

## Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci nazvanou „STUDIUM EVOLUCE DESATURAS MASTNÝCH KYSELIN ZAPOJENÝCH V BIOSYNTÉZE HMYZÍCH FEROMONŮ“ předloženou Mgr. ALEŠEM BUČKEM Katedře biochemie Přírodovědecké fakulty UK v Praze

### Výchozí stav

Experimentální část předložené práce byla z větší části provedena na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze a tematicky navazuje na výsledky badatelských týmů vedených dr. Ivou Pichovou a doc. Irenou Valterovou, které se už řadu let věnují výzkumu chemických procesů uplatňujících se při biosyntéze a fylogenesi semiochemikálií hmyzu, jmenovitě samičích pohlavních feromonů motýlů (viz citace 190, 232, 246) a značkovacích feromonů samců čmeláků rodu *Bombus*. V případě čmeláků se interdisciplinární tým věnoval nejen studiu struktury feromonů, biochemických mechanismů jejich syntézy, transportu a ukládání, ale i reprodukčním chováním samců při jejich vylučování (viz citace 36, 121, 142, 143, 144, 179, 235, 273). Práce mgr. Bučka logicky navazuje a doplňuje paletu získaných poznatků u motýlů i čmeláků pokusem o hlubší vhled do molekulární podstaty evoluce druhové specificity pohlavních feromonů, a to prostřednictvím studia desaturáz mastných kyselin, tj. skupiny enzymů zapojených v biosyntéze nenasycených feromonových složek. Práce je ještě doplněna identifikací desaturáz zapojených v biosyntéze vícenasycených mastných kyselin u oportunisticky patogenní kvasinky *Candida parapsilosis* (citace 268; zvláště jsou práce, které jsou součástí disertace).

### Předmět a cíle

Předložená disertační práce prohlubuje zmíněné studie tím, že usiluje o objasnění molekulárních mechanismů evoluce těchto chemických komunikačních signálů na dvou modelových systémech, (i) samičích feromonech lišaje tabákového, *Manduca sexta*, a (ii) samčích značkovacích feromonech třech evropských druhů čmeláků rodu *Bombus*, čmeláka zemního, hájového a skalního (*B. terrestris*, *B. lucorum* a *B. lapidarius*). Je zaměřena na studium membránových desaturáz mastných kyselin, které zavádí dvojnásobné vazby do uhlovodíkových řetězců těchto kyselin a tím produkují nenasycené prekurzory feromonů od nich odvozených. Desaturázy jsou zapojené v biosyntéze pohlavních feromonů u jedné z druhově nejpočetnějších hmyzích řádů, tj. u motýlů, dvoukřídlých, blanokřídlých, švábů a termitů. Autor proto oprávněně argumentuje, že objasnění molekulárních principů biosyntézy pohlavních feromonů může pomoci zodpovědět klíčové otázky týkající se chemické ekologie a evoluce hmyzu, neboť tyto semiochemikálie často slouží jako reprodukční bariéry u mnohých sympatrických druhů. Připojená je i srovnávací studie desaturáz u jednobuněčného organismu, patogenní kvasinky *Candida parapsilosis*, která měla ukázat, že schopnost produkovat široké spektrum nenasycených mastných kyselin je sdílena desaturázami napříč biologickými říšiemi.

**Praktický význam** zvoleného tématu vidím v tom, že feromony škůdců z řádu Lepidoptera se osvědčily jako nástroj ekologicky přijatelnějších způsobů kontroly jejich populací než je aplikace toxických pesticidů, a proto poznatky o molekulární podstatě jejich specificity mohou přispět i k zavádění genetických přístupů ovlivňování početnosti škůdce. V případě užitečného hmyzu jako jsou čmeláci, kteří jsou ve stoupající míře komerčně používáni jako opylovači skleníkových kultur hospodářsky významných plodin (rajčata, okurky aj.), jakékoliv poznatky rozšiřující znalost jejich biologie a fyziologie mohou přispět k intenzifikaci jejich využití.

Disertant sledoval tři **hlavní cíle**:

(i) využít skutečnost, že samice lišaje tabákového používá jako sexuální atraktant vedle majoritních složek jednonenasycených a dvouenasycených 16C aldehydů typických pro lišajovitě i unikátní aldehydy odvozené od třinenasycených mastných kyselin k objasnění struktury desaturázy, která je zodpovědná za konečný desaturační krok zavádějící třetí dvojnou vazbu a která nebyla dosud poznána, což by mohlo poodhalit molekulární základy evoluce pohlavních feromonů u těchto nočních motýlů;

(ii) zhodnotit, je-li druhově specifické složení značkovacích feromonů z labiální žlázy samců výše zmíněných tří druhů čmeláků ovlivněno substrátovými specificitami desaturáz mastných kyselin, které slouží jako prekurzory nenasycených složek těchto feromonů;

(iii) identifikovat desaturázy mastných kyselin zapojené v biosyntéze vícenenasycených mastných kyselin u kvasinky *C. parapsilosis* s cílem zhodnotit současnou kategorizaci kvasinkových desaturáz.

## **K obsahu**

Práce je celá napsaná velmi dobrou angličtinou a je rozdělena do 6 oddílů:

V **úvodní kapitole I** (11 str.) podává autor stručný, ale výstižný historický přehled studia hmyzích sexuálních feromonů a jeho vývoje v závislosti na rozvoji analytických a biochemických technik. Dále se věnuje biochemii nenasycených mastných kyselin, zejména struktuře a enzymatické specifitě membránových desaturáz MK, které se při biosyntéze feromonů uplatňují. Zbývající část úvodní kapitoly je věnována feromonům, které jsou zejména u hmyzu dominantním komunikačním prostředkem, a proto byly historicky ve středu zájmu výzkumníků i praktiků. Zvláštní zmínku zaslouží zpracování paragrafu věnovaného evoluci hmyzích sexuálních feromonů odvozených od nenasycených mastných kyselin – ústřední téma, od něhož se odvíjí celá disertace. Přesto, že feromony tohoto typu už byly popsány u řádově tisíců hmyzích druhů, molekulární mechanismy, jakož i selektivní ekologické tlaky, které tuto diverzitu podmiňují, nejsou ještě dobře poznány. Autor zmiňuje i nevyřešené problémy související s genetickými mechanismy, které na jedné straně zabezpečují vysokou atraktivnost a druhovou specifitu feromonových signálů a současně umožňují rychlou evoluci jejich chemického složení. Ani vztahy mezi geny řídící produkci signálu u jednoho pohlaví a jeho příjem a rozpoznání u pohlaví opačného nebyly zatím podrobeny vědecké skrutině. Poslední paragrafy úvodu analyzují současné poznatky týkající se molekulárních základů evoluce sexuálních feromonů odvozených od mastných kyselin. Kapitola tak shrnuje literární údaje relevantní k předmětu a cílům disertace, jež pomohou čtenáři při orientaci v dalších kapitolách a při interpretaci experimentálních výsledků disertace získaných molekulárními přístupy.

V **kapitole II Cíle výzkumu** autor stručně a jasně definuje tři hlavní cíle disertace (viz výše), jež jsou předmětem **kapitoly III Publikace** tvořené souborem tří publikovaných studií, které představují hlavní dosažené výsledky. Každé z nich je věnován stručný úvod a shrnutí včetně graficky vyjádřeného abstraktu, a rozepsán je i podíl disertanta na získávání dat, jejich vyhodnocení a na přípravě rukopisu.

Sjednocujícím a vysvětlujícím textem zmíněných publikací je **kapitola IV Diskuze a závěry**. Na 7 stranách textu se autorovi podařilo obhájit důvody pro výběr tematiky a pokusných druhů, ospravedlnit stanovené cíle a metodické postupy k jejich dosažení a dát dosažené výsledky do kontextu s recentními poznatky jiných autorů. Ukazuje, jak disertační práce na genetické úrovni poodhaluje rozdílnou roli desaturáz v evoluci feromonové komunikace u zástupců dvou odlišných hmyzích řádů. Hlavním poznatkem studia evoluce samičích pohlavních feromonů lišaje tabákového je zjištění, že desaturázy zapojené v biosyntéze

feromonů jsou s to získat schopnost produkovat nové nenasyčené mastné kyseliny jako důsledek substituce jediného aminokyselinového zbytku, což je mechanismus se značným potenciálem v evoluci feromonového složení u lišajů, popř. i dalších lepidopter. Naproti tomu studium desaturáz u 3 druhů čmeláků odhalilo post-transkripční regulaci těchto enzymů jako možný alternativní mechanismus určující druhově specifické složení u těchto blanokřídlých.

Celý text disertace včetně diskuze je opřen o 280 citovaných publikací (**kapitola V Reference**).

Časopisecké kopie všech tří publikací jsou v **Dodatku (Supplements, Publications I – III)** který je součástí svazku. Podrobnější výsledky jednotlivých publikací zde neuvádím, autor je představí ve svém exposé určitě nejkompletněji sám. Jen bych chtěl zdůraznit, že všechny výsledky byly uveřejněny v prestižních vědeckých časopisech s vysokým IF (PNAS USA, Insect Biochem Mol Biol, PLoS One) a přísné *peer-review* panely těchto žurnálů jistě uhlídaly případné nedostatky rukopisů před jejich uveřejněním. Pod publikacemi jsou podepsány poměrně početné kolektivy autorů, což je u současných experimentálních interdisciplinárních studií běžné, ale mgr. Buček je ve všech třech případech prvním autorem a podle deklarované spoluúčasti se vždy podílel na designu pokusů, jejich provedení, analýze dat i sepsání práce. O jeho úloze jako hegemonu studií proto nemůže být pochyb. Svědčí to o jeho schopnosti zorganizovat a řídit kolektiv různých specialistů. V disertaci jsou okrajově citovány ještě další tři letošní publikace disertanta z oblasti hmyzích semiochemikálií vyšlé rovněž ve významných vědeckých periodikách (ChemBioChem, Mol Biol Evol, Insect Mol Biol), ale v disertační práci nejsou zahrnuté; v jednom případě je i prvním autorem. Ve všech studiích, na nichž se Aleš Buček podílel, osvědčil širokou škálu metodických dovedností, jako je analýza RNA-seq dat a identifikace desaturázových transkriptů, potvrzení expresního profilu desaturáz pomocí qRT-PCR, klonování kódujících úseků desaturáz do kvasinkových expresních vektorů a jejich transformace do kvasinkových kmenů, izolace a analýza mastných kyselin pomocí GS/MS či práce s izotopově značenými mastnými kyselinami.

### **Oponentské připomínky a náměty do diskuse**

Součástí podání disertace je i povinný česko-anglicky psaný autoreferát. Určitě bych nebyl sám, kdo by uvítal jako součást disertace aspoň ten jednostránkový český abstrakt, jak je inteligentně formulován v autoreferátu.

Dále bych chtěl vyzvednout výbornou úroveň angličtiny. Pokud jsem nějaké drobné prohřešky našel, opravil jsem je přímo v textu. Chtěl bych také upozornit na několik terminologických nepřesností v českém textu autoreferátu, jichž by se měl autor vystříhat, pokud bude text publikovat v mateřštině třeba jako populární článek. Anglické slovo „*moth*“ se všeobecně překládá jako „můra“, popř. „mol“, což ale není přesné. Můra je motýl z čeledi Noctuidae (můrovití), a ti patří do nadčeledi Noctuoidea, nikoliv Bombycoidea. Proto výraz „*u můr z nadčeledi Bombycoidea*“ by u puristického lepidopterologa vzbudil nevoli, ne tak ani u mne. V podobných případech bych ale radil vyhnout se této ošidnosti výrazem „*u nočních motýlů nadčeledi Bombycoidea*“, protože tato nadčeleď zahrnuje jak lišaje, tak bource, martináče a dalších asi 7 čeledí vesměs nočních druhů, u nichž právě 1nMK resp. 2nMK mohou být typickou proferomonovou strukturou, a o toto sdělení autorovi šlo.

Chtěl bych také připomenout, že druhová specifita sexuálních feromonů je dána u většiny lepidopter určitým poměrem vícero látek ve směsi, které se nemusí lišit jen stereoisomery. Někdy stačí jen záměna acetátového konce za alkohol, aby se z atraktantu jednoho druhu stal inhibitor pro druh jiný. Klasickým příkladem známým už přes 40 let jsou samičí feromony dvou druhů skladištních škůdců z čeledi zavíječovitých (Pyralidae), vyskytujících se sympatricky, tj. zavíječe kakaového (*Cadra cautella*) a zavíječe paprikového (*Plodia interpunctella*). Pro odlehčení si dovoluji jednu autocitaci: „*U obou zavíječů byla jako hlavní*

*složka pohlavního feromonu zjištěna stejná látka, Z9,E12-14:Ac, samci však reagují jen na své vlastní samičky, a to i v laboratoři, připravíme-li jim v kleci společné setkání. Záhadu vysvětluje dodatečný nález dalších složek feromonů. Samička zavíječe paprikového vypouští ještě malé množství alkoholu Z9,E12-14:OH a ten to samcům kakaového specialisty dokonale znechucuje. Kakaová samička se zase brání dotěrností paprikového příbuzného malým množstvím jiného geometrického izomeru Z9,Z12-14:Ac jejich společného feromonu. Seznamujeme se tak s novým typem látek, s tak zvanými inhibitory... V orchestru motýlích vůní představují další nástroj“. Zajímalo by mne, jak vidí problematiku druhové specificity multikomponentních feromonů motýlů popř. kombinovaných s inhibitory badatel studující molekulární mechanismy evoluce, a to i proto, že většina známých feromonů jsou vícesložkové. Dokonce i první, Butenandtem v roce 1959 identifikovaný hmyzí feromon bombykol (jak bylo správně zmíněno v práci) není jednosložkový. „Téměř dvacet let po historickém objevu bombykolu přichází zpráva, že tento pionýr mezi feromony není ve žláze samičky sám. Společníkem alkoholu se ukázal být jeho aldehyd. Ve směsi ho bylo zjištěno asi desetkrát méně. Vědci z IMP v Seewiesen a Mnichově v článku věnovaném k 75. narozeninám prof. Butenandta dali novému feromonu jméno bombykal. Dodatečně zjistili, že tykadla samečků mají jeden typ čichových sensil citlivý na bombykol a druhý na bombykal.“ (obě citace: Žďárek 1980, Neobvyklá setkání, Panorama Praha).*

### **Závěrečné prohlášení**

Je mi potěšením konstatovat, že jak po formální, tak i obsahové stránce práce zcela odpovídá standardům kladeným na doktorskou disertaci a v některých parametrech je dokonce výrazně přesahuje. Podle mých zkušeností není u nás zcela běžné, aby aspirant podal k obhajobě tak rozsáhlý soubor velmi kvalitních prací uveřejněných v předních vědeckých časopisech. Svědčí to nejen o jeho odborné erudici a schopnosti využít prvotřídní experimentální zázemí v laboratořích, kde byla práce vyhotovena, ale i o koncepční ujasněnosti a výzkumné vizi vedení tohoto pracoviště. Nerozpakuji se vyjádřit názor, že práce by uspěla při obhajobě i na kterékoli eminentní zahraniční škole. Disertant prokázal nad vší pochybnost, že je schopen definovat, řešit i vyhodnotit vědecký problém a výsledky patřičným způsobem komunikovat. Je tedy připravený k samostatné činnosti v oblasti výzkumu a vývoje, jak vyžaduje *par. 47, odst. 4, zákona č. 111/Sb., o vysokých školách*. Mohu proto vyslovit následující

### **závěr.**

**Písemná disertační práce mgr. Aleše Bučka „Studium evoluce desaturas mastných kyselin zapojených v biosyntéze hmyzích feromonů“ předložená komisi pro obhajoby disertačních prací splňuje podmínky kladené na disertační práci, a proto ji doporučuji přijmout k obhajobě.**

Praha, 24. srpna 2016.

.....  
Prof. RNDr. Jan Žďárek, DrSc.