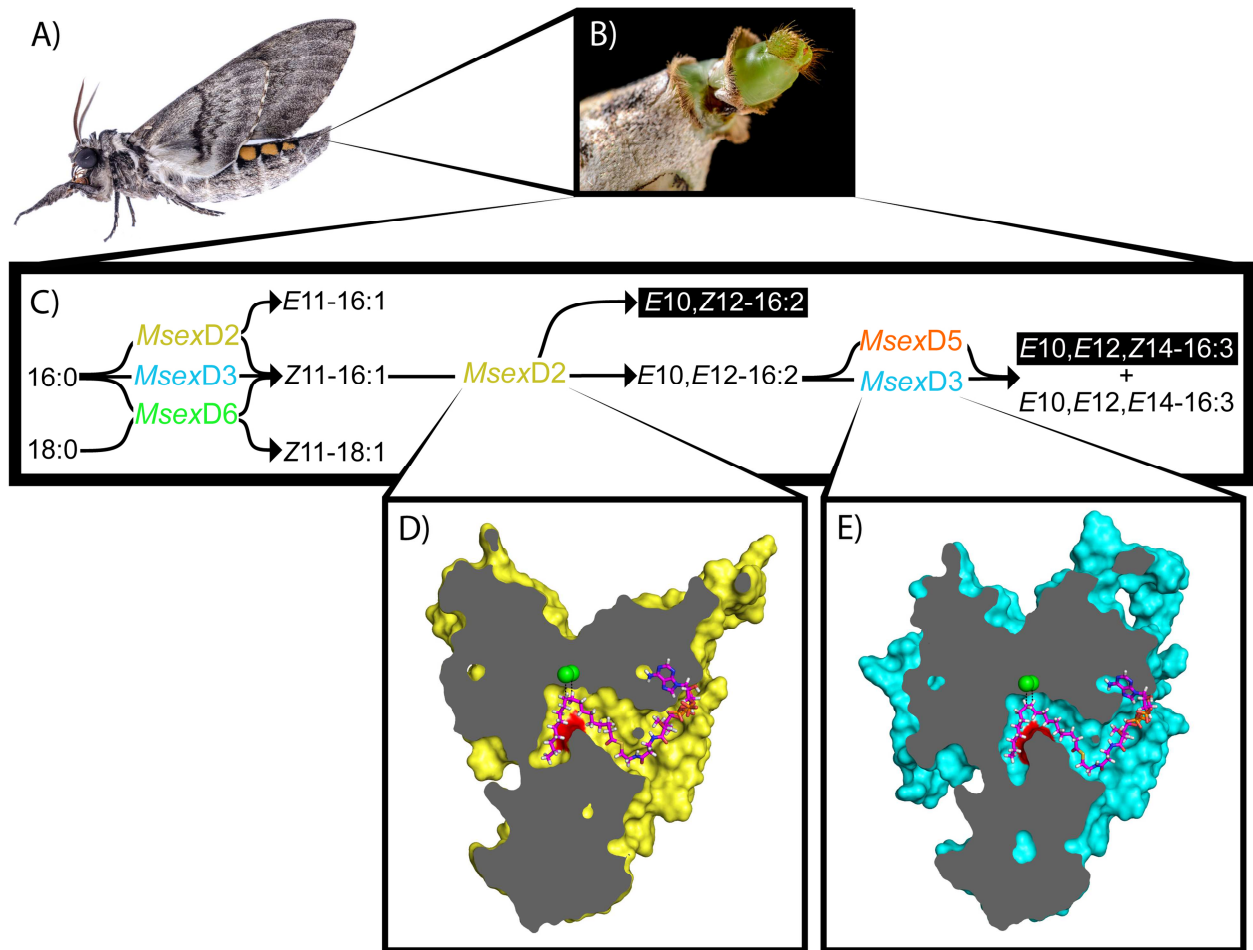
Samičky lišaje tabákového (*Manduca sexta*) lákají samce svého druhu prostřednictvím pohlavního feromonu (dále jen feromonu), který obsahuje kromě aldehydů odvozených od jednonenasycených a dvounenasycených mastných kyselin (1nMK respektive 2nMK), které jsou typickou feromonovou strukturou u mūr z nadčeledi Bombycoidea¹, také unikátní aldehydy odvozené od třínenasycených mastných kyselin (3nMK). Přítomnost derivátů 3nMK ve feromonové směsi představuje snadno identifikovatelný vzácný fenotyp, což činí z lišaje tabákového vhodný, ale doposud nevyužitý modelový organismus pro studium mechanismů evoluce feromonového složení mūr. V předchozí práci, ve které se naše laboratoř pokusila objasnit biosyntetickou dráhu, která vede k syntéze 3nMK (*E10,E12,E14-16:3* a *E10,E12,Z14-16:3*), které jsou prekurzory esenciálních feromonových složek lišaje tabákového, byla identifikována desaturasa *MsexD2*, která vykazuje *Z/E11* desaturasovou a konjugasovou (1,4-dehydrogenasovou) aktivitu a je zapojena v syntéze 1nMK (*Z11-16:1* a *E11-16:1*) a 2nMK (*E10,E12-16:2* a *E10,Z12-16:2*) prekurzorů feromonů u lišaje tabákového². Konečný desaturační krok zavádějící třetí dvojnou vazbu a příslušná desaturasa však nebyly odhaleny^{2,3}.

Shrnutí výsledků

Pro nalezení desaturas zapojených v biosyntéze 3nMK jsme osekvenovali transkriptom feromonové žlázy samičky lišaje tabákového - orgánu který je místem biosyntézy feromonů³, a také transkriptomy dalších orgánů a tkání lišaje tabákového, které feromony neprodukují (samičí tukové těleso, samičí palpy a střední střevo housenky lišaje tabákového). V transkriptomech jsme identifikovali 14 různých desaturasových transkriptů, z nichž 4 byly vysoce abundantně a preferenčně exprimovány ve feromonové žláze: *MsexD2* - dříve popsána *Z11*-desaturasa/konjugasa zapojená v biosyntéze 1nMK a 2nMK², a tři další transkripty - *MsexD3*, *MsexD5* a *MsexD6*. Kódující úseky těchto kandidátních desaturasových genů jsme exprimovali v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* a pomocí GC/MS analýzy transesterifikovaných kvasinkových extraktů jsme identifikovali nenasyčené mastné kyseliny produkované heterologně exprimovanými desaturasami. *MsexD3* a *MsexD5* v kvasinkovém systému produkovaly 3nMK (*E10,E12,E14-16:3* a *E10,E12,Z14-16:3*) prostřednictvím *E/Z14* desaturace 2nMK (*E10,E12-16:2*) a další minoritní nenasyčené mastné kyseliny, zatímco *MsexD6* produkovala *Z11-18:1*, předpokládaný prekurzor

minoritní složku feromonu lišaje tabákového. Substráty a produkty desaturas určené pomocí kvasinkového expresního systému byly potvrzeny *in vivo* prostřednictvím aplikace metabolicky značených mastných kyselin a methylesterů mastných kyselin na povrch samičí feromonové žlázy a sledováním jejich inkorporace do feromonových prekurzorů ve feromonové žláze pomocí GC/MS. Tímto postupem byla potvrzena *in vivo* biosyntéza 3nMK z 2nMK.

MsexD2 a MsexD3, které jsou vysoce podobné na úrovni proteinové sekvence, avšak odlišné svými desaturasovými specifitami, byly v následných mutačních experimentech využity pro identifikaci sekvenčních determinant desaturasových specifit. Úvodní sada mutantů se zaměněnými úseky mezi MsexD2 a MsexD3 odhalila predikovaný čtvrtý transmembránový helix jako determinantu desaturasové specifity. Následná mutagenese jednotlivých aminokyselinových zbytků v rámci tohoto transmembránového helixu ukázala, že záměna jediného aminokyselinového zbytku Ala224/Ile224 vede k zisku *E/Z*14-desaturasové specifity u mutované MsexD2 (a naopak mutace Ile224/Ala224 vede ke ztrátě *E/Z*14-desaturasové aktivity u mutované MsexD3). Díky nedávno publikované struktuře savčí Z9-desaturasy^{4,5} jsme vygenerovali homologní modely MsexD2 a MsexD3, které ukázaly, že aminokyselinový zbytek v pozici 224 přispívá k tvorbě ohybu v hydrofobním tunelu vázajícím substrát. Tyto data tak experimentálně potvrzují hypotézu formulovanou na základě krystalové struktury Z9-desaturas, dle které ohyb v tunelu vázajícím substrát je klíčovým determinantem specifity desaturas⁵. Tyto výsledky dále ukazují, že mutace jediné aminokyseliny v desaturase zapojené v biosyntéze feromonů může vést k zisku nové desaturasové specifity, potenciálně vedoucí až k rekrutování nových feromonových složek (Obr. 1). Rekonstrukce genového stromu desaturas můr naznačuje, že MsexD3 byla rekrutována pro biosyntézu 3nMK feromonových složek u předka lišaje tabákového prostřednictvím genové duplikace a neofunkcionalizace desaturasového genu, zatímco MsexD5, která představuje alternativní desaturasu produkující 3nMK, byla pravděpodobně získána pro biosyntézu feromonů prostřednictvím aktivace neaktivní ancestrální MsexD5.



Obrázek 1: Rekonstruovaná biosyntetická dráha nenasycených prekurzorů pohlavních feromonů lišaje tabákového. Samička lišaje tabákového (A) biosyntetizuje pohlavní feromony ve feromonové žláze lokalizované ve vychlipitelné špičce zadečku (B). Desaturasy abundantly a preferenčně exprimované ve feromonové žláze tvoří desaturační dráhu, která vede k biosyntéze nenasycených mastných kyselin, jež slouží jako prekurzory majoritních i minoritních feromonových složek včetně aldehydů odvozených od E10,Z12-16:2 a E10,E12,Z14-16:3, které jsou esenciální pro atrakci samců lišaje tabákového (C). Aminokyselinový zbytek Ala224 respektive Ile224 je lokalizován v predikovaném čtvrtém transmembránovém helixu desaturasy a určuje, jestli produktem desaturasy budou jedno- a dvouenasycené mastné kyseliny nebo tříenasycené mastné kyseliny. V průřezu modelem MsexD2 (D) a MsexD3 (E) vytvořeném pomocí homologního modelování s využitím lidské Z9-desaturasy jako šablony, je Ala224 respektive Ile224 lokalizován do ohybu tunelu, který váže substrát (vypočtený povrch aminokyseliny exponovaný do interiéru vazebného tunelu je zvýrazněn červeně). Vazebný tunel je obsazen uhlovodíkovým řetězcem mastné kyseliny pocházejícím ze struktury lidské Z9-desaturasy. Obrázek přejat z⁶.

Můj příspěvek k práci

Analyzoval jsem RNA sekvenční data a identifikoval desaturasové transkripty; izoloval jsem kódující úseky MsexD6 a pět variant kódujících úseků MsexD5 a klonoval je do kvasinkových expresních vektorů; připravil jsem část stuovaných mutantů MsexD2 a MsexD3 a společně

s vektory obsahujícími MsexD5 a MsexD6 je transformoval do kvasinkových kmenů; kultivoval jsem kvasinkové kmeny exprimující všechny studované desaturasy a jejich mutanty; izoloval jsem, analyzoval a vyhodnotil obsah methylesterů mastných kyselin prostřednictvím GC/MS; aplikoval jsem izotopově značené feromonové prekurzory na povrch feromonových žláz lišaje tabákového a pomocí GC/MS jsem analyzoval vzniklé izotopově značené mastné kyseliny a přirozeně se vyskytující mastné kyseliny; zrekonstruoval jsem genový strom desaturas; napsal jsem pracovní verzi manuskriptu.

2.2 *Publikace II: Role desaturas v biosyntéze značkovacích feromonů samců čmeláků*

Úvod

U většiny druhů čmeláků (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*) je nalezení pohlavního partnera a páření sprostředkováno značkovacími feromony (ZF), které samci produkují a nanášejí na výrazné objekty (například vysoké byliny, větve stromů a keřů) za účelem přilákání samičky⁷. ZF jsou produkovány a akumulovány v hlavové části samčí labiální žlázy, která vyplňuje velkou část hlavové kapsule^{8,9}, což jí odlišuje od labiální žlázy čmeláčích samiček¹⁰ nebo labiální žlázy samců včely medonosné (*Apis mellifera*), které neakumulují v labiální žláze pohlavní feromony¹¹.

ZF jsou obecně složeny z látek odvozených od terpenů a mastných kyselin. Přítomnost složek ZF, odvozených od nenasycených mastných kyselin lišících se u jednotlivých čmeláčích druhů délkou uhlovodíkového řetězce, vedla k hypotéze, podle které k mezidruhovým rozdílům v obsahu těchto feromonových složek přispívají desaturasy s druhově specifickou substrátovou specifitou¹². Tento biosyntetický mechanismus vedoucí k druhově specifickému složení ZF byl postulován na základě popsáných rozdílů ve specifitě desaturas zapojených v biosyntéze feromonů mūr¹².

Studium desaturas zapojených v biosyntéze ZF u čmeláků bylo motivováno snahou o zavedení čmeláků jako doposud nevyužitého modelu pro pochopení molekulárních základů biosyntézy feromonů a evoluce feromonové komunikace. Jako čmeláčí druhy reprezentující diverzitu složení ZF byly vybrány tři v Evropě běžní čmeláci - i) *Bombus terrestris* (čmelák zemní), který je využíván také komerčně jako opylovač ve sklenících a jehož ZF jsou tvořeny převážně terpenovými látkami a do menší míry alkoholy odvozenými od mastných kyselin, ii) blízký příbuzný druh *B. lucorum* (čmelák hájový, stejně jako čmelák zemní zástupce podrodu *Bombus* s.s.), který používá ethyl ester odvozený od Z9-14:1 jako majoritní složku ZF, a iii) *B. lapidarius*

(čmelák skalní), zástupce podrodu *Melanobombus*, jehož ZF obsahuje jako dominantní složky alkoholy odvozené od Z9-16:1 a 16:0. V úvodní studii byl úsek kódující predikovaný čtecí rámeček desaturasy, pojmenovaný jako BlucNPVE, vyizolován z cDNA připravené z RNA labiální žlázy *B. lucorum*. Funkční charakterizace BlucNPVE v kvasinkovém expresním systému prokázala, že BlucNPVE kóduje Z9-desaturasu, která v kvasinkovém expresním systému preferenčně produkovala kyselinu palmitovou (Z9-16:1) a stearovou (Z9-18:1) a stopové množství kyseliny myristolejové (Z9-14:1). Akumulace pouze malého množství Z9-14:1 v kvasinkovém expresním systému naznačila, že BlucNPVE pravděpodobně není zodpovědná za akumulaci Z9-14:1, prekursoru majoritní složky ZF v labiální žláze *B. lucorum*. Bylo navrženo, že tato desaturasa je zapojena v primárním metabolismu mastných kyselin a že v biosyntéze ZF je pravděpodobně zapojen jiný desaturasový homolog¹³. Postulovaná desaturasa zapojená v biosyntéze ZF u *B. lucorum* a také desaturasy zapojené v biosyntéze ZF u *B. terrestris* a *B. lapidarius* tak čekaly na svou izolaci, charakterizaci a zhodnocení, do jaké míry jejich substrátová specifita může přispívat ke druhově specifickému složení ZF.

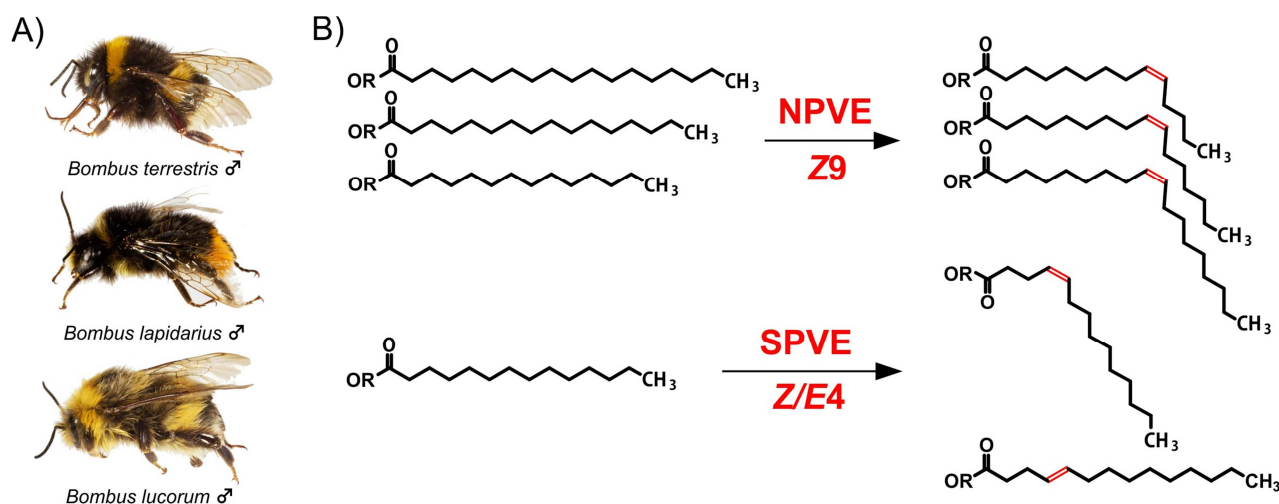
Shrnutí výsledků

S pomocí RNA sekvenování samčích labiálních žláz a tukových těles (sloužících jako referenční tkáň, jenž neprodukuje ZF) čmeláků *B. lucorum* a *B. terrestris* jsme v transkriptomech obou druhů predikovali pět paralogů desaturas. Dva desaturasové paralogy byly na základě normalizovaných expresních hodnot vypočtených z RNA sekvenačních dat (RPKM hodnoty) výrazně více exprimovány v labiální žláze než v tukovém tělese u obou druhů – BlucNPVE (identická s kódujícím úsekem dříve popsáným Matouškovou et al.¹³) a BlucSPVE u *B. lucorum* a BterNPVE a BterSPVE u *B. terrestris*. Preferenční exprese těchto predikovaných desaturas v labiální žláze byla potvrzena pomocí qRT-PCR. Kódující úseky pravděpodobných orthologů těchto desaturas z *B. lapidarius* byly vyizolovány z cDNA z labiální žlázy prostřednictvím PCR s degenerovanými primery navrženými proti konzervovaným desaturasovým sekvenčním motivům a pojmenovány BlapNPVE a BlapSPVE. Desaturasy studovaných druhů čmeláků patřící do skupin NPVE a SPVE, pojmenovaných na základě přítomnosti konzervovaného aminokyselinového motivu NPVE respektive SPVE, sdílely více než 97% identitu proteinových sekvencí v rámci skupin a přibližně 60% identitu napříč skupinami. Funkční charakterizace desaturas v kvasinkovém expresním systému ukázala, že desaturasové specifity NPVE desaturas všech studovaných čmeláčích druhů jsou prakticky identické. NPVE vykazují Z9 desaturasovou regiosektivitu a nejvyšší stupeň konverze (vypočtený jako poměr relativního zastoupení udané nenasycené mastné kyseliny ku celkovému množství nenasycené mastné kyseliny a odpovídající nasycené mastné

kyseliny) pro 18:0, následovaný 16:0 a 14:0. SPVE desaturasy produkují stopové množství Z4-14:1 a E4-14:1 jako jediné detekované produkty, které se však přirozeně nevyskytují (nebyly identifikovány) v labiální žláze čmeláčích samců ani u jiného hmyzu (Obr. 2).

Tyto výsledky naznačují, že i přes to, že substrátové specifity desaturas NPVE neodpovídají složení ZF u studovaných druhů čmeláků, jsou tyto desaturasy s největší pravděpodobností zodpovědné za biosyntézu Z9-nenasycených složek ZF, jelikož jsou jedinými Z9 desaturasami vysoce exprimovanými v labiální žláze. BterNPVE na základě RNA sekvenačních dat představuje překvapivě jeden z nejzastoupenějších transkriptů v labiální žláze *B. terrestris*, což společně s velmi nízkým obsahem předpokládaných produktů BterNPVE (Z9 nenasycených složek ZF) naznačuje, že aktivita BterNPVE je regulována posttranskripčně. Dohromady provedené experimenty ukazují, že enzymové specifity desaturas u studovaných druhů čmeláků nedivergovaly v průběhu evoluce a tedy že druhově specifické složení ZF není důsledkem rozdílných substrátových specifit desaturas a tedy není kontrolováno stejným mechanismem jako u mnoha druhů mūr. Jako alternativní biosyntetické vysvětlení rozdílného složení ZF u studovaných druhů předpokládáme, že druhově specifické složení ZF je ovlivněno *i)* postranskripční regulací desaturas a *ii)* množstvím a dostupností mastných kyselin s určitou délkou řetězce v labiální žláze, případně *iii)* substrátovou specifitou enzymů jako jsou reduktasy mastných kyselin nebo enzymy katalyzující esterifikaci, které využívají nenasycené mastné kyseliny jako substrát a transformují je na finální složky ZF.

V experimentech, které navazují na tuto práci, nyní usilujeme o izolaci a charakterizaci čmeláčích reduktas mastných kyselin, které mohou redukovat nenasycené mastné kyseliny na alkoholy, jenž jsou u některých druhů čmeláků majoritními feromonovými složkami, a dále analyzujeme relativní a absolutní zastoupení mastných kyselin, jakožto prekurzorů ZF, v labiálních žlázách jednotlivých druhů.



Obrázek 2: Specifita desaturas abundantně exprimovaných v labiální žláze čmeláků *Bombus terrestris*, *B. lucorum* a *B. lapidarius*. Ve studovaných druzích čmeláků (A) jsou abundantně exprimovány dva orthology desaturas, NPVE a SPVE, které vykazují Z9 a E/Z4 desaturasovou specifitu, respektive a substrátovou preferenci pro 14:-18:0 a 14:0, respektive. Obrázek přejat z¹⁴.

Můj příspěvek k práci

Analyzoval jsem RNA-seq data a identifikoval desaturasové transkripty; potvrdil jsem expresní profil desaturas BlucNPVE a BlucSPVE v labiální žláze a tukovém tělese pomocí qRT-PCR; klonoval jsem všechny kódující úseky desaturas do kvasinkových expresních vektorů a transformoval je do kvasinkových kmenů, kultivoval kvasinkové kmeny a provedl izolaci a analýzu mastných kyselin; napsal jsem pracovní verzi manuskriptu.

2.3 Publikace III: $\Delta 12$ desaturasa z kvasinky *Candida parapsilosis* je multifunkční desaturasa, která produkuje řadu vícenenasycených a hydroxylovaných mastných kyselin

Úvod

Výzkum desaturas mastných kyselin izolovaných z kvasinek a vícebuněčných hub je do značné míry motivován hledáním desaturasových genů, které by mohly být využity v metabolickém inženýrství mikroorganismů za účelem produkce vícenenasycených mastných kyselin (VNMK) a dalších nutričně, či technologicky hodnotných nenasycených mastných kyselin (NMK) v průmyslovém měřítku^{15,16}.

Regulace nenasycenosti mastných kyselin v membránových lipidech prostřednictvím aktivity desaturas byla také prokázána jako klíčový krok pro růst a morfogenezi patogeních kvasinek napadajících rostliny i lidské hostitele. Proto byly desaturasy navrženy jako potenciální cíl

antifungálních přípravků¹⁷⁻²¹. Široké spektrum $\Delta 12$, $\Delta 15$ a multifunkčních desaturas zapojených v biosyntéze VNMK bylo již z hub izolováno a funkčně charakterizováno pomocí kvasinkového expresního systému²²⁻³³. Byla popsána řada typů desaturasových regioselektivit lišících se mechanismem, jakým desaturasa rozeznává pozici, na kterou bude zavedena dvojná vazba. Dvojně vazby mohou být zaváděny mezi určité uhlíky *i*) vzhledem ke karboxylovému konci acylu mastné kyseliny (ΔX), *ii*) vzhledem k methylovému konci (ωX) nebo *iii*) určitý počet (nejčastěji tří) uhlíkových atomů od existující dvojně vazby ($v+3$)³⁴. Jednotlivé typy regioselektivit se však vzájemně nevylučují a Meesapyodsuk et al. navrhl přiřadit desaturasám primární a sekundární typ regioselektivity pro jejich přesnější charakterizaci²². Pro takovýto popis desaturas jsou nezbytné detailní informace o majoritních i minoritních desaturasových substrátech a produktech. Avšak u většiny desaturas izolovaných z hub byly popsány jen majoritní VNMK produkty a studie, které detailně studovaly nenasycené produkty již charakterizovaných desaturas^{26,35} ukazují, že minoritní produkty mohou zůstat nerozpoznány a regioselektivita desaturas je tak často neúplně či nepřesně popsána jen na základě majoritních produktů^{36,37}.

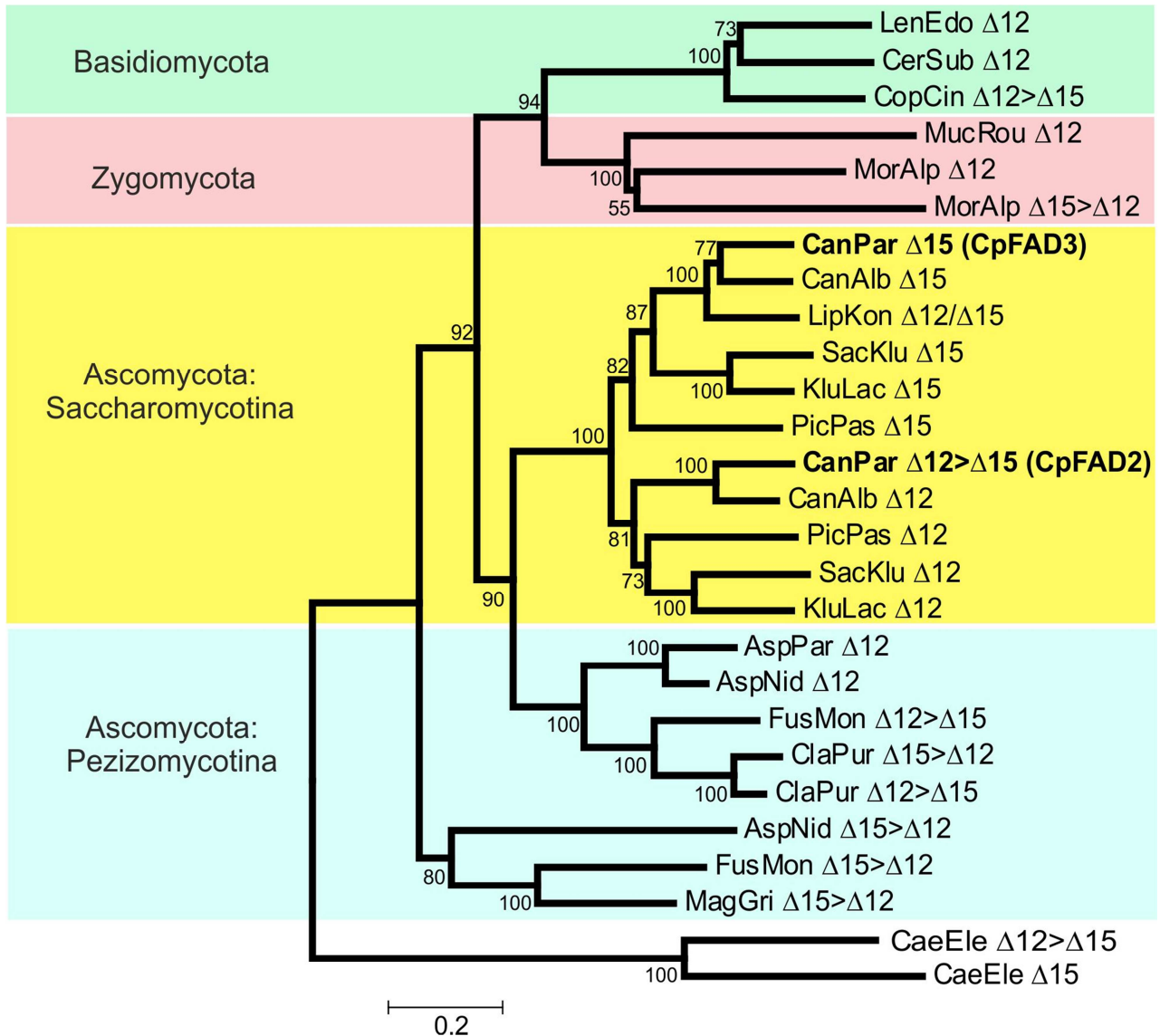
Shrnutí výsledků

Pro detailní popis regioselektivit desaturas kvasinek jsme u oportunisticky patogenní kvasinky *Candida parapsilosis* identifikovali a izolovali desaturasové geny homologní s houbovými desaturasami produkujícími VNMK. Expresí izolovaných desaturasových genů CpFAD2 a CpFAD3 z *C. parapsilosis* v *Saccharomyces cerevisiae* expresním systému a detailní analýza desaturasových produktů pomocí GC/MS spojená s řadou předkolonových derivatizačních technik nám umožnily identifikovat VNMK a hydroxylované produkty, které nebyly popsány u ortologních desaturas z blízkce příbuzného druhu patogenní kvasinky *Candida albicans*¹⁹.

Expresí CpFad3 v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* v kultivačním médiu doplněném kyselinou hexadekadienovou (Z9,Z12-16:2) a linolovou (Z9,Z12-18:2) vedla k akumulaci VNMK s dvojnou vazbou v pozici $\Delta 15$ - kyseliny hexadekatrienové s terminálně umístěnou $\Delta 15$ dvojnou vazbou (Z9,Z12,Z15-16:3) a kyseliny α -linolenové (Z9,Z12,Z15-18:3). Přítomnost těchto VNMK ukazuje, že CpFad3 vykazuje $\Delta 15$ -regioselektivitu se substrátovými VNMK obsahujícími $\Delta 12$ dvojnou vazbu a že CpFad3 dokáže zavádět terminální dvojnou vazbu.

S. cerevisiae kmen exprimující CpFad2 akumuloval jako majoritní VNMK předpokládané $\Delta 12$ nenasycené VNMK, jako je kyselina hexadekadienová ($\Delta 9,\Delta 12$ -16:2) a linolová. Detekovali jsme však také doprovodné $\Delta 15$ -VNMK: kyselinu hexadekatrienovou (Z9,Z12,Z15-16:3), α -linolenovou a dále jsme identifikovali kyselinu ricinolejovou (kyselinu 12-hydroxy-9-oktadecenová) jako produkt CpFad2. Na základě identifikovaných VNMK tedy vyplývá, že

primární typ regioselektivity pro CpFad2 je v+3 a sekundární typ $\Delta 12$, tedy že existující dvojná vazba slouží jako referenční bod pro určení polohy druhé dvojné vazby a $\Delta 12$ je preferovaná poloha zaváděné dvojné vazby.



Obrázek 3: Genový strom znázorňující sekvenční příbuznost houbových $\Delta 12$ and $\Delta 15$ desaturas. CpFAD2 a CpFAD3 desaturasy identifikované v této práci jsou zvýrazněny tučně. Rodové a druhové jméno zdrojového organismu je zkráceno a je následováno experimentálně určenou desaturasovou regioselektivitou. U multifunkčních desaturas je preferovaná specifita znázorněna prostřednictvím „>“ pokud jsou tyto údaje v literatuře dostupné (například $\Delta 12 > \Delta 15$ ukazuje preferovanou $\Delta 12$ desaturasovou regioselektivitu). $\Delta 12$ a $\Delta 15$ desaturasy z hlístice *Caenorhabditis elegans* (CaeEle) byly přidány jako vnější skupina. Čísla podél větví udávají procentuální podporu dané topologie při použití 1000 bootstrap replikátů. Měřítko udává počet aminokyselinových substitucí na jednu aminokyselinovou pozici. Obrázek byl přejat z³⁸.

Tyto výsledky dále ukazují, že CpFad2 i CpFad3 dokáží produkovat spektrum VNMK a hydroxylovaných MK, které nebyly dříve identifikovány u předpokládaných orthologů z jiných pravých (pučících) kvasinek (Ascomycota: Saccharomycotina) (Obr. 3). Tato práce tak naznačuje, že detailní analýza minoritních produktů desaturas dokáže odhalit řadu nepopsaných desaturasových selektivit u desaturas, které jsou obecně označovány jako $\Delta 12$ a $\Delta 15$ desaturasy.

Můj příspěvek k práci

Izoloval jsem kódující úseky CpFAD2 a CpFAD3, klonoval je do kvasinkového expresního vektoru a expresní vektory transformoval do kvasinkových buněk; kultivoval jsem kvasinkové kmeny heterologně exprimující CpFAD2 a CpFAD3; izoloval jsem celkové buněčné lipidy a analyzoval obsah mastných kyselin v podobě odpovídajících methylesterů, 4,4-dimethyloxazolinových a trimethylsilylových derivátů prostřednictvím GC/MS; analyzoval jsem GC/MS data; napsal jsem pracovní verzi manuskriptu.

3 Literatura

1. El-Sayed. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com>. (2014).
2. Matoušková, P., Pichová, I. & Svatoš, A. Functional characterization of a desaturase from the tobacco hornworm moth (*Manduca sexta*) with bifunctional Z11- and 10,12-desaturase activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**, 601–610 (2007).
3. Fang, N., Teal, P. E. A., Doolittle, R. E. & Tumlinson, J. H. Biosynthesis of conjugated olefinic systems in the sex pheromone gland of female tobacco hornworm moths, *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 39–48 (1995).
4. Wang, H. *et al.* Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 581–585 (2015).
5. Bai, Y. *et al.* X-ray structure of a mammalian stearyl-CoA desaturase. *Nature* **524**, 252–256 (2015).
6. Buček, A. *et al.* Evolution of moth sex pheromone composition by a single amino acid substitution in a fatty acid desaturase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 12586–12591 (2015).
7. Ayasse, M. & Jarau, S. Chemical ecology of bumble bees. *Annu. Rev. Entomol.* **59**, 299–319 (2014).
8. Bergman, P. & Bergström, G. Scent marking, scent origin, and species specificity in male pre-mating behavior of two Scandinavian bumblebees. *J. Chem. Ecol.* **23**, 1235–1251 (1997).
9. Kullenberg, B., Bergström, G., Bringer, B., Carlberg, B. & Cederberg, B. Observations on scent marking by *Bombus* Latr. and *Psithyrus* Lep. males (Hym. Apidae) and localization of site of production of the secretion. *Zoon* **1**, 23–30 (1973).
10. Albert, T., Spaethe, J., Grubel, K. & Rossler, W. Royal jelly-like protein localization reveals differences in hypopharyngeal glands buildup and conserved expression pattern in brains of bumblebees and honeybees. *Biol. Open* **3**, 281–288 (2014).
11. Poiani, S. B. & Da Cruz-Landim, C. Morphological changes in the cephalic salivary glands of females and males of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae). *J. Biosci.* **35**, 249–255 (2010).
12. Lanne, B. S., Bergström, G., Wassgren, A.-B. & Törnback, B. Biogenetic pattern of straight chain marking compounds in male bumble bees. *Comp. Biochem. Physiol.* **88**, 631–636 (1987).
13. Matoušková, P. *et al.* A delta9 desaturase from *Bombus lucorum* males: investigation of the biosynthetic pathway of marking pheromones. *Chembiochem* **9**, 2534–41 (2008).
14. Buček, A. *et al.* The role of desaturases in the biosynthesis of marking pheromones in bumblebee males. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **43**, 724–31 (2013).
15. Uemura, H. Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 1–12 (2012).
16. Certik, M. & Shimizu, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 1–14 (1999).
17. Krishnamurthy, S. *et al.* Dosage-dependent functions of fatty acid desaturase Ole1p in growth and morphogenesis of *Candida albicans*. *Microbiology* **150**, 1991–2003 (2004).
18. Nguyen, L. N., Gacser, A. & Nosanchuk, J. D. The stearyl-coenzyme A desaturase 1 is essential for virulence and membrane stress in *Candida parapsilosis* through unsaturated fatty acid production. *Infect. Immun.* **79**, 136–45 (2011).
19. Murayama, S. Y. *et al.* Construction and functional analysis of fatty acid desaturase gene disruptants in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**, 1551–8 (2006).
20. Wilson, R. a, Calvo, A. M., Chang, P.-K. & Keller, N. P. Characterization of the *Aspergillus parasiticus* delta12-desaturase gene: a role for lipid metabolism in the *Aspergillus*-seed interaction. *Microbiology* **150**, 2881–8 (2004).
21. Calvo, A. M., Gardner, H. W. & Keller, N. P. Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **276**, 25766–25774 (2001).
22. Meesapyodsuk, D., Reed, D. W., Covello, P. S. & Qiu, X. Primary structure, regioselectivity, and evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases of *Claviceps purpurea*. *J. Biol. Chem.* **282**, 20191–9 (2007).
23. Hoffmann, M. *et al.* A small membrane-peripheral region close to the active center determines regioselectivity

- of membrane-bound fatty acid desaturases from *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **282**, 26666–74 (2007).
24. Sakuradani, E., Kobayashi, M., Ashikari, T. & Shimizu, S. Identification of Delta12-fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* **261**, 812–20 (1999).
 25. Huang, Y. S. *et al.* Cloning of delta12- and delta6-desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of gamma-linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* **34**, 649–59 (1999).
 26. Sakuradani, E., Abe, T., Iguchi, K. & Shimizu, S. A novel fungal omega3-desaturase with wide substrate specificity from arachidonic acid-producing *Mortierella alpina* 1S-4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 648–54 (2005).
 27. Damude, H. G. *et al.* Identification of bifunctional delta12/omega3 fatty acid desaturases for improving the ratio of omega3 to omega6 fatty acids in microbes and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9446–9451 (2006).
 28. Wei, D. S., Li, M. C., Zhang, X. X., Zhou, H. & Xing, L. J. A novel Delta12-fatty acid desaturase gene from methylotrophic yeast *Pichia pastoris* GS115. *Acta Biochim. Pol.* **53**, 753–9 (2006).
 29. Zhang, X., Li, M., Wei, D. & Xing, L. Identification and characterization of a novel yeast omega3-fatty acid desaturase acting on long-chain n-6 fatty acid substrates from *Pichia pastoris*. *Yeast* **25**, 21–7 (2008).
 30. Kainou, K., Kamisaka, Y., Kimura, K. & Uemura, H. Isolation of Delta12 and omega3-fatty acid desaturase genes from the yeast *Kluyveromyces lactis* and their heterologous expression to produce linoleic and alpha-linolenic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 605–12 (2006).
 31. Oura, T. & Kajiwara, S. *Saccharomyces kluyveri* FAD3 encodes an omega3 fatty acid desaturase. *Microbiology* **150**, 1983–90 (2004).
 32. Watanabe, K., Oura, T., Sakai, H. & Kajiwara, S. Yeast Delta 12 fatty acid desaturase: gene cloning, expression, and function. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 721–7 (2004).
 33. Yan, Z. *et al.* Clone and identification of bifunctional Δ 12/ Δ 15 fatty acid desaturase LKFAD15 from *Lipomyces kononenkoae*. *Food Sci. Biotechnol.* **22**, 573–576 (2013).
 34. Shanklin, J. & Cahoon, E. B. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 611–641 (1998).
 35. Peyou-Ndi, M. M., Watts, J. L. & Browse, J. Identification and characterization of an animal delta(12) fatty acid desaturase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 399–408 (2000).
 36. Zhou, X.-R., Green, A. G. & Singh, S. P. *Caenorhabditis elegans* Delta12-desaturase FAT-2 is a bifunctional desaturase able to desaturate a diverse range of fatty acid substrates at the Delta12 and Delta15 positions. *J. Biol. Chem.* **286**, 43644–50 (2011).
 37. Kikukawa, H. *et al.* Characterization of a trifunctional fatty acid desaturase from oleaginous filamentous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 using a yeast expression system. *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 672–6 (2013).
 38. Buček, A., Matoušková, P., Sychrová, H., Pichová, I. & Hrušková-Heidingsfeldová, O. Δ 12-Fatty acid desaturase from *Candida parapsilosis* is a multifunctional desaturase producing a range of polyunsaturated and hydroxylated fatty acids. *PLoS One* **9**, e93322 (2014).

4 Curriculum Vitae

Mgr. Aleš Buček

Narozen 13. června 1985 v Ostravě, Česká republika

Vzdělání

- 2009 – nyní Doktorský studijní program Biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Disertační práce “Evoluce desaturas mastných kyselin zapojených do biosyntézy hmyzích feromonů” pod vedením Ing. Ivy Pichové, CSc. (ÚOCHB AV ČR).
- 2007 – 2009 Magisterský studijní program Biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Diplomová práce “*Identifikace a charakterizace desaturas kvasinky Candida parapsilosis*” pod vedením Ing. Ivy Pichové, CSc. (ÚOCHB AV ČR).
- 2004 – 2007 Bakalářský studijní program Biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Bakalářská práce “*Desaturasy patogenních kvasinek*” pod vedením RNDr. Olgy Hruškové – Heidingsfeldové, CSc. (ÚOCHB AV ČR).

Publikace

První autor či spoluautor 6 publikací v mezinárodních recenzovaných vědeckých časopisech.

Ústní (UP) a plakátové (PP) prezentace na konferencích

- Annual meeting of international society of chemical ecology (Brazílie, 2016, UP)
- 43rd Annual meeting on yeast (Slovensko, 2016, UP)
- Biology and genomics of social insects (New York, 2015, UP + PP)
- 9th Workshop on the molecular biology and genetics of Lepidoptera (Řecko, 2014, UP)
- Seventh international symposium on molecular insect science (Nizozemí, 2014, PP)
- 4. Česká lipidomická konference (Česká republika, 2014, UP)
- XV Setkání mladých biologů, chemiků a biochemiků (Česká republika, 2014, UP)
- 30th International specialized symposium on yeast (Slovensko, 2013, UP)
- XIV Setkání mladých biologů, chemiků a biochemiků (Česká republika, 2013; UP)
- International society of chemical ecology 28th annual meeting (Litva, 2012, PP)
- Sixth international symposium on molecular insect science (Nizozemí, 2011, PP)
- *The 38th annual conference on yeasts* (Slovensko, 2010, UP + PP)

Odborné stáže

- Dvuměsíční stáž na Institutu Maxe Plancka pro Chemickou ekologii (Jena, Německo) pod vedením Dr. Aleše Svatoše. Studium desaturas lišaje *Manduca sexta* pomocí RNAi a GC/MS analýz desaturasových produktů (2013).
- Jednoměsíční terénní pobyt ve Francouzské Guyaně. Sběr a příprava hmyzích vzorků pro GC/MS a transkriptomické analýzy pod vedením Mgr. Jana Šobotníka, Ph.D. (2013)

Certifikáty

Certificate in Advanced English (CAE, 2011)

The summary of
DISSERTATION THESIS

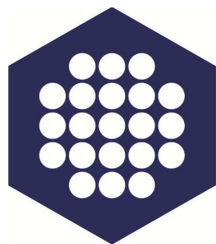
Study of evolution of insect pheromone biosynthetic fatty acyl desaturases

Aleš Buček, MSc

SCIENTIFIC SUPERVISOR: Iva Pichová, PhD



Department of Biochemistry
Faculty of Sciences
Charles University in Prague



Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
of the Czech Academy of Sciences

Prague 2016

Abstract

Insects account for more than one million of described species with an ecological and economic impact disproportional to their minute body size. Among the factors which have contributed to their evolutionary success, insect secondary metabolites such as defensive compounds and chemical signals are regarded to play a major role. This thesis aims at uncovering the molecular mechanisms underlying evolution of ubiquitous insect secondary metabolites – sex pheromones (SPs), i.e. chemical signals mediating mate finding and mating between individuals of the same species. The thesis focuses on a class of oxidoreductase enzymes, membrane fatty acid desaturases (mFADs), which introduce double bonds into hydrocarbon chains of fatty acyls and thus produce precursors of unsaturated fatty acid-derived SPs. mFADs are involved in SP biosynthesis in e.g. moths (Lepidoptera), flies (Diptera), cockroaches and termites (Blattodea), wasps and bees (Hymenoptera) - some of the most species-rich insect orders. Since SPs are principal to species reproductive isolation, uncovering the molecular basis of insect SP biosynthesis holds promises to contribute to answering fundamental questions concerning the insect ecology and evolution. The insect mFADs with diverse enzymatic specificities also represent a naturally available resource for study of enzyme function evolution.

This thesis explores mFADs in Hymenoptera (bumblebees - *Bombus*) and Lepidoptera (tobacco hornworm moth - *Manduca sexta*) as well as in non-insect organism (yeast – *Candida parapsilosis*). We demonstrate that the ability to produce a wide range of unsaturated fatty acids is inherent to mFADs across kingdoms (Publications I and III). We show that pheromone-biosynthetic mFADs can synthesize novel unsaturated SP precursors as a result of a single amino acid substitution, a mechanism which might have a high potential in generating novel SP components in moths and represents thus a possible molecular mechanism of SP evolution (Publication I). Our finding that the amino acid residue which controls *M. sexta* mFAD specificities resides in the kink of the mFAD substrate binding channel provides novel insights into mechanism of mFAD substrate specificity determination (Publication I). By study of mFADs from three bumblebee species we show that post-transcriptional regulation of mFAD activity represents an alternative possible regulatory mechanism of pheromone composition in hymenopterans (Publication II). Together, these findings expand our knowledge on determinants of mFADs enzymatic specificities and contribute to our understanding of the role which mFADs play in SP biosynthesis and evolution of SP communication in moths and bees.

Table of contents

1	RESEARCH AIMS	4
2	PUBLICATIONS	5
2.1	<i>PUBLICATION I</i> : EVOLUTION OF MOTH SEX PHEROMONE COMPOSITION BY A SINGLE AMINO ACID SUBSTITUTION IN A FATTY ACID DESATURASE	6
2.2	<i>PUBLICATION II</i> : THE ROLE OF DESATURASES IN THE BIOSYNTHESIS OF MARKING PHEROMONES IN BUMBLEBEE MALES	9
2.3	<i>PUBLICATION III</i> : Δ 12-FATTY ACID DESATURASE FROM <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> IS A MULTIFUNCTIONAL DESATURASE PRODUCING A RANGE OF POLYUNSATURATED AND HYDROXYLATED FATTY ACIDS	11
3	REFERENCES	15
4	CURRICULUM VITAE	17

1 Research aims

- To explore the molecular basis of the moth sex pheromone evolution *via* identification and characterization of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) fatty acid desaturases involved in biosynthesis of unusual triunsaturated sex pheromone components (Publication I).
- To elucidate the contribution of differential enzymatic selectivities and expression patterns of fatty acid desaturases to the species-specific composition of FA-derived male marking pheromones in three European bumblebee species (*Bombus terrestris*, *B. lucorum*, and *B. lapidarius*) (Publication II).
- To identify fatty acid desaturases involved in biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the opportunistic pathogenic yeast *Candida parapsilosis* and based on a comprehensive analysis of the fatty acid desaturase products revise the current classification of yeast desaturases (Publication III).

2 Publications

Publications included in the dissertation thesis

- I. Buček A, Matoušková P, Vogel H, Šebesta P, Jahn U, Weißflog J, Svatoš A, Pichová I (2015) *Evolution of moth sex pheromone composition by a single amino acid substitution in a fatty acid desaturase*. Proc Natl Acad Sci **112**(41): 12586–12591.
- II. Buček A, Vogel H, Matoušková P, Prchalová D, Záček P, Vrkoslav V, Šebesta P, Svatoš A, Jahn U, Valterová I, Pichová I (2013) *The role of desaturases in the biosynthesis of marking pheromones in bumblebee males*. Insect Biochem Mol Biol **43**(8): 724–31.
- III. Buček A, Matoušková P, Sychrová H, Pichová I, Hrušková-Heidingsfeldová O (2014) *$\Delta 12$ -fatty acid desaturase from *Candida parapsilosis* is a multifunctional desaturase producing a range of polyunsaturated and hydroxylated fatty acids*. PLoS One **9**(3):e93322.

Publications not included in the dissertation thesis

- I. Prchalová D, Buček A, Brabcová J, Záček P, Kindl J, Valterová I, Pichová I (2016) *Regulation of isoprenoid pheromone biosynthesis in bumblebee males*. ChemBioChem **17**(3), 260–267.
- II. Bourguignon T, Šobotník J, Brabcová J, Sillam-Dussès D, Buček A, Krasulová J, Vytisková B, Demianová Z, Mareš M, Roisin Y, Vogel H (2016) *Molecular mechanism of the two-component suicidal weapon of *Neocapritermes taracua* old workers*. Mol Biol Evol **33**(3), 809–819
- III. Buček A, Brabcová J, Vogel H, Prchalová D, Kindl J, Valterová I, Pichová I (2016) *Exploring complex pheromone biosynthetic processes in the bumblebee male labial gland by RNA sequencing*. Insect Mol Biol. **25**(3), 295-314

2.1 *Publication I: Evolution of moth sex pheromone composition by a single amino acid substitution in a fatty acid desaturase*

Background

Tobacco hornworm moth (*Manduca sexta*) females attract males by releasing a sex pheromone (SP) containing in addition to mono- and diunsaturated aldehydes, which are typical structural themes in SPs of Bombycoidea moths¹, also uncommon conjugated triunsaturated aldehydes. The production of triunsaturated SP components represents an easily traceable rare phenotype, thus making *M. sexta* a convenient yet unexploited model organism for unraveling the mechanisms of chemical communication evolution via novel SP component recruitment. In our previous attempts to decipher the desaturation pathway leading to triunsaturated SP precursors E10,E12,E14-16:3 and E10,E12,Z14-16:3 (3UFAs), we identified the *MsexD2* desaturase, which exhibits Z/E11-desaturase and conjugase (1,4-dehydrogenase) activity and participates in stepwise production of monounsaturated SP precursors Z11-16:1 and E11-16:1 (1UFAs) and diunsaturated SP precursors E10,E12-16:2 and E10,Z12-16:2 (2UFA)². The terminal desaturation step resulting in the third conjugated double bond and the respective enzyme remained, however, elusive^{2,3}.

Summary

In the search for FAD genes involved in pheromone biosynthesis, we performed RNA sequencing of *M. sexta* female PGs, the site of pheromone biosynthesis³, as well as nonpheromone-producing tissues (female fat body, female labial palps, and larval midgut). We identified 14 desaturase transcripts, of which 4 were abundant and enriched in the PG: *MsexD2*, a previously characterized Z11-desaturase/conjugase involved in sequential biosynthesis of 1UFA and 2UFA pheromone precursors², and three FAD gene products, *MsexD3*, *MsexD5* and *MsexD6*. We expressed the candidate pheromone-biosynthetic FADs in *Saccharomyces cerevisiae* and using GC/MS analysis of transesterified lipidic yeast extracts we determined the content of novel UFAs produced by the heterologously expressed FADs. *MsexD3* and *MsexD5* biosynthesized 3UFAs via E/Z14 desaturation from diunsaturated fatty acids (along with additional minor FA products) whereas *MsexD6* produced Z11-18:1, a tentative precursor of minor *M. sexta* SP component. The substrates and products of *M. sexta* SP-biosynthetic FADs determined in yeast expression system were confirmed *in vivo* by application of metabolic probes in the form of FAs and FAMES to female *M. sexta* PGs, particularly demonstrating the biosynthesis of 3UFAs from E10,E12-16:2 *in vivo*. Sequentially highly similar yet functionally diverse *MsexD3* and *MsexD2* were used in site-directed mutagenesis experiments to uncover their specificity determinants. Initial set of mutagenesis

experiments highlighted the predicted fourth transmembrane helix as critical for desaturase specificity and subsequent mutagenesis of nonconserved aa residues in the transmembrane helix demonstrated that swapping of a single amino acid residue Ala224/Ile224 introduced E/Z14-desaturase specificity to mutated MsexD2 (and reciprocally, abolished E/Z14-desaturase specificity in mutated MsexD3). In protein structure models of MsexD2 and MsexD3, which we generated employing recently available structures of mammalian Z9-FADs^{4,5} as a template in homology structure modeling, we showed that the residue Ala224/Ile224 contributes to formation of a kink in the substrate binding channel, which was hypothesized to be involved in the positioning of the fatty acyl substrate with respect to the di-iron active center⁵. These results demonstrated that a change as small as a single amino acid substitution in a pheromone-biosynthetic FAD might result in the acquisition of novel desaturase specificity potentially leading to recruitment of novel SP components (Fig. 1). Reconstruction of FAD gene phylogeny indicated that MsexD3 was recruited for biosynthesis of 3UFA SP components in *M. sexta* lineage via gene duplication and neofunctionalization, whereas MsexD5 representing an alternative 3UFA-producing FAD has been acquired via activation of a presumably inactive ancestral MsexD5.

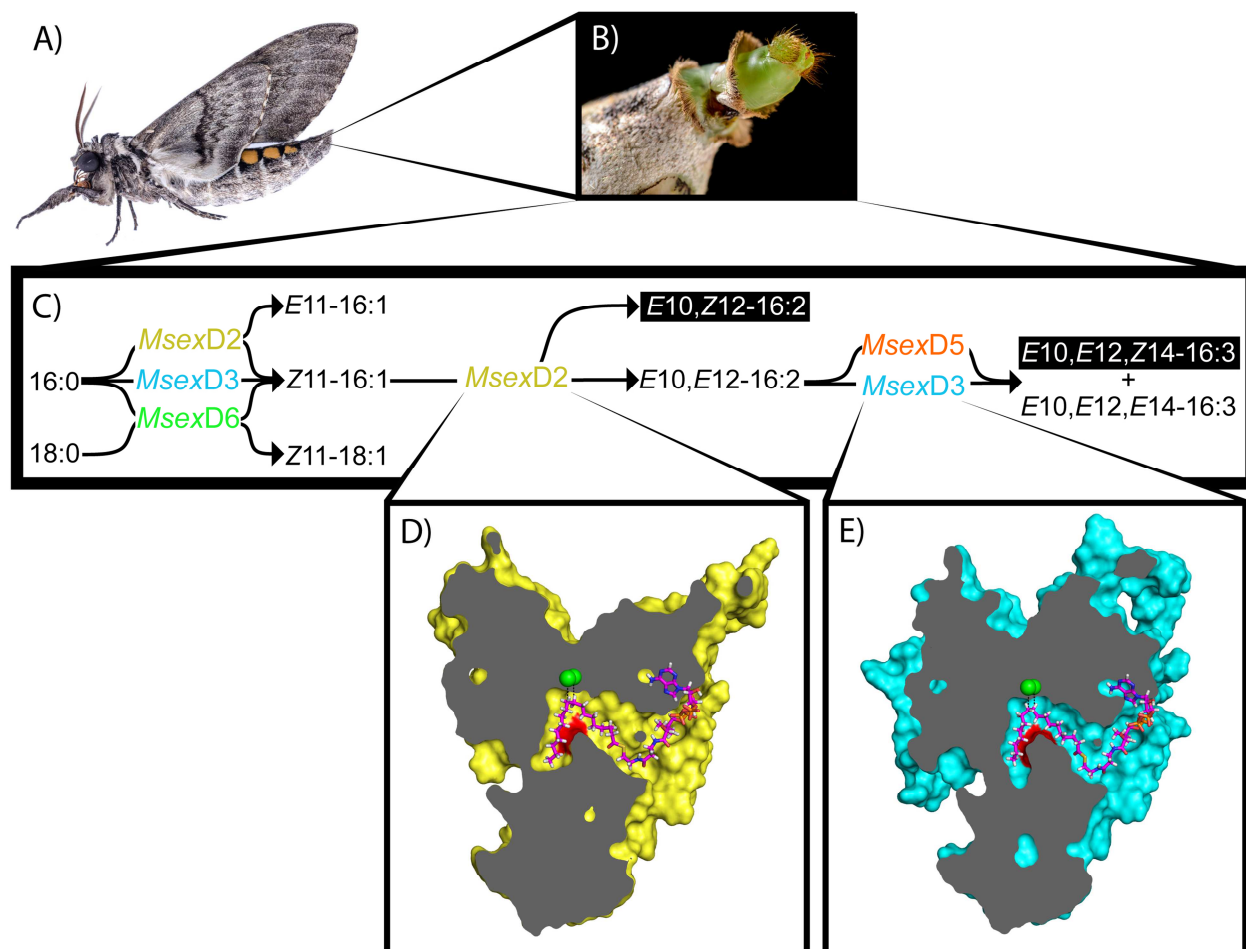


Figure 1: Reconstructed biosynthetic pathway of *Manduca sexta* UFA precursors of SP. *M. sexta* females (A) biosynthesize sex pheromones in the pheromone gland localized in the evertible abdominal tip (B). We have identified pheromone-biosynthetic FADs and reconstructed the complete desaturation pathway leading to unsaturated FAs which serve as precursors of minor and major pheromone components including E10,Z12-16:2 and E10,E12,Z14-16:3 which are essential for attracting *M. sexta* males (C). By site-directed mutagenesis of MsexD2 and MsexD3 we have identified a single amino acid residue Ala224 and Ile224, respectively, localized to the predicted fourth transmembrane helix of the FADs, which determines whether the desaturation outcome will be E10,Z12-16:2 or E10,E12,Z14-16:3. In the cut-through model of MsexD2 (D) and MsexD3 (E) generated by homology modeling using human Z9-FAD structure as a template, Ala224 and Ile224, respectively, is localized to the kink of the substrate binding channel and its surface exposed to the binding channel interior is highlighted in red. The channel is occupied by a hydrocarbon chain of fatty acyl substrate derived from the FAD structure used as a template for structure homology modeling. Adapted from⁶.

My contribution

I have analyzed the RNA-seq data and identified the desaturase transcripts; isolated the coding regions of MsexD6 and five variants of MsexD5 and cloned them into yeast expression vectors; prepared part of the MsexD2 and MsexD3 mutants by site-directed mutagenesis and transformed them along with MsexD5s and MsexD6 into yeast strains; cultivated the yeast strains expressing all

FADs and their mutants; isolated and analyzed FAME products by GC/MS; applied the isotopically labeled metabolic probes to *M. sexta* PG and analyzed the resulting isotopically labeled FAs and naturally occurring FAs in *M. sexta* PG by GC/MS; performed the phylogenetic analysis of moth FADs; wrote the draft of the manuscript.

2.2 **Publication II: The role of desaturases in the biosynthesis of marking pheromones in bumblebee males**

Background

In the majority of bumblebee species (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*), the mate-finding and mating is mediated by so-called marking pheromones (MPs) which are deposited by males on prominent objects to attract conspecific females⁷. MPs are produced by the cephalic part of the male labial gland (LG) which fills large part of the male's head^{8,9} and contrasts thus with female bumblebee LGs¹⁰ or male honey bee (*Apis mellifera*) LGs which do not accumulate cephalic LG secretion¹¹. MPs generally consist of terpenoids and fatty-acid-derived aliphatic compounds. The presence of unsaturated fatty-acid-derived MP components of various fatty acyl chain lengths which differ among bumblebee species led to hypothesis that these are in bumblebees produced via pheromone-biosynthetic FADs that exhibit species-specific substrate preferences, i.e. a pheromone biosynthetic route analogous to that in moths¹². Our laboratory initiated efforts to establish male bumblebees as new model organisms for study of molecular basis of pheromone biosynthesis by a search for MP-biosynthetic FADs expressed in LG of three common European bumblebee species which differ substantially in their MP composition. That is, *i*) *Bombus terrestris*, an established greenhouse pollinator, which uses MP composed mainly of terpenoid compounds, *ii*) its sister species, *B. lucorum* (both *Bombus s.s.*), which uses Z9-14:1-derived ethyl esters (ethyl tetradec-9-enoate), and *iii*) *B. lapidarius*, representative of further related subgenus *Melanobombus*, which uses predominantly Z9-16:1 and 16:0-derived alcohols (hexadecanol and hexadec-9-enol). A single putative FAD coding region termed BlucNPVE was identified and cloned from *B. lucorum* LG cDNA. The functional characterization of BlucNPVE in yeast expression system demonstrated, that it codes for Z9-FAD which produces preferentially palmitic (Z9-16:1) and oleic acid (Z9-18:1) in the yeast expression system along with trace amounts of Z9-14:1. Production of only trace amount of Z9-14:1 in yeast expression system suggested that BlucNPVE is presumably not responsible for accumulation of Z9-14:1 which serves as a precursor of Z9-14:1-ethylester, the major *B. lucorum* MP component. Instead, it was proposed to be involved in primary metabolism¹³. The pheromone-

biosynthetic FADs and the contribution of their distinct specificities to the species-specific MP composition remained elusive.

Summary

By employing RNA sequencing of *B. lucorum* and *B. terrestris* male labial glands and fat bodies (selected as a reference tissue), we identified five paralogous FAD-like genes. Two FAD paralogs were substantially more expressed in LGs than FBs of both species according to the RNA-seq data - BlucNPVE (identical to the FAD previously identified by Matoušková et al.¹³) and BlucSPVE in *B. lucorum*, and BterNPVE and BterSPVE in *B. terrestris*. The differentially high abundance in LGs was confirmed by qRT-PCR analysis. BlapNPVE and BlapSPVE coding regions were isolated from *B. lapidarius* LG cDNA by PCR using combination of degenerated and specific primers designed against conserved FAD regions. FADs from all three investigated species belonging to the NPVE and SPVE groups (named according to the presence of four-amino-acid signature motif) shared over 97% protein sequence identity within the groups and approximately 60% identity between the groups. Functional characterization of FADs in yeast demonstrated that NPVE FADs from the three species were almost identical, all exhibiting Z9-desaturase regioselectivity and highest conversion rate (calculated as ratio of relative abundance of unsaturated FAs to the total relative amount of saturated and unsaturated FAs) with 18:0 (98%), followed by 16:0 (85% - 88%) and 14:0 (62% - 63% in BterNPVE and BlucNPVE, respectively; 47% in BlapNPVE). SPVE FADs produced traces of Z4-14:1 and E4-14:1 as sole products, naturally not present in the LG of the studied bumblebee species and previously not detected in any other insect species. These data indicate that although the desaturase substrate specificities of NPVE FADs does not match the composition of FA-derived MPs, these FADs are the most probable candidate enzymes involved in biosynthesis of Z9-MPs since they are highly abundantly and specifically expressed in LGs. Notably, BterNPVE was one of the most abundant transcripts in *B. terrestris* LG which contrasts with the low abundance of Z9-MP components in *B. terrestris* LG, indicating that the activity of BterNPVE is posttranscriptionally regulated. Together, the experiments indicate that FAD's enzymatic specificities in the studied species did not diverge in the course of evolution and that the species-specific MP composition is not underlined by distinct FAD substrate specificities (Fig. 2), i.e. a mechanism of pheromone composition determination common to many moth species does not apply to bumblebees. Rather MP composition is controlled in a species-specific manner by *i*) posttranscriptional regulation of FADs and *ii*) amount and availability of FAs of particular chain lengths which serve as FAD substrates, or *iii*) substrate specificity of downstream MP-biosynthetic enzymes such as fatty acyl

reductases or fatty acyl ethyl ester biosynthetic enzymes which can transform UFAs to final MP components.

In ongoing experiments we aim at isolating and characterizing substrate specificities of bumblebee fatty acyl reductases and at comprehensive analysis of fatty acid content in the bumblebee LGs.

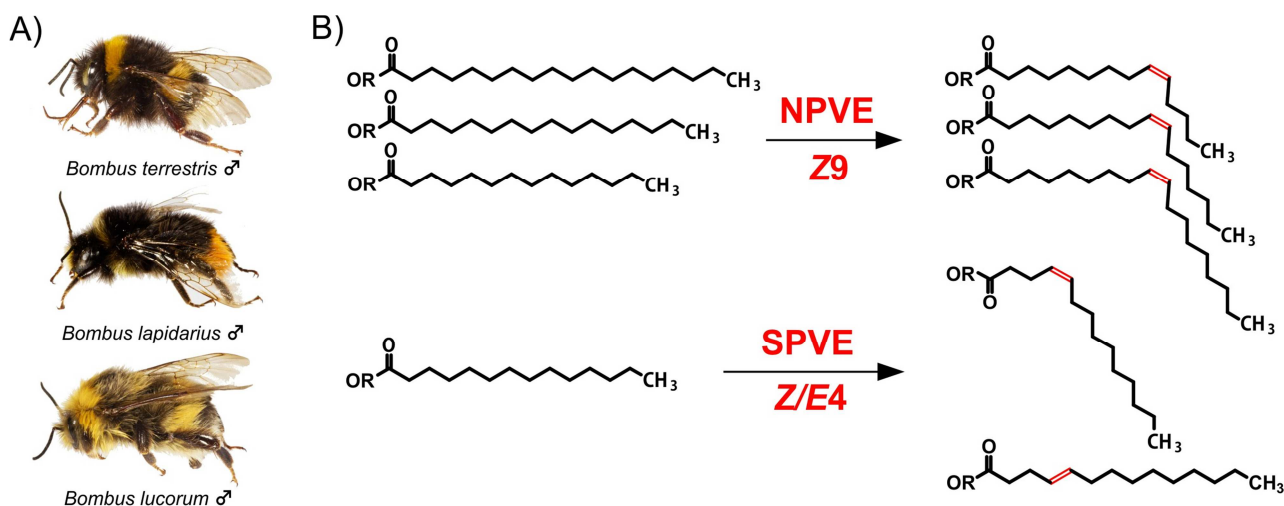


Figure 2: Specificities of mFADs abundantly expressed in labial glands of *Bombus terrestris*, *B. lucorum* and *B. lapidarius*. (A) In the investigated species, (B) two mFAD orthologs, NPVE and SPVE, exhibiting Z9 and Z/E4 desaturase specificity and substrate preference for 14:0-18:0 and 14:0, respectively, are abundantly expressed. Adapted from¹⁴.

My contribution

I have analyzed the RNA-seq data and identified there mFAD coding regions; validated LG-specific expression of BlucNPVE and BlucSPVE by qRT-PCR; cloned all FAD coding regions into yeast expression vectors and transformed them into yeast cells, performed all the yeast cultivation experiments, lipid isolations and FA analyses; wrote the draft of the manuscript.

2.3 Publication III: $\Delta 12$ -fatty acid desaturase from *Candida parapsilosis* is a multifunctional desaturase producing a range of polyunsaturated and hydroxylated fatty acids

Background

Fungal FAD research is largely motivated by the search for novel FADs that could be used in metabolic engineering of microorganisms to produce polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and other valuable unsaturated fatty acids on an industrial scale^{15,16}. Additionally, desaturation, as a part of

fungal fatty acid metabolism, has been shown to play a crucial role in the growth and morphogenesis of pathogenic yeast species in plants and humans. Therefore, FADs have been suggested as potential targets for antifungal drugs¹⁷⁻²¹. Numerous fungal $\Delta 12$ -, $\Delta 15$ - and multifunctional membrane fatty acid desaturase genes (FADs) involved in biosynthesis of PUFAs have been already isolated and functionally characterized employing yeast expression system²²⁻³³. A range of desaturase regioselectivities dependent on the reference point used by FADs to position the introduced double bond has been described. The main regioselective modes are: (1) the double bond is introduced between specific carbon atoms counted from the carboxy terminus (ΔX) or (2) methyl terminus (ωX) of the fatty acyl substrate, and (3) a subsequent double bond is introduced a specific number of carbon atoms (usually three) counted from the pre-existing double bond ($v+3$)³⁴. These FAD regioselectivities are not mutually exclusive, and Meesapyodsuk et al. suggested assigning FADs with primary and secondary modes to more precisely describe their regioselectivity²². Detailed information on both major and minor FAD diagnostic substrates and products is principal for comprehensive description and classification of these FADs. However, only major PUFA products were analyzed for many of the fungal FADs and studies which re-examined PUFA-producing FADs^{26,35} indicates that minor products can be easily neglected^{36,37}.

Summary

To comprehensively describe enzymatic specificities of PUFA producing FADs, we identified and isolated gene homologs of fungal FADs from opportunistic pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. Expression of the *C. parapsilosis* FADs termed CpFAD2 and CpFAD3 in a *Saccharomyces cerevisiae* expression system and detailed analysis of novel minor and major FA products via GC/MS coupled with a range of FA-derivatization techniques enabled us to identify polyunsaturated and hydroxylated products which were previously not described for *Candida albicans* homologs of CpFAD2 and CpFAD3¹⁹.

Overexpression of CpFad3 in *Saccharomyces cerevisiae* strains supplemented with linoleic acid ($\Delta 9$, $\Delta 12$ -18:2) and hexadecadienoic acid ($\Delta 9$, $\Delta 12$ -16:2) led to accumulation of $\Delta 15$ -PUFAs, i.e., α -linolenic acid ($\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 15$ -18:3) and hexadecatrienoic acid with terminal double bond ($\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 15$ -16:3), respectively, which jointly indicate that CpFad3 exhibits $\Delta 15$ -regioselectivity requiring a preexisting $\Delta 12$ -double bond and is capable of introducing a terminal double bond.

CpFad2-expressing yeast strains accumulated expected $\Delta 12$ -PUFAs, i.e. linoleic and hexadecadienoic acid ($\Delta 9$, $\Delta 12$ -16:2), as the expected major PUFAs. However, accompanying $\Delta 15$ -PUFAs were also detected, namely α -linolenic acid and hexadecatrienoic acid ($\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 15$ -16:3) and we identified ricinoleic acid (12-hydroxy-9-octadecenoic acid) as an additional product of

CpFad2. Based on the PUFA products detected we proposed that the primary regioselective mode of CpFad2 is $v+3$ and the secondary mode is $\Delta 12$, in accordance with the FAD regioselectivity classification proposed by Meesapyodsuk et al.²², i.e. that the preexisting double bond serves as a reference point for positioning of the newly introduced double bond and that the $\Delta 12$ -position is the preferred position of the double bond introduction.

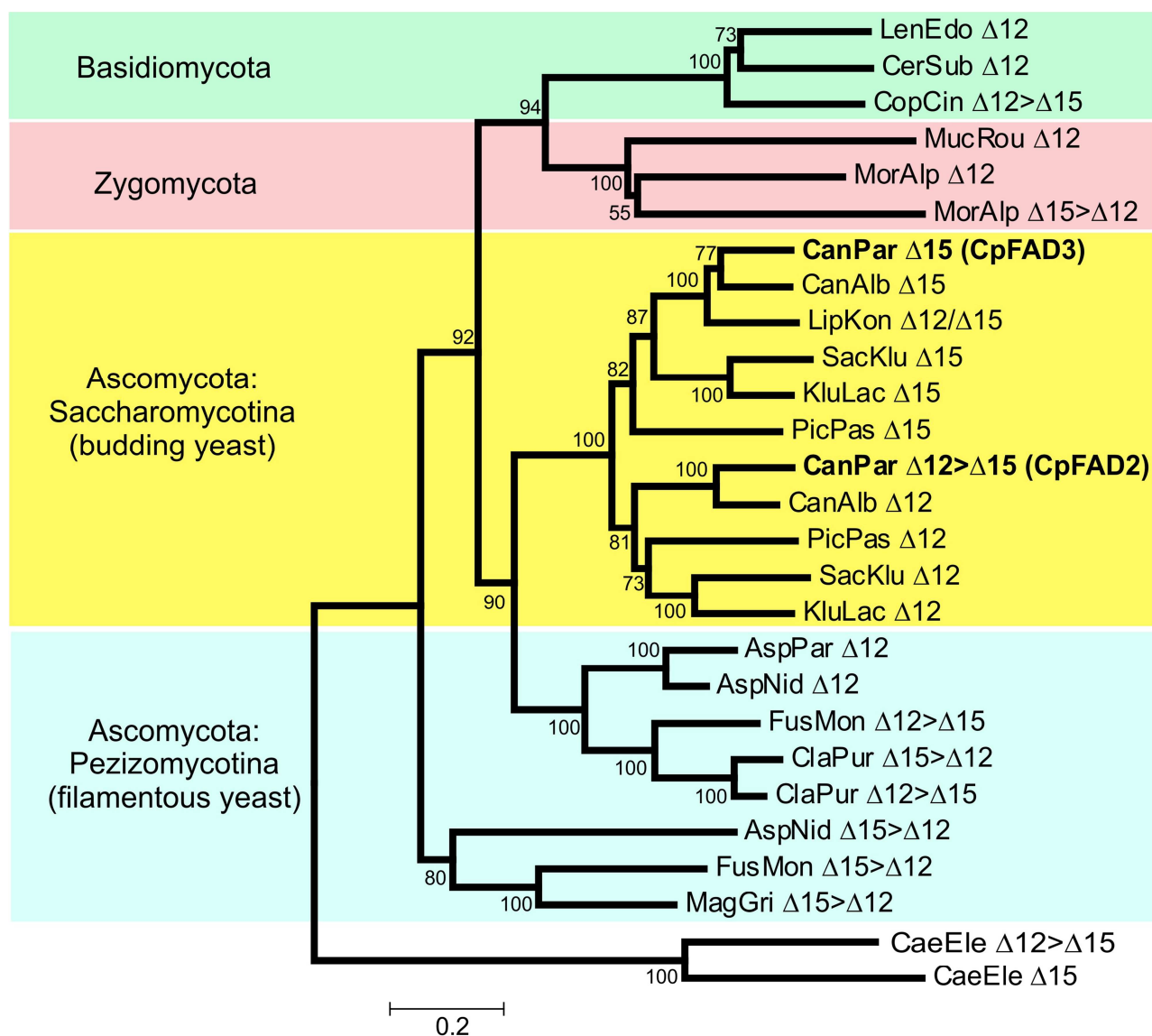


Figure 3: Neighbor-joining gene tree showing relatedness of fungal $\Delta 12$ - and $\Delta 15$ -FADs based on their protein sequence. CpFAD2 and CpFAD3 identified and characterized in this work are highlighted in bold. The source species name is abbreviated and followed by experimentally determined desaturase regioselectivity. For multifunctional FADs, preferred regioselectivity is indicated by “>” if available in the literature (e.g., $\Delta 12 > \Delta 15$ indicates preferential $\Delta 12$ -desaturase regioselectivity). $\Delta 12$ -FAD and $\Delta 15$ -FAD from the nematode *Caenorhabditis elegans* (CaeEle) were added as an outgroup. Numbers along branches indicate bootstrap percentage support from 1000 replicates. The scale bar shows number of amino acid changes per site. Adapted from³⁸.

These results also demonstrate that both CpFad2 and CpFad3 are capable of production of multiple PUFAs or hydroxylated FA products which were previously not detected as products of the putative CpFAD2 and CpFAD3 orthologs from budding yeasts (Ascomycota: Saccharomycotina) (Fig. 3). This work indicates that detailed analysis of minor FAD products has a potential to uncover a range of otherwise undescribed enzymatic selectivities of Δ 12-FADs and Δ 15-FADs.

My contribution

I have isolated the coding regions of CpFAD2 and CpFAD3; cloned CpFAD2 and CpFAD3 into yeast expression vectors and transformed them into *S. cerevisiae* yeast strains; cultivated the yeast strains heterologously expressing CpFAD2 and CpFAD3; isolated the total cellular lipids and analyzed their fatty acid methyl ester-, 4,4-dimethyloxazoline-, and trimethylsilyl-derivatives using GC/MS; analyzed the GC/MS data; wrote the draft of the manuscript.

3 References

1. El-Sayed. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com>. (2014).
2. Matoušková, P., Pichová, I. & Svatoš, A. Functional characterization of a desaturase from the tobacco hornworm moth (*Manduca sexta*) with bifunctional Z11- and 10,12-desaturase activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**, 601–610 (2007).
3. Fang, N., Teal, P. E. A., Doolittle, R. E. & Tumlinson, J. H. Biosynthesis of conjugated olefinic systems in the sex pheromone gland of female tobacco hornworm moths, *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 39–48 (1995).
4. Wang, H. *et al.* Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 581–585 (2015).
5. Bai, Y. *et al.* X-ray structure of a mammalian stearyl-CoA desaturase. *Nature* **524**, 252–256 (2015).
6. Buček, A. *et al.* Evolution of moth sex pheromone composition by a single amino acid substitution in a fatty acid desaturase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 12586–12591 (2015).
7. Ayasse, M. & Jarau, S. Chemical ecology of bumble bees. *Annu. Rev. Entomol.* **59**, 299–319 (2014).
8. Bergman, P. & Bergström, G. Scent marking, scent origin, and species specificity in male pre-mating behavior of two Scandinavian bumblebees. *J. Chem. Ecol.* **23**, 1235–1251 (1997).
9. Kullenberg, B., Bergström, G., Bringer, B., Carlberg, B. & Cederberg, B. Observations on scent marking by *Bombus* Latr. and *Psithyrus* Lep. males (Hym. Apidae) and localization of site of production of the secretion. *Zoon* **1**, 23–30 (1973).
10. Albert, T., Spaethe, J., Grubel, K. & Rossler, W. Royal jelly-like protein localization reveals differences in hypopharyngeal glands buildup and conserved expression pattern in brains of bumblebees and honeybees. *Biol. Open* **3**, 281–288 (2014).
11. Poiani, S. B. & Da Cruz-Landim, C. Morphological changes in the cephalic salivary glands of females and males of *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae). *J. Biosci.* **35**, 249–255 (2010).
12. Lanne, B. S., Bergström, G., Wassgren, A.-B. & Törnback, B. Biogenetic pattern of straight chain marking compounds in male bumble bees. *Comp. Biochem. Physiol.* **88**, 631–636 (1987).
13. Matoušková, P. *et al.* A delta9 desaturase from *Bombus lucorum* males: investigation of the biosynthetic pathway of marking pheromones. *Chembiochem* **9**, 2534–41 (2008).
14. Buček, A. *et al.* The role of desaturases in the biosynthesis of marking pheromones in bumblebee males. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **43**, 724–31 (2013).
15. Uemura, H. Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 1–12 (2012).
16. Certik, M. & Shimizu, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 1–14 (1999).
17. Krishnamurthy, S. *et al.* Dosage-dependent functions of fatty acid desaturase Ole1p in growth and morphogenesis of *Candida albicans*. *Microbiology* **150**, 1991–2003 (2004).
18. Nguyen, L. N., Gacser, A. & Nosanchuk, J. D. The stearyl-coenzyme A desaturase 1 is essential for virulence and membrane stress in *Candida parapsilosis* through unsaturated fatty acid production. *Infect. Immun.* **79**, 136–45 (2011).
19. Murayama, S. Y. *et al.* Construction and functional analysis of fatty acid desaturase gene disruptants in *Candida albicans*. *Microbiology* **152**, 1551–8 (2006).
20. Wilson, R. a, Calvo, A. M., Chang, P.-K. & Keller, N. P. Characterization of the *Aspergillus parasiticus* delta12-desaturase gene: a role for lipid metabolism in the *Aspergillus*-seed interaction. *Microbiology* **150**, 2881–8 (2004).
21. Calvo, A. M., Gardner, H. W. & Keller, N. P. Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **276**, 25766–25774 (2001).
22. Meesapyodsuk, D., Reed, D. W., Covello, P. S. & Qiu, X. Primary structure, regioselectivity, and evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases of *Claviceps purpurea*. *J. Biol. Chem.* **282**, 20191–9 (2007).
23. Hoffmann, M. *et al.* A small membrane-peripheral region close to the active center determines regioselectivity

- of membrane-bound fatty acid desaturases from *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **282**, 26666–74 (2007).
24. Sakuradani, E., Kobayashi, M., Ashikari, T. & Shimizu, S. Identification of Delta12-fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing mortierella fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* **261**, 812–20 (1999).
 25. Huang, Y. S. *et al.* Cloning of delta12- and delta6-desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of gamma-linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* **34**, 649–59 (1999).
 26. Sakuradani, E., Abe, T., Iguchi, K. & Shimizu, S. A novel fungal omega3-desaturase with wide substrate specificity from arachidonic acid-producing *Mortierella alpina* 1S-4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 648–54 (2005).
 27. Damude, H. G. *et al.* Identification of bifunctional delta12/omega3 fatty acid desaturases for improving the ratio of omega3 to omega6 fatty acids in microbes and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9446–9451 (2006).
 28. Wei, D. S., Li, M. C., Zhang, X. X., Zhou, H. & Xing, L. J. A novel Delta12-fatty acid desaturase gene from methylotrophic yeast *Pichia pastoris* GS115. *Acta Biochim. Pol.* **53**, 753–9 (2006).
 29. Zhang, X., Li, M., Wei, D. & Xing, L. Identification and characterization of a novel yeast omega3-fatty acid desaturase acting on long-chain n-6 fatty acid substrates from *Pichia pastoris*. *Yeast* **25**, 21–7 (2008).
 30. Kainou, K., Kamisaka, Y., Kimura, K. & Uemura, H. Isolation of Delta12 and omega3-fatty acid desaturase genes from the yeast *Kluyveromyces lactis* and their heterologous expression to produce linoleic and alpha-linolenic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 605–12 (2006).
 31. Oura, T. & Kajiwara, S. *Saccharomyces kluyveri* FAD3 encodes an omega3 fatty acid desaturase. *Microbiology* **150**, 1983–90 (2004).
 32. Watanabe, K., Oura, T., Sakai, H. & Kajiwara, S. Yeast Delta 12 fatty acid desaturase: gene cloning, expression, and function. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 721–7 (2004).
 33. Yan, Z. *et al.* Clone and identification of bifunctional $\Delta 12/\Delta 15$ fatty acid desaturase LKFAD15 from *Lipomyces kononenkoae*. *Food Sci. Biotechnol.* **22**, 573–576 (2013).
 34. Shanklin, J. & Cahoon, E. B. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 611–641 (1998).
 35. Peyou-Ndi, M. M., Watts, J. L. & Browse, J. Identification and characterization of an animal delta(12) fatty acid desaturase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 399–408 (2000).
 36. Zhou, X.-R., Green, A. G. & Singh, S. P. *Caenorhabditis elegans* Delta12-desaturase FAT-2 is a bifunctional desaturase able to desaturate a diverse range of fatty acid substrates at the Delta12 and Delta15 positions. *J. Biol. Chem.* **286**, 43644–50 (2011).
 37. Kikukawa, H. *et al.* Characterization of a trifunctional fatty acid desaturase from oleaginous filamentous fungus *Mortierella alpina* 1S-4 using a yeast expression system. *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 672–6 (2013).
 38. Buček, A., Matoušková, P., Sychrová, H., Pichová, I. & Hrušková-Heidingsfeldová, O. $\Delta 12$ -Fatty acid desaturase from *Candida parapsilosis* is a multifunctional desaturase producing a range of polyunsaturated and hydroxylated fatty acids. *PLoS One* **9**, e93322 (2014).

4 Curriculum Vitae

Aleš Buček, MSc.

Born 13th of June 1985 in Ostrava, Czech Republic

Education

- 2009 – present PhD study at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague. Dissertation thesis “*Evolution of insect pheromone-biosynthetic fatty acid desaturases*” under supervision of Dr. Iva Pichová (IOCB AS CR).
- 2007 – 2009 MSc. degree at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague. Master's thesis “*Identification and characterization of Candida parapsilosis desaturases*” under supervision of Dr. Iva Pichová (IOCB AS CR).
- 2004 – 2007 Bc. degree at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague. Bachelor's thesis “*Desaturases of pathogenic yeasts*” under supervision of Dr. Olga Hrušková-Heidingsfeldová (IOCB AS CR).

Publications

First author or co-author of 6 publications in peer-reviewed international journals.

Conference oral presentations (OP) and poster presentations (PP)

- International society of chemical ecology annual meeting (Brazil, 2016, OP)
- 43rd Annual meeting on yeast (Slovakia, 2016, OP)
- Biology and genomics of social insects (New York, 2015, OP + PP)
- 9th Workshop on the molecular biology and genetics of Lepidoptera (Greece, 2014, OP)
- Seventh international symposium on molecular insect science (Netherlands, 2014, PP)
- 4th Czech lipidomic conference (Czech Republic, 2014, OP)
- XV Meeting of young biologists, chemists and biochemists (Czech Republic, 2014, OP)
- 30th International specialized symposium on yeast (Slovakia, 2013, OP)
- XIV Meeting of young biologists, chemists and biochemists (Czech Republic, 2013; OP)
- International society of chemical ecology 28th annual meeting (Lithuania, 2012, PP)
- 6th international symposium on molecular insect science (Netherlands, 2011, PP)
- 38th annual conference on yeast (Slovakia, 2010, OP + PP)
- 1st meeting of lipidomic section of CSBMB (Czech Republic, 2010, OP)

Internships

- 2-months research stay at Max Planck Institute for Chemical Ecology (Jena, Germany) in group of Dr. Aleš Svatoš. Conducted RNAi experiments, biochemical characterization of *Manduca sexta* desaturases and GC/MS measurements of desaturase products (2013).
- 1-month field campaign in French Guiana. Conducted field collection of termite specimens and behavioral assays under supervision of Dr. Jan Šobotník (2013).

Certificates

Certificate in Advanced English (CAE, 2011)