

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Mgr. Dominika Chalupská

Acetyl-CoA karboxylasa - evoluce a inhibice
Acetyl-CoA carboxylase - evolution and inhibition

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
doc. RNDr. Noemi Čeřovská, CSc.
Piotr Gornicki, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 20.11.2012

Podpis

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala své školitelce docentce Noemi Čeřovské za neocenitelnou pomoc při sepsání mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat panu profesorovi Haselkornovi, který mi umožnil vypracovat celou práci v jeho laboratoři a který byl vstřícný ke všem mým potřebám, a Piotru Gornicki, který celou mou práci vedl a vždy byl ochotný pomoci a poradit. V neposlední řadě patří poděkování celé mé rodině za morální podporu a milé prostředí.

Tato práce byla vypracována v laboratoři profesora Haselkorna na University of Chicago, Department of Molecular Genetics and Cell Biology a byla finančně podpořena Australian Grains Research and Development Corporation, University of Queensland, granty U.S. Department of Agriculture, National Research Initiative Competitive Grants Program, National Institutes of Health grants a Biological Sciences Division of the University of Chicago, kterým tímto děkuji.

Abstrakt

Acetyl-CoA karboxylasa (ACC) je klíčovým enzymem metabolismu mastných kyselin. U eukaryot se často vyskytuje v mnoha isoformách a v různých buněčných kompartmentech.

V zemědělství jsou inhibitory plastidové ACC používány jako účinné herbicidy travinných plevelů. Problémem se ale stává rezistence některých populací travinných plevelů vůči používaným herbicidům aryloxyfenoxypropionátům (APPs) a cyklohexandionům (CHDs). Pomocí PCR a sekvenování bylo u resistantních rostlin populací *Avena sterilis ssp. ludoviciana* Durieu z obilnářské oblasti severní Austrálie nalezeno pět aminokyselinových substitucí v plastidové ACC: Trp-1999-Cys, Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn, Asp-2078-Gly a Gly-2096-Ala. S použitím systému s kvasinkovými kmeny s nahrazenými geny (GR systému) jsme ukázali, že každá z těchto mutací způsobuje rezistenci k herbicidům i u pšeničné plastidové ACC: Asp-2078-Gly způsobuje rezistenci k APPs a CHDs, Trp-2027-Cys a Ile-2041-Asn způsobují rezistenci k APPs a Trp-1999-Cys způsobuje rezistenci pouze k fenoxapropu. Tyto mutace by velmi pravděpodobně mohly způsobit rezistenci kteréhokoli druhu travinných plevelů pod selekčním tlakem hojně používaných herbicidů.

Lidská ACC představuje zajímavý cíl nových léčiv pro léčbu metabolického syndromu. Vyvinuli jsme finančně nenáročný neradioaktivní vysokokapacitní systém k identifikaci nových inhibitorů ACC. Testování využívá kvasinkové kmeny s nahrazenými geny (GR kmeny) závisující svým růstem na klonované lidské ACC1 a ACC2. Pro ověření fungování tohoto systému byl růst zmíněných kmenů inhibován známými inhibitory lidské ACC. Testováním knihoven chemických sloučenin jsme našli nové specifické inhibitory lidské ACC2. Cíl působení nejlepšího z těchto inhibitorů byl potvrzen testováním enzymatické aktivity *in vitro*. Tato sloučenina inhibuje lidskou ACC2 s 2,8 μM IC_{50} a nemá ve 100 μM žádný účinek na lidskou ACC1.

Sekvenci genu pro pšeničnou ACC jsme studovali také z evolučního hlediska. DNA sekvence lokusů pšeničných ACC1 a ACC2, kódujících plastidovou a cytosolovou formu ACC, byly analyzovány s cílem porozumět evoluci těchto genů a původu tří genomů v moderní hexaploidní pšenici. Byly sekvenovány lokusy ACC1 a ACC2 z pšeničných druhů *Triticum urartu* (genom A), *Aegilops tauschii* (genom D), *Triticum turgidum* (genom AB) a *Triticum aestivum* (genom ABD), a dva pseudogeny ACC2 z *T. urartu*. Tři homologní chromosomy se podle výpočtů na základě kódujících a intronových sekvencí genů ACC1 oddělily před 2,3-2,4 miliony let, což je na dolní hranici jiných odhadů. Při kalibraci molekulárních hodin jsme vycházeli z doby oddělení pšenice a kukuřice před 60 miliony let. Ve stejném časovém měřítku se na základě sekvencí ACC a dalších genů oddělila pšenice a ječmen před 11,6 miliony let. Oblasti ohraničující ACC geny nejsou konservované mezi genomy A, B a D. Jsou konservované v porovnání homologních genomů diploidní, tetraploidní a hexaploidní

pšenice. Frekvence substitucí v intergenových oblastech je proměnlivá a v průměru je 3,5 krát vyšší než frekvence substitucí v intronech.

Abstract

Acetyl-CoA carboxylase (ACC) is a key enzyme of fatty acid metabolism with multiple isozymes often expressed in different eukaryotic cellular compartments.

In agriculture, inhibitors of plastid ACC are used as efficient herbicides against grass weed. However, grass weed populations resistant to aryloxyphenoxypropionate (APP) and cyclohexanedione (CHD) herbicides represent a major problem for sustainable agriculture. Using PCR and sequencing it was found out that five amino acid substitutions in plastid ACC were correlated with herbicide resistance of *Avena sterilis ssp. ludoviciana* Durieu populations from the northern grain-growing region of Australia: Trp-1,999-Cys, Trp-2,027-Cys, Ile-2,041-Asn, Asp-2,078-Gly and Gly-2,096-Ala. We showed, using a yeast gene-replacement system, that these single-site mutations also confer herbicide resistance to wheat plastid ACCase: Asp-2,078-Gly confers resistance to APPs and CHDs, Trp-2,027-Cys and Ile-2,041-Asn confer resistance to APPs, and Trp-1,999-Cys confers resistance only to fenoxaprop. These mutations are very likely to confer resistance to any grass weed species under selection imposed by the extensive agricultural use of the herbicides.

ACC provides an important target for new drugs to treat human diseases. We have developed an inexpensive nonradioactive high-throughput screening system to identify new ACC inhibitors. The screen uses yeast gene-replacement strains depending for growth on cloned human ACC1 and ACC2. In "proof of concept" experiments, growth of such strains was inhibited by compounds known to target human ACCs. Chemical libraries yielded new specific inhibitors of human ACC2. The target of the best of these inhibitors was confirmed with *in vitro* enzymatic assays. This compound inhibits human ACC2 with 2.8 μM IC_{50} and has no effect on human ACC1 at 100 μM .

We used the DNA sequence of wheat ACC also to study evolution. The DNA sequences of wheat ACC1 and ACC2 loci, encoding the plastid and cytosolic forms of the enzyme acetyl-CoA carboxylase, were analyzed with a view to understanding the evolution of these genes and the origin of the three genomes in modern hexaploid wheat. ACC1 and ACC2 loci from each of the wheats *Triticum urartu* (A genome), *Aegilops tauschii* (D genome), *Triticum turgidum* (AB genome), and *Triticum aestivum* (ABD genome), as well as two ACC2-related pseudogenes from *T. urartu* were sequenced. The 2.3– 2.4 Mya divergence time calculated here for the three homoeologous chromosomes, on the basis of coding and intron sequences of the ACC1 genes, is at the low end of other estimates. Our clock was calibrated by using 60 Mya for the divergence between wheat and maize. On the same time scale, wheat and barley diverged 11.6 Mya, based

on sequences of ACC and other genes. The regions flanking the ACC genes are not conserved among the A, B, and D genomes. They are conserved when comparing homoeologous genomes of diploid, tetraploid, and hexaploid wheats. Substitution rates in intergenic regions vary substantially along the loci and on average are 3.5-fold higher than the ACC intron substitution rates.

Obsah:

Použité zkratky.....	10
Orientační tabulka studovaných isoform ACC.....	10
Úvod do problematiky.....	11
1. Literární úvod.....	13
1.1. Acetyl-CoA karboxylasa.....	13
1.1.1. Biochemie ACC.....	13
1.1.2. ACC složené z podjenotek a multidoménové ACC.....	14
1.1.3. Biologická role ACC.....	16
1.1.3.1 ACC u lidí a dalších savců.....	16
1.1.3.2. ACC u rostlin.....	17
1.1.3.3. ACC u dalších organismů.....	18
1.1.4. Regulace exprese genu kódujícího ACC.....	18
1.1.5. Regulace enzymové aktivity ACC.....	19
1.1.6. ACC jako cíl účinku léčiv.....	21
1.1.7. ACC jako cíl účinku herbicidů.....	22
1.2. Pšenice z hlediska evoluce.....	23
1.2.1. Evoluce pšeničných genomů.....	23
1.2.2. Pšeničná ACC.....	25
1.3. Systém s kvasinkovými kmeny s nahrazenými geny (GR systém).....	27
2. Cíle práce.....	30
3. Materiál a metody.....	32
4. Výsledky a diskuse.....	34
4.1 Mutace plastidové ACC a resistance vůči herbicidům.....	34
4.1.1 Mutace Trp-1999-Cys, Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn a Asp-2078-Gly a resistance vůči herbicidům.....	34
4.1.2 Ověření vlivu mutací pomocí GR systému.....	35
4.1.3 Význam detekce mutací.....	36
4.2 Homologické lokusy ACC a evoluce pšeničných genomů.....	37
4.2.1 Evoluční historie pšenice.....	37
4.2.2 Analýza sekvence pšeničných lokusů ACC1 a ACC2.....	38
4.2.3 Shrnutí výsledků provedených analýz.....	43

4.2.4 Význam analýzy studovaných sekvencí.....	47
4.3 Rekombinatní kvasinkový systém pro identifikaci nových inhibitorů lidské ACC2.....	48
4.3.1 Systém pro rychlé vyhledávání inhibitorů lidské ACC2.....	48
4.3.2 Příprava kvasinkových GR kmenů a ověření komplementace ACC1 nulové mutace heterologními geny.....	48
4.3.3 Vytvoření a ověření protokolu pro vysoce kapacitní testování knihoven chemických látek.....	50
4.3.4 Testování aktivity lidské ACC1 a ACC2 <i>in vitro</i>	50
4.3.5 Identifikace nových inhibitorů.....	50
4.3.6 Význam našeho testovacího systému.....	54
5. Závěry.....	56
6. Seznam publikací.....	58
7. Použitá literatura.....	59
Přílohy 1-3.....	67

Použité zkratky

Použité zkratky:

<i>A. fatua</i>	<i>Avena fatua</i> , oves hluchý
<i>A. myosuroides</i>	<i>Alopecurus myosuroides</i> , psárka polní
<i>A. sterilis</i>	<i>Avena sterilis</i> , oves jalový
aa	Aminoacids, aminokyseliny(y)
<i>Ae. tauschii</i>	<i>Aegilops tauschii</i> , mnohoštet
ACC	Acetyl-CoA carboxylase, acetyl-CoA karboxylasa
AMPK	AMP-aktivovaná protein kinasa
APPs	Aryloxyphenoxypropionates, aryloxyfenoxypropionáty
BC	Biotin carboxylase, biotin karboxylasa
BCCP	biotin carboxyl carrier protein
CHDs	Cyclohexanediones, cyklohexandiony
CT	Carboxyl transferase, karboxyl transferasa
CoA	KoenzymA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FA	Fatty acids, mastné kyseliny
GR kmen	"Gene-replacement" kmen- v naší práci kvasinkový kmen ve kterém je sekvence genu pro ACC1 nahrazena sekvencí genu LEU2. Funkce genu ACC1 je komplementována cizím genem pro ACC.
GR systém	Systém ve kterém je delece ACC1 v kvasinkovém GR kmenu komplementována cizí ACC
SREBP1a a SREBP1c	sterol regulatory element binding proteins
ssp.	subspecies, poddruh
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>T. aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i> , pšenice setá
<i>T. dicoccum</i>	<i>Triticum dicoccum</i> , pšenice dvouzrnka
<i>T. durum</i>	<i>Triticum durum</i> , pšenice tvrdá
<i>T. monococcum</i>	<i>Triticum monococcum</i> , pšenice jednozrnka
<i>T. turgidum</i>	<i>Triticum turgidum</i> , pšenice naduřelá
<i>T. urartu</i>	<i>Triticum urartu</i>

Orientační tabulka studovaných isoform ACC

organismus	Isoforma ACC	Buněčný kompartment	funkce
pšenice	ACC1	chloroplast	Biosyntéza FA
pšenice	ACC2	cytoplasma	Sekund. Metab.
člověk	ACC1	cytoplasma	Biosyntéza FA v lipogenních tkáních
člověk	ACC2	mitochondrie	Inhibice oxidace FA ve svalech

Úvod do problematiky

Předkládaná disertační práce je komentovaným souborem publikací týkajících se enzymu acetyl-CoA karboxylasy (ACC). Tento enzym byl poprvé objeven před asi padesáti lety a byl poté intensivně studován [1]. ACC katalyzuje první a limitní krok biosyntézy mastných kyselin a je proto pro mnoho organismů esenciálním enzymem [1-7]. U eukaryot se často vyskytuje ve více isoformách exprimovaných v různých buněčných kompartmentech.

Pro studium ACC jsme se rozhodli z několika důvodů.

U rostlin se jedna isoforma ACC vyskytuje v plastidech, kde katalyzuje první fázi biosyntézy mastných kyselin. Druhá forma se v cytosolu účastní hlavně biosyntézy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem a flavonoidů. V zemědělství se využívá selektivita aryloxyfenoxypropionátových a cyklohexandionových herbicidů působících na různé typy plastidové ACC [5, 7-9]. Zatímco multidomérový typ cytosolické ACC všech rostlin a vícepodjednotkový typ ACC plastidů dvouděložných rostlin jsou vůči zmíněným herbicidům resistantní, plastidová ACC trav je citlivá. Časté používání aryloxyfenoxypropionátových a cyklohexandionových herbicidů vedlo ke vzniku resistance, kdy v ACC byly nalezeny mutace pravděpodobně zodpovědné za tuto resistenci. Naším cílem bylo ověřit spojitost nalezených mutací s resistencí vůči herbicidům. Mutace byly u resistantních rostlin detekovány pomocí PCR a sekvenování. Po prokázání vlivu zmíněných mutací na resistenci by tyto metody mohly sloužit k rychlé detekci resistance u rostlin, což by umožnilo včasné změny strategie používání herbicidů a zastavení dalšího rozšiřování resistantního plevele.

U savců se také vyskytují dvě isoformy ACC. ACC1 je esenciální enzym nezbytný pro biosyntézu mastných kyselin v lipogenních tkáních a jeho delece u myší je letální [10-12]. ACC2 v mitochondriích katalyzuje biosyntézu malonyl-CoA, což vede k potlačení transportu mastných kyselin do mitochondrie (místa oxidace mastných kyselin). Delece ACC2 u myší vedla ke kontinuální oxidaci mastných kyselin a měla vliv na citlivost těchto myší k insulinu. Tato skutečnost naznačuje možnost využití inhibitorů ACC2 v léčbě obezity [13-16]. Zatím nebyly vyvinuty žádné léky cílené proti lidské ACC. Epidemie obezity a s ní spojených projevů, jako jsou diabetes typu II, kardiovaskulární onemocnění a aterosklerosa [17-19] a syndrom insulinové resistance neboli syndrom X [20], vyžaduje vedle změny životního stylu i nové terapeutické prostředky. Snažili jsme se proto vyvinout systém pro vyhledávání inhibitorů lidské ACC2, které by poté mohly být využity k léčbě výše zmíněných obtíží.

Další zajímavostí ACC je značná délka genů kódujících multidoménovou ACC, která je vhodná pro komparativní genomovou analýzu. U pšenice je délka transkribovaných částí genů pro ACC1 13,5 kb a ACC2 12,3 kb. Studium evoluce moderní hexaploidní pšenice je zajímavé z hlediska základního výzkumu pšenice jakožto hlavní zemědělské plodiny, která byla domestikována a prošla dlouhodobým šlechtěním. Navíc vznikla allopolyploidii a nese genomy pocházející ze tří různých rostlinných druhů. Evoluce pšenice byla studována již dříve na základě kratších sekvencí genů [21-25]. Naším cílem bylo pomocí analýzy dlouhých sekvencí pšeničných ACC1 a ACC2 rozšířit znalosti evoluce pšenice, jedné z nejdůležitějších plodin na světě.

1. Literární úvod

1.1. Acetyl-CoA karboxylasa

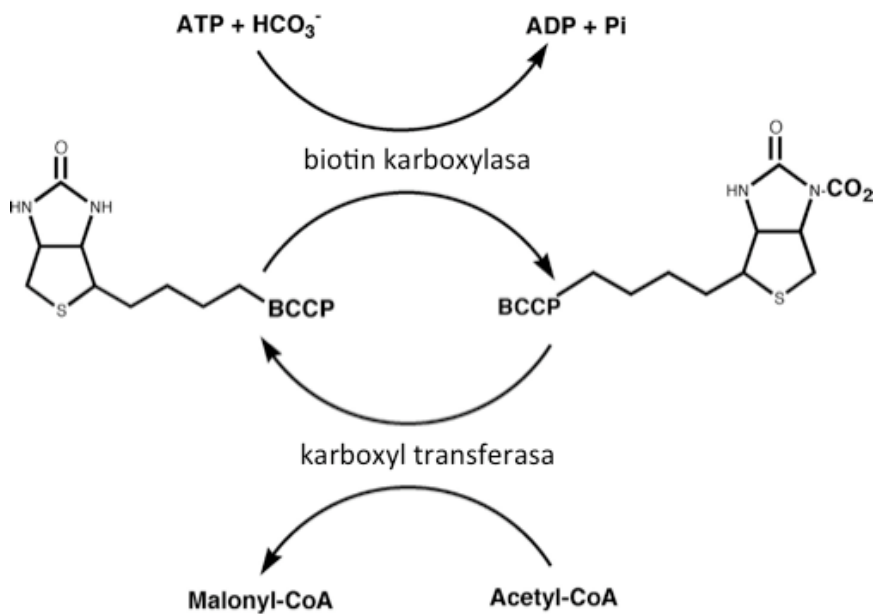
Acetyl-CoA karboxylasa (ACC; EC 6.4.1.2) je enzym katalyzující nevratnou karboxylaci acetyl-CoA za vzniku malonyl-CoA. K tomu využívá své dvě katalytické aktivity: biotin karboxylasu (BC) a karboxyl transferasu (CT). U většiny prokaryot a v chloroplastech většiny rostlin a řas se enzym ACC skládá z několika podjednotek, zatímco u většiny eukaryot se jedná o velký multidoménový enzym [2].

1.1.1. Biochemie ACC

ACC katalyzuje karboxylaci acetyl-CoA za vzniku malonyl-CoA [1, 2]. Reakce probíhá ve dvou krocích a je závislá na prosthetické skupině biotinu (obr. 1.1). První krok zahrnuje ATP-dependentní karboxylaci N1 atomu biotinu katalyzovanou aktivitou biotin karboxylasy. Donorem karboxylové skupiny je HCO_3^- . Energie pro karboxylační reakce se získává hydrolýzou ATP, vytvořením aktivovaného intermediátu karboxyfosfátu s bikarbonátovým substrátem. Pro koordinaci ATP fosfátu je vyžadována přítomnost dvojmocných iontů (Mg^{2+} nebo Mn^{2+}) [3, 4].

Druhým krokem reakce je přenos aktivované karboxylové skupiny z N1 atomu biotinu na methylovou skupinu acetyl-CoA, čímž vzniká produkt malonyl-CoA. Tento krok je katalyzován karboxyltransferasovou aktivitou. Pro tuto reakci již není třeba dodání žádné další energie.

Biotin je u vyšších organismů esenciální vitamin (vitamin H nebo B6) který může být získán pouze z potravy [5, 6]. Prosthetická skupina biotinu je kovalentně vázána k podjednotce nebo doméně přenášejí biotin (biotin carboxyl carrier protein, BCCP) amidovou vazbou mezi valeryl karboxylem biotinu a aminoskupinou vedlejšího řetězce lysinu v BCCP. Tím je mezi bicyklickým kruhem biotinu a základní kostrou BCCP vloženo 8 methylenových skupin a 10 otáčivých jednoduchých vazeb. Biotin se tak nachází na konci pohyblivého ramena (swinging arm) které umožňuje přenos mezi aktivními místy BC a CT. Vzdálenost mezi aktivními místy BC a CT je podle studií magnetické resonance a elektronové spinové resonance přibližně 7 Å [1].



Obr. 1.1 Reakční mechanismus acetyl-CoA karboxylasy. Biotin kovalentně vázaný na BCCP přenáší karboxy skupinu mezi aktivními místy BC a CT. Podle [4].

1.1.2. ACC složené z podjednotek a multidoménové ACC

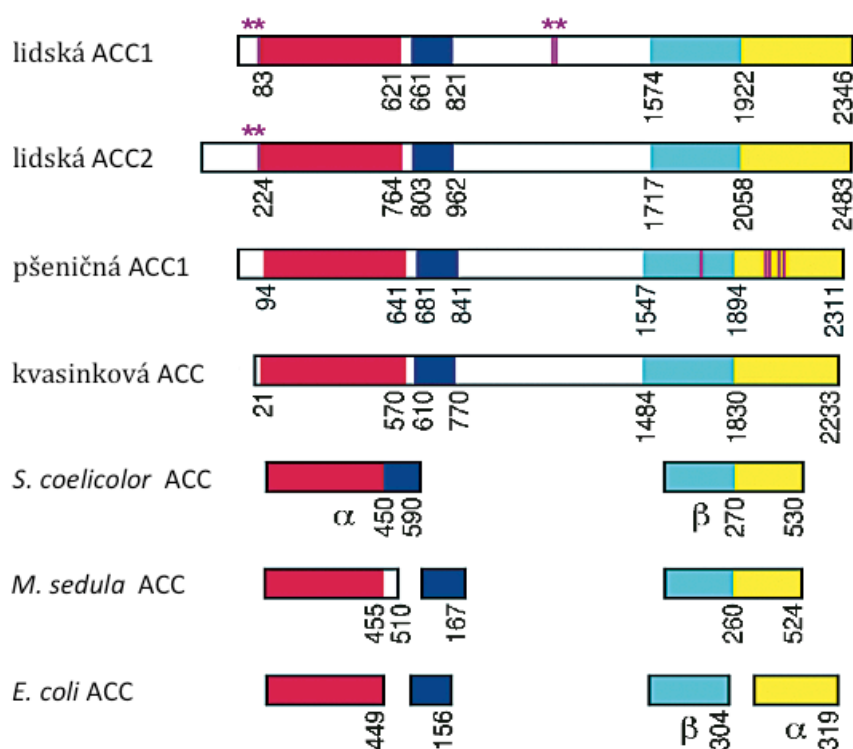
ACC byly nalezeny ve většině žijících organismů včetně archaeí, bakterií, hub, rostlin, živočichů a lidí. U *Escherichia coli* a mnoha dalších bakterií, stejně jako v chloroplastech mnoha rostlin, jsou enzymy ACC složeny z několika podjednotek (obr. 1.2)[1, 2, 4, 5, 7, 8]. BC podjednotka, tvořená u *E. coli* 449 aminokyselinovými zbytky (50kD), nese biotin karboxylasovou aktivitu, kdy biotin je připojen k BCCP podjednotce (156 aa, 17 kD). CT aktivitu zajišťují dvě podjednotky, α (319 aa, 35 kD) a β (304 aa, 33 kD) (obr. 1.2). Uvedené podjednotky spolu dohromady tvoří holoenzym ACC. Tento komplex je nestabilní a za různých podmínek snadno disociuje[2, 4]. Samotná BC podjednotka tvoří v roztoku dimery, BCCP může tvořit dimery nebo vyšší oligomery. Dvě CT podjednotky vytváří $\alpha_2\beta_2$. Stechiometrie bakteriálního holoenzymu by mohla být $(BC)_2(BCCP)_4(CT\alpha CT\beta)_2$ [26].

Naproti tomu u lidí a většiny dalších eukaryot je ACC velký (>200 kD), multidoménový enzym nesoucí BC, CT a BCCP aktivity v jediném polypeptidu (obr. 1.2) [1, 2, 8]. Lidská ACC1 obsahuje 2346 aminokyselinových zbytků a její molekulová hmotnost je 265 kD. Lidská ACC2 obsahuje 2483 aminokyselinových zbytků a její molekulová hmotnost je 280 kD (obr. 1.2). ACC2 obsahuje jedinečnou N-terminální sekvenci přibližně 140 aa, která pomáhá k zakotvení tohoto enzymu ve vnější membráně mitochondrií [27, 28]. Primární struktura multidoménoových ACC

může být rozdělena do tří částí. N-terminální třetina proteinu obsahuje BC a BCCP domény a C-terminální třetina obsahuje CT domény. Prostřední třetina proteinu je unikátní pro multidoménové ACC a funkce této části není zatím známa.

Nedávno byla nalezena ještě třetí forma ACC v aktinomycetách *Streptomyces coelicolor* (obr. 1.2). Tato ACC má α podjednotku (590 aa), obsahující BC a BCCP domény, a β podjednotku obsahující CT domény. Toto podjednotkové uspořádání ACC je stejné jako u propionyl-CoA karboxylasy. Ve skutečnosti je v tomto organismu podjednotka α společná pro ACC a propionyl-CoA karboxylasu [29].

Čtvrtá forma ACC může existovat u archeí, kde je ACC podjednotkový enzym s podjednotkami BC, BCCP a CT (obr. 1.2). Na rozdíl od *E. coli* a dalších bakterií je CT podjednotka archeí jediný protein (520 aa). Tím se podobá β podjednotce ACC ze *Streptomyces* i β podjednotce propionyl-CoA karboxylasy. Holoenzym ACC archeí by mohl mít stochiometrii (BC) (BCCP) (CT) [30].



Obr. 1.2. Organizace domén lidské ACC1, lidské ACC2, pšeničné plastidové ACC, kvasinkové ACC, ACC ze *Streptomyces coelicolor*, a podjednotek ACC archeí (*Metallosphaera sedula*) a *E. coli*. Fosforylační místa lidských enzymů jsou označené čárkami a hvězdičkami fialové barvy. Místa mutací zodpovědných za resistenci k herbicidům rostlinných ACC jsou označeny fialovými čárkami u pšeničné ACC. Upraveno podle [2].

ACC jsou mezi organismy vysoce konzervované, což potvrzuje důležitost jejich biologických funkcí. Například lidská ACC se shoduje ve 37 % aminokyselinové sekvence s BC podjednotkou ACC z *E. coli* a v 63 % s BC doménou ACC z kvasinek. BC podjednotka z *E. coli* a archaeí (*Metallosphaera sedula*) se shodují v 76 %. CT domény eukaryotických ACC se shodují v nejméně 45 % aminokyselinové sekvence a lidská ACC1 a ACC2 vykazují 76% sekvenční identitu. V porovnání s BC doménou je množství konzervovaných sekvencí mezi CT podjednotkami *E. coli* a CT doménami eukaryotických ACC mnohem nižší. To může být způsobeno rozdílným evolučním tlakem na BC a CT enzymy. Také je možné že CT struktura je méně citlivá ke změnám v aminokyselinové sekvenci [2].

Konzervované sekvence BCCP proteinu jsou omezené převážně na C-terminální biotinylovanou doménu, která obsahuje biotinylační místo v konzervovaném (Ala/Val)-Met-Lys-(Met/Leu) motivu [4, 8].

ACC patří do malé rodiny biotin-dependentních karboxylas. BCCP je u *E. coli* jediným biotinylovaným proteinem a ACC jediným biotin-dependentním enzymem [4, 5]. U rostlin bylo dosud nalezeno pět proteinů obsahujících biotin [8]. Lidé mají kromě ACC jen tři další enzymy této rodiny: propionyl-CoA karboxylasu, 3-methylkrotonyl-CoA karboxylasu a pyruvát karboxylasu.

1.1.3. Biologická role ACC

ACC katalyzuje produkci malonyl-CoA a tento produkt může být využit v různých biologických procesech. Nejdůležitější role ACC je při biosyntéze mastných kyselin s dlouhým řetězcem. ACC katalyzuje první a limitní krok biosyntézy mastných kyselin a je proto u mnoha organismů esenciálním enzymem [1, 2, 4-7].

1.1.3.1 ACC u lidí a dalších savců

U lidí a dalších savců existují dvě isoformy ACC: ACC1 a ACC2. ACC1 je exprimována v cytoplasmě lipogenních tkání (játra, tuková tkáň, mléčné žlázy a další) a katalyzuje první a limitující krok biosyntézy mastných kyselin s dlouhým řetězcem [1, 28, 31]. Malonyl-CoA produkovaný v těchto tkáních je používán jako stavební jednotka k prodlužování rostoucího řetězce mastných kyselin o dva uhlíky v procesu syntézy mastných kyselin [1]. Mastné kyseliny s dlouhým řetězcem potom mohou být inkorporovány do triacylglycerolů a fosfolipidů.

Naproti tomu ACC2 je exprimována hlavně v srdečním a kosterním svalstvu a je transportována do mitochondrií, kde její produkt malonyl-CoA působí jako silný inhibitor

oxidace mastných kyselin v těchto tkáních [28]. Acyl-CoA s dlouhým řetězcem nemohou projít mitochondriální membránou a aby mohly být transportovány do mitochondrií, kde probíhá β -oxidace, musí být převedeny na acylkarnitiny [32-35]. Tuto konversi katalyzuje karnitin palmitoyltransferasa I. ACC2 reguluje oxidaci mastných kyselin tak, že její produkt malonyl-CoA je silným inhibítozem karnitin palmitoyltransferasy I.

ACC se zdá být vhodným cílem pro působení léčiv, což plyne z pozorování ACC2-deficientních myší [13]. U těchto zvířat byla drasticky snížena hladina malonyl-CoA v srdečním a kosterním svalstvu. Jako důsledek nedostatku malonyl-CoA probíhá u ACC2^{-/-} myší neustálá oxidace mastných kyselin (fatty acids, FA) a tyto myši mají redukované množství tuku a tělesnou hmotnost přestože konzumují více potravy (hyperfagie). Jsou také chráněné proti diabetu a obezitě způsobenými dietou s vysokým obsahem tuků/sacharidů [36]. Tato pozorování naznačují že inhibitory ACC2 by mohly být využity k léčbě obezity, diabetu a metabolického syndromu [37, 38]. Tyto sloučeniny by mohly být aktivní i u ACC1.

Aktivity ACC mohou hrát důležitou roli při tvorbě myelinu [39, 40] a v mozku [41]. Malonyl-CoA by mohl sloužit jako signál sytosti, což by částečně vysvětlovalo hyperfagii ACC2^{-/-} myší.

1.1.3.2. ACC u rostlin

U rostlin je pro biosyntézu FA s dlouhým řetězcem kritická chloroplastová ACC [7, 8, 42]. Rostliny nemohou transportovat FA s dlouhým řetězcem na dlouhou vzdálenost takže tyto sloučeniny musí být syntetizovány lokálně [7]. Plastidová ACC většiny rostlin se skládá ze čtyř různých podjednotek které jsou svou aminokyselinovou sekvencí homologní s podjednotkami bakteriálních ACC [4, 5, 7, 8, 42]. Je zajímavé, že β podjednotka CT je kódována plastidovým genomem, zatímco ostatní tři podjednotky jsou kódovány jaderným genomem.

V ostrém kontrastu s většinou rostlin obsahují plastidy trav multidoménovou ACC, podobnou živočišným ACC. Tato jedinečná plastidová ACC trav je klíčovým faktorem citlivosti těchto rostlin k herbicidům (jak bude popsáno později v kapitole inhibitory) [5, 7-9].

Cytosol rostlin obsahuje multidoménovou ACC, která je zde potřeba k prodlužování FA s velmi dlouhým řetězcem a k syntéze sekundárních metabolitů jako jsou flavonoidy [7, 8]. U huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) je cytosolická ACC nezbytná pro správný embryonální vývoj [43-45]. Několik různých bodových mutací (zodpovědných za záměnu aminokyseliny) v tomto genu může ovlivnit vývojový proces. Jedna z mutací v BC doméně se nachází v aktivním

místě a předpokládá se že narušuje katalýzu. Tři mutace v CT doméně jsou daleko od aktivního místa a mechanismus jejich působení není znám.

Charakterizována byla také mitochondriální forma multidoménové ACC v ječmeni [46] a rýži [47].

1.1.3.3. ACC u dalších organismů

U kvasinek je delece ACC letální. Je zajímavé, že mutanty, postrádající komplex syntetizující FA (FAS), přežívají, pokud jsou do média dodány FA s dlouhým řetězcem [7]. Naproti tomu mutanty, postrádající ACC, se zastaví v G2/M fázi buněčného cyklu, ačkoli jsou FA s dlouhým řetězcem obsaženy v médiu [48]. Zdá se, že ACC má kromě syntézy FA s dlouhým řetězcem ještě další esenciální roli. Tou by mohla být biosyntéza FA s velmi dlouhým řetězcem, které tvoří složky sfingolipidů a ceramidů a jsou pro přežití nezbytné. ACC by také mohla působit společně s nukleoporiny při regulaci hromadění GTPasy v jádře. Kvasinky obsahují ještě druhou isoformu ACC, známou jako HFA1. Je to mitochondriální enzym a je klíčový pro biosyntézu FA a hlavně kyseliny lipoové v této organelle [49].

U *Streptomyces coelicolor* je produkt malonyl-CoA použit k biosyntéze FA a polyketidů [29]. Mnoho polyketidových přírodních produktů patří mezi farmaceuticky důležitá antibiotika, protinádorová léčiva a další léčiva [50].

Organismy archaeí neobsahují FA ve svých lipidech a ACC aktivitu by mohly využívat k fixaci CO₂ [30].

1.1.4. Regulace exprese genu kódujícího ACC

V mnoha bakteriích jsou geny pro BC a BCCP v operonu, kde se BCCP gen nachází na jeho 5'konci [4]. V *E. coli* je exprese tohoto operonu autoregulována BCCP [51]. Regulace genové exprese ACC bakterií a rostlin, složených z několika podjednotek, má ještě další úroveň komplexity. Pro zajištění stechiometrie holoenzymu je exprese čtyř podjednotek enzymu zřejmě regulována, i když mechanismus této regulace není znám. Situace je ještě složitější u rostlin, kde je β podjednotka CT kódována plastidovým genomem. Nicméně se zdá, že hladiny mRNA čtyř podjednotek jsou udržovány v konstantním poměru [8].

Expres kvasinkového genu pro ACC je stimulována lipidovými prekursory jako jsou inositol a cholin, což odpovídá úloze tohoto enzymu v syntéze FA s velmi dlouhým řetězcem a sfingolipidů [48]. V pšenici je tkáňově specifická exprese genu pro plastidovou a cytosolovou

ACC řízená dvěma promotory [52], které umožňují alternativní sestřih blízko 5'konce těchto genů [53].

Gen pro lidskou ACC1 se nachází na chromosomu 17q12, gen pro lidskou ACC2 na chromosomu 12q23. Transkripce savčích genů pro ACC1 a ACC2 probíhá z násobných promotorů [31]. To může vést k alternativnímu sestřihu na 5'konci [54] a modifikaci N-terminálních sekvencí proteinů ACC [31]. Obzvláště transkripty vycházející z posledního promotoru, známého jako P III, mohou kódovat izozym ACC1s mnohem kratším N-terminálním segmentem, který postrádá fosforylační místo rozpoznávané AMP-aktivovanou protein kinasou (AMPK)[54]. Tento ACC1 izozym nemůže být regulován AMPK a může být konstitutivně aktivní [31]. Podobně lidská ACC2 má také alternativní kratší transkript, kde kódovaný protein postrádá jedinečný segment, jehož význam je pravděpodobně v nasměrování proteinu k mitochondriální membráně [31]. Existence izoenzymů ACC1 a ACC2 umožňuje další flexibilitu v regulaci těchto enzymů v různých tkáních a při odpovědích na různé podmínky v buňkách.

Expres ACC genů je řízena několika transkripčními faktory, včetně "sterol regulatory element binding proteins" (SREBP1a a SREBP1c) a "carbo-hydrate response element binding protein" [55-57]. SREBP1c je regulován insulinem na úrovni transkripce a dieta s vysokým obsahem sacharidů může indukovat expresi SREBP1c, kdy insulin funguje jako signál pro aktivaci. Polynenasycené FA mohou snižovat expresi ACC a SREBP1 [58]. "Carbo-hydrate response element binding protein" může být indukován dietou s vysokým obsahem sacharidů a aktivuje expresi lipogenních enzymů jako ACC a FAS nezávisle na aktivaci insulinem [59]. V aktivaci exprese ACC a FAS glukosou by mohla hrát roli také biosyntetická dráha hexosaminu [60].

Transkripční koaktivátory "peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1", PGC-1 α a PGC-1 β , mohou zesílit účinek transkripčních faktorů a jaderných receptorů [61]. PGC-1 β může koaktivovat expresi SREBP1a a SREBP1c a má zásadní roli v lipogenezi indukované dietou s vysokým obsahem tuků [62].

1.1.5. Regulace enzymové aktivity ACC

Živočišné ACC podléhají jak regulaci předcházejícím krokem (feedforward) tak regulaci zpětnou vazbou (feedback). Alosterickým aktivátorem savčí ACC s regulací předcházejícím krokem je citrát, prekursor acetyl-CoA substrátu ACC. Naproti tomu acyl-CoA s dlouhým řetězcem, koncový produkt biosyntetické dráhy mastných kyselin, je silným zpětnovazebným inhibítorem savčí ACC [1, 2, 28, 38]. Důležitým zdrojem cytoplasmatického citrátu je pyruvát,

produkovaný glykolýzou a dalšími reakcemi. Pyruvát je v mitochondriích přeměňován na acetyl-CoA, který pak reaguje s oxalacetátem za vzniku citrátu v reakci katalyzované citrátsyntázou z cyklu trikarboxylových kyselin. V cytoplasmě je citrát přeměňován zpět na acetyl-CoA enzymem ATP-citrát lyasa. Proto může být citrát považován také za transportní formu acetyl-CoA z mitochondrie do cytoplasmy.

Aktivní forma živočišné ACC je velký lineární polymer s molekulovou hmotností okolo 8 milionů Da [1, 2]. Tento polymer je tvořen až 10-20 protomery, které jsou dimery enzymu ACC. Citrát a acyl-CoA s dlouhým řetězcem regulují enzymovou aktivitu ACC částečně ovlivňováním rovnováhy tohoto polymerizačního procesu. Citrát podporuje polymerizaci ACC což vede k aktivaci enzymu (K_a citrátu pro ACC1 a ACC2 je přibližně 2 mM) [28], i když tato aktivace může předcházet polymerizačnímu procesu. Z předchozího popisu vyplývá, že by citrát by mohl způsobit aktivační konformační změny protomeru [63]. Kromě citrátu mohou polymerizaci podporovat i další anionty, včetně isocitrátu, malonátu, sulfátu a fosfátu.

Na rozdíl od citrátu je acyl-CoA s dlouhým řetězcem pevně vázán s ACC, s K_i v nanomolárních hodnotách, a podporuje disociaci polymeru na protomery.

Kromě regulace citrátem a acyl-CoA s dlouhým řetězcem jsou živočišné ACC regulovány také kovalentní modifikací, konkrétně fosforylací několika kritických serinových zbytků [28]. Obě isoformy ACC mohou být za fyziologických podmínek fosforylovány kinásou AMPK, což významně inhibuje jejich aktivitu snížením V_{max} a snížením jejich citlivosti k aktivaci citrátem. Fosforylace AMPK kinásou také zvyšuje inhibiční účinek palmitoyl-CoA [64]. Místa fosforylace AMPK jsou Ser79, Ser1200, Ser1215 u ACC1 a Ser218 u ACC2. Ser79 u ACC1 a odpovídající Ser218 u ACC2 jsou umístěny přesně před BC doménou a jejich fosforylace stačí k inhibici aktivity obou forem ACC. ACC2 totiž postrádá fosforylační místa odpovídající Ser1200 a Ser1215 u ACC1. Kromě AMPK mohou být ACC1 a ACC2 fosforylovány také protein kinásou A na Ser77 a Ser1200 u ACC1, i když fyziologický význam této kovalentní modifikace nebyl ještě objasněn [28, 31].

AMPK je hlavní metabolický spínač který je aktivován jako odpověď na různé stresové signály a zátěž [65-69]. AMPK může být aktivována také různými adipokiny jako jsou leptin a adiponektin [18, 66, 70-73]. Aktivovaná AMPK reguluje fosforylací katalytickou aktivitu velkého počtu enzymů a buněčných procesů, což nakonec vede k inhibici drah spotřebovávajících ATP (jako biosyntéza FA) a aktivaci drah produkujících ATP (jako oxidace FA). AMPK je tudíž přirozeným inhibítoem obou isoform savčí ACC.

ACC z *E. coli* a kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* nejsou regulované citrátem ani acyl-CoA s dlouhým řetězcem [2]. ACC z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je aktivována citrátem, i když citrát nemá vliv na stav oligomerizace homotetrameru tohoto enzymu [1]. ACC z *E. coli* je inhibována "acyl carrier" proteiny, které jsou přímými produkty komplexu syntetizujícího FA [4].

1.1.6. ACC jako cíl účinku léčiv

U lidí hrají ACC1 a ACC2 hlavní roli v biosyntéze a oxidaci FA, čímž se stávají atraktivními cíli pro objevování nových léčiv proti obezitě, cukrovce a dalším projevům metabolického syndromu [37, 38]. Lidské isoformy ACC1 a ACC2 jsou si podobné v téměř celé délce jejich aminokyselinové sekvence (asi 2400 aa). ACC2 obsahuje navíc N-terminální sekvenci směřující tuto formu enzymu do mitochondrie [27]. Zde syntéza malonyl-CoA, katalyzovaná ACC2, vede k potlačení transportu FA do mitochondrie systémem zahrnujícím karnitin palmitoyltransferasu 1 (CPT1): malonyl-CoA inhibuje CPT1. ACC2 je exprimována hlavně ve svalech. Delece genu pro ACC2 u myši vede ke kontinuální oxidaci FA a ovlivňuje citlivost k insulinu, což napovídá tomu, že ACC2 je vhodným terčem pro léčiva určená k léčbě obezity [13-16]. Naproti tomu ACC1 je esenciálním enzymem zodpovědným za biosyntézu FA v lipogenních tkáních (játra a adipocyty). Delece genu pro ACC1 je embryo-letální a má výrazný vliv na metabolismus lipidů v játrech a tukové tkáni [10-12]. Navíc v mnoha nádorech dochází k up-regulaci lipogeneze, což zvyšuje poptávku po malonyl-CoA produkovaném ACC [74]. Zdá se, že malonyl-CoA hraje roli v hypotalamickém vnímání energie, metabolické rovnováhy a kontroly přijímání potravy [75]. Hladina malonyl-CoA je kontrolována také přímo malonyl-CoA dekarboxylasou [76]. Pro vývoj nových léčiv proti obezitě je třeba získat sloučeninu, která by specificky inhibovala ACC. Protože lidské ACC1 a ACC2 vytváří dvě oddělené zásobárny (pools) malonyl-CoA s dramaticky odlišnými funkcemi, je nejvíce žádoucí získání isozym-specifických inhibitorů tohoto enzymu.

Zatím je známo jen velice málo účinných nízkomolekulárních inhibitorů savčích ACC. O několika sloučeninách bylo nedávno publikováno, že inhibují obě isoformy savčí ACC [77].

Sloučenina kyseliny benzoové, pokud je v játrech přeměněna na její ester-CoA, je inhibitorem 5-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reduktasy ($K_i = 18$ mM) a ACC ($K_i = 70$ mM) [78]. Tato sloučenina snižuje v krvi potkanů hladinu cholesterolu a triglyceridů. Dalším inhibitorem ACC je ester-CoA ω -hydroxy-alkandikarboxylové kyseliny [79]. U zvířecích modelů

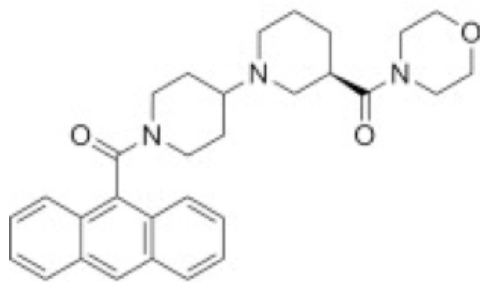
snižovala tato sloučenina hladinu triglyceridů a FA v séru, hladinu glukosy po hladovění a hladinu insulinu, a také tělesnou hmotnost.

Za účelem inhibice ACC byly dále vyvinuty analogy FA s dlouhým řetězcem [37]. Tyto sloučeniny jsou převedeny na své estery a inhibují enzymy díky své podobnosti s palmitoyl-CoA. Spojením biotinu a substrátů-CoA vznikl dvousubstrátový analog inhibující ACC [80]. Chloroacetylovaný biotin inhibuje živočišnou ACC a snižuje hromadění tuků [81].

Sloučenina CP-640186 (obr. 1.3) má IC_{50} hodnoty okolo 50 nM vůči ACC1 a ACC2 z potkana, myši a opice. U testovaných zvířat tato látka snižovala hladinu malonyl-CoA ve tkáních, inhibovala biosyntézu FA a stimulovala oxidaci FA, avšak co je nejdůležitější, snižovala množství tuku a tělesnou hmotnost a zlepšovala citlivost k insulinu [37]. Tato pozorování naznačují, že by ACC inhibitory mohly sloužit k léčbě metabolického syndromu.

Hlavní cestou k dosažení dobrého klinického výsledku je pravděpodobně stimulace oxidace FA. Proto by měl klinický kandidát účinně inhibovat ACC2. CP-640786 působí neselektivně na obě formy ACC [37].

Žádná léčiva inhibující lidskou ACC založená na zmíněných ani jiných sloučeninách nebyla ještě vyvinuta.



Obr. 1.3 Struktura CP-640186, (3R)-1'-(9-anthrylkarbonyl)-3-(morpholin-4-ylkarbonyl)-1,4'-bipiperidin

1.1.7. ACC jako cíl účinku herbicidů

U rostlin je ACC osvědčeným terčem účinku různých látek. Dvě skupiny chemicky podobných molekul, aryloxyfenoxypropionáty (APPs) a cyklohexandiony (CHDs) selektivně inhibují homomerní chloroplastovou ACC trav, což vede k jejich celosvětovému využívání jako herbicidů potlačujících růst travních plevelů. APPs a CHDs jsou reversibilní, vzájemně neslučitelné inhibitory CT reakce [82]. Heteromerní chloroplastové ACC nejsou citlivé k APPs a CHDs [83]. Tato necitlivost je pravděpodobně způsobena podstatně odlišnou strukturou

heteromerní ACC. Překvapením je, že homomerní cytosolické ACC jsou řádově méně citlivé než poměrně podobné homomerní chloroplastové ACC z čeledi *Poaceae* [84-87]. Obilné plodiny, jako je pšenice, jsou k těmto herbicidům resistantní přesto, že jejich plastidová ACC je citlivá. Tyto rostliny jsou schopné herbicidy rychle metabolizovat, čímž je inaktivují. Ukazují tak další mechanismus získání resistance k herbicidům na úrovni celé rostliny [88, 89]. Byla nalezena nová látka skupiny CHDs, která inhibuje plastidovou ACC rýže aniž poškozuje rýžovou rostlinu [90].

Molekulární podstata rozdílů v citlivosti vůči APPs a CHDs ještě objasněna nebyla. K rozpoznání determinant citlivosti k herbicidům inhibujícím ACC by mohly pomoci mutanty travin, jejichž mutace jsou zodpovědné za pozměněnou citlivost cílového enzymu. APPs a CHDs byly asi před třiceti lety zavedeny do celosvětového zemědělství a od té doby byly hojně využívány proti celé škále travinných plevelů. Důsledkem toho je, že již bylo nahlášeno 42 druhů rostlin resistantních k herbicidům inhibujícím ACC a změna v ACC se stává široce rozšířeným mechanismem resistance (International Survey of Herbicide Resistant Weeds; domovská stránka na www.weedscience.com). Jeden z nejlépe prostudovaných plevelů je psárka polní (*Alopecurus myosuroides* [Huds.]), hlavní travinný plevel zimní úrody v Evropě. Analýza mutantů psárky polní s resistantní ACC odhalila, že Ile-1781-Leu substituce uděluje resistenci proti některým, ale ne všem, APPs a CHDs a Ile-2041-Asn substituce uděluje resistenci proti APPs ale ne proti CHDs [91-93]. Obě substituce se nachází v CT doméně chloroplastové ACC. Podobné výsledky byly získány z mutovaných rostlin travinných plevelů jílku tuhého (*Lolium rigidum* (Gaud.)), béru zeleného (*Setaria viridis* (L. Beauv.)) a ovsa jalového (*Avena fatua* (L.)) pro Ile-na-Leu substituci [92, 94-96] a z *L. rigidum* pro Ile-na-Asn substituci [93].

1.2. Pšenice z hlediska evoluce

1.2.1. Evoluce pšeničných genomů

Předpokládá se že všichni zástupci rodu *Triticeae*, včetně pšenice, ječmene a žita, se vyvinuli ze společného předka. Mezi ně patří i polyploidní druhy pšenice jako tetraploidní pšenice naduřelá *Triticum turgidum* a hexaploidní pšenice setá *Triticum aestivum*, které vznikly procesy mezidruhové hybridizace mezi oddělenými předky pšenice následované spontánním zdvojením chromosomů. Tyto polyploidie obsahují celé genomy dvou nebo tří druhů

v homozygotním stavu. Hlavní genomy pšenice a jejích příbuzných, pojmenovaných A, B, D, G, S atd., mají základní chromosomové číslo 7 a jsou jeden s druhým homologní (odráží zbylou homologii původně úplně homologních chromosomů). Rod *Triticeae* představuje zajímavý případ protože zahrnuje druhy různé ploidie pro které jsou známy některé klíčové evoluční kroky [23].

S 620 miliony tun vyprodukovaných ročně na celém světě zajišťuje pšenice asi jednu pětinu kalorií konzumovaných lidmi [97]. Zhruba 95 % pšeničné úrody představuje běžná pšenice *Triticum aestivum* používaná pro děláání chleba, sušenek a těst, zatímco zbývajících 5 % je tvrdá pšenice *T. durum* používaná k výrobě těstovin. Pšenice jednozrnka (*Triticum monococcum*) a pšenice dvouzrnka (*T. dicoccum*) a další pluchaté pšenice jsou dnes reliktní plodiny malého ekonomického významu [97, 98].

Pšenice jednozrnka je diploidní druh, zatímco tvrdá a běžná pšenice jsou polyploidní druhy, které vznikly mezidruhovou hybridizací dvou a tří různých diploidních druhů. Úspěšnost těchto domestikovaných polyploidních druhů jde ruku v ruce s úspěšností přirozených polyploidních druhů, které představují více než 70 % rostlinných druhů [99] a mají sklon k většímu geografickému rozšíření než jejich blízcí diploidní příbuzní [97].

Genetická příbuzenství mezi divokými a domestikovanými pšenicemi jednozrnky a dvouzrnky naznačují, že místem domestikace je nejspíše oblast na západ od Diyarbakiru v jihovýchodním Turecku [100-102]. Rozmach zemědělství v této oblasti vedl k rozšíření domestikované pšenice jednozrnky (*T. monococcum*, genomy AmAm) a domestikované pšenice dvouzrnky (*T. turgidum* subspecies (ssp.) *dicoccon*, genomy BBAA) přes Asii, Evropu a Afriku. Jihozápadní rozšíření pěstování domestikované dvouzrnky mělo za následek její společný výskyt s jižní subpopulací divoké dvouzrnky (*T. turgidum* ssp. *dicocoides*, genomy BBAA). Výsledkem výměny genů mezi populacemi severní domestikované a jižní divoké dvouzrnky nebo dvouzrnky domestikované v jižní oblasti bylo vytvoření centra diversity domestikované dvouzrnky v jižním Levantu. Následkem toho bylo rozdělení domestikované dvouzrnky na severní a jižní subpopulace a u druhé z nich došlo ke zvýšení genové diversity [100]. Rozšiřování kultivace domestikované dvouzrnky na severovýchod vedlo ke společnému výskytu s mnohoštětem *Aegilops tauschii* (genomy DD) a ke vzniku běžné hexaploidní pšenice *T. aestivum* (genomy AABBDD) v pásu táhnoucím se od Arménie k jihozápadnímu pobřeží Kaspického moře [103].

Genetické změny zodpovědné za soubor znaků odlišujících domestikované rostliny od jejich divokých předků jsou nazývány domestikační syndrom [97]. U pšenice, jako u dalších

obilnin, je hlavní složkou tohoto syndromu zpevnění klasu, které zabraňuje uvolňování zrn větrem a usnadňuje sklizeň. Další složkou domestikačního syndromu je ztráta pevné pluchy, čímž se z pluchaté pšenice stala pšenice nahá. Další znaky sdílené domestikovanými druhy pšenice jsou větší velikost zrna, nižší počet odnoží, vzpřímenější růst a omezení dormance obilek.

Velká většina polyploidních rostlin, včetně pšenice, vznikla hybridizací mezi různými druhy (allopolyploidie). Allopolyploidii se v jednom organismu setkávají genomy dříve přizpůsobené odlišným prostředím. Tak se vytváří potenciál pro adaptaci nového allopolyploidního druhu na širší škálu podmínek prostředí. To je zřejmý případ hexaploidní pšenice, která slučuje D genom z *Ae. tauschii* s AB genomy z tetraploidní pšenice. Ve srovnání s tetraploidní pšenicí má hexaploidní *T. aestivum* lepší přizpůsobivost k různým fotoperiodám, vyšší toleranci k solím, nízkému pH, hliníku a mrazu, lepší odolnost vůči některým škůdcům a chorobám a rozšířený potenciál k výrobě různých potravinových produktů. To ale neznamená že exprese genů v allopolyploidu je souhrnem exprese genů jeho diploidních předků. U mnoha uměle vytvořených allopolyploidů byla popsána neaditivní exprese genů [99, 104]. Rychlé a nahodilé procesy genových expresí [105] zajišťují další zdroj genetických variací, které mohou být důležité v úspěšné adaptaci nových allopolyploidů.

Polyploidie má ale také své stinné stránky. Vznik polyploidního druhu je doprovázen efektem úzkého hrdla láhve (bottleneck) [97], kdy malý počet rostlin, podílejících se na vzniku nového polyploidního druhu, omezuje počáteční genovou diversitu. Protože se vzniku *T. aestivum* účastnilo pouze několik genomů *Aegilops tauschii* [106], předpokládá se, že jeho D genom bude omezený.

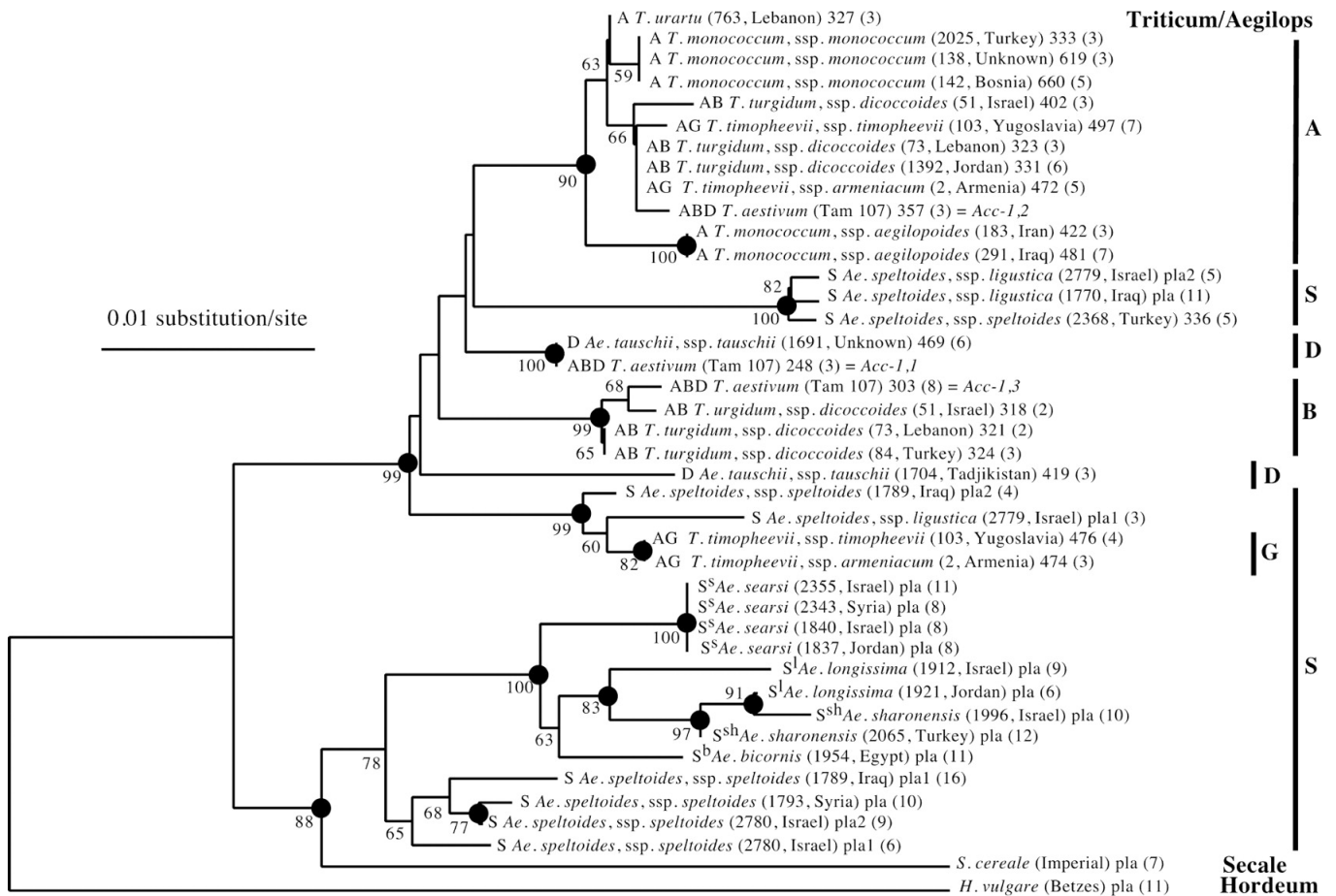
1.2.2 Pšeničná ACC

V pšenici se nacházejí také dvě isoformy ACC. Plastidová ACC kódovaná genem ACC1 katalyzuje první krok biosyntézy FA přeměněním acetyl-CoA na malonyl-CoA, který je pak použit k připojení dvouuhlíkatých fragmentů k rostoucímu řetězci FA. V cytoplasmě ACC kódovaná genem ACC2 produkuje malonyl-CoA pro sekundární metabolismus zahrnující i prodlužování FA s dlouhým řetězcem. Gen kódující plastidovou ACC u trav, která nahradila vícepodjednotkový enzym bakteriálního původu vyskytující se u dvouděložných rostlin, vznikl duplikací genu kódujícího multidoménovou cytosolickou ACC [107]. Jedna kopie genu předka

získala signální sekvenci směřující protein do plastidu (plastid-targeting signal) [52, 107], nový promotor a nové regulační elementy [52, 53]. Pšeničné ACC1 a ACC2 geny nevykazují podobnost sekvencí vně exonů kódujících funkční enzym. Pro obě ACC1 a ACC2 jsou všechny tři homology *T. aestivum* transkripčně aktivní a každý využívá dva promotory a alternativní sestřih prvního intronu k produkci transkriptů s různou orgánovou specifitou. Každý z homologů přispívá stejně k celkovému množství mRNA každého typu transkriptu [52, 53].

Analýzou genomové sekvence bylo prokázáno, že v každém z homologních genomů hexaploidní pšenice *T. aestivum* je přítomna jedna kopie aktivního ACC genu [23, 24, 107-110]. Testováním příbuzných druhů pšenice [23, 24, 107] byly nalezeny dvě kopie ACC1 genu v diploidním mnohoštětu *Aegilops speltoides*. Topologie fylogenetického stromu podle ACC1 (obr. 1.4) naznačuje, že gen byl minimálně jednou duplikován před rozdělením genomů *Aegilops* a *Triticum* a v každé linii pak došlo ke ztrátě jiné kopie genu. Geny pro ACC1 se nacházejí na krátkém rameni pšeničných chromozómů skupiny 2. Gen pro ACC2 byl během evoluce rodu *Triticeae* také nejméně dvakrát duplikován, s následnou specifickou ztrátou genu v různých liniích [23]. V některých testovaných druzích rodu *Triticeae* byl nalezen částečně zpracovaný pseudogen [107]. Geny pro ACC2 se nacházejí na dlouhém rameni chromozómů skupiny 3 [23, 108].

Pro svou značnou velikost a dostupnost informací o jejich funkci, představují pšeničné geny, kódující ACC, skvělý počáteční bod pro srovnávací analýzu genomu. Transkribovaná část genu pro ACC1 v pšenici je dlouhá 13,5 kb s 6,9 kb kódující sekvence (2311 aa včetně peptidu zodpovědného pravděpodobně za přenos do chloroplastu) a obsahuje 33 intronů s celkovou délkou 6,3 kb. Transkribovaná část genu pro ACC2 je dlouhá 12,3 kb s 6,8 kb kódující sekvence (2258 nebo 2260 aa) a obsahuje 29 intronů s celkovou délkou 4,4 kb.

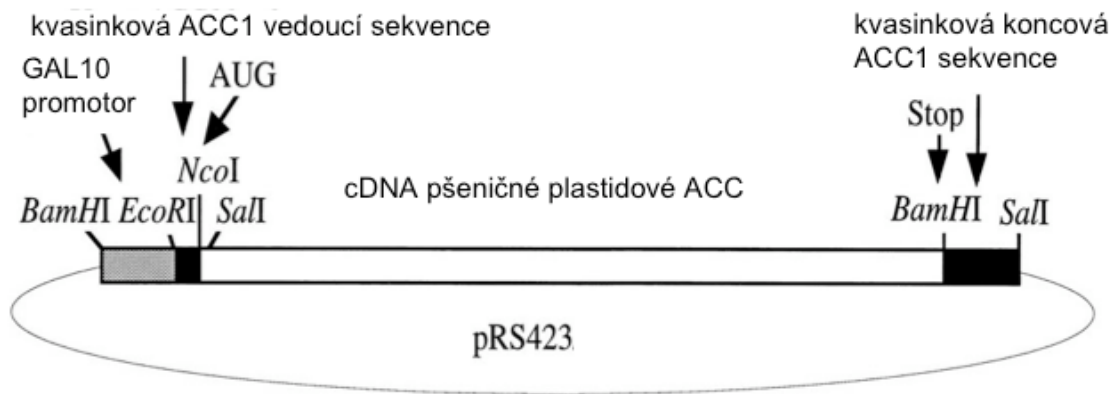


Obr. 1.4 Fylogenetický strom skupiny *Triticeae/Aegilops* založený na intronových sekvencích genu ACC1 vypočítaný metodou neighbor-joining. Názvy taxonů obsahují skladbu genomu (*Triticeae/Aegilops*), druhové jméno, přístupové číslo/název kultivaru, geografický původ (*Triticeae/Aegilops*), jméno sekvence, číslo a počet analyzovaných klonů. Přístupová čísla druhu jsou stejná jako ve sbírce Wheat Genetic Resource Center (Kansas State University). Upraveno podle [24].

1.3. Systém s kvasinkovými kmeny s nahrazenými geny (GR systém)

V kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* je ACC kódována genem ACC1 a zajišťuje malonyl-CoA jak pro biosyntézu FA, tak pro jejich následnou elongaci. Produkt téhož genu je potřebný pro zajištění malonyl-CoA pro biosyntézu FA s velmi dlouhým řetězcem potřebných v jaderném obalu. Jedinou esenciální rolí ACC1 v kvasinkách je tedy produkce malonyl-CoA [111].

Kvasinky jsou diploidní organismy a při přerušení jedné alely ACC1 mohou dále růst, neboť exprese genu ACC1 je zajišťována z druhé alely tohoto genu. Pokud ale dojde ke sporulaci buňky s přerušenou alelou ACC1, vzniknou z každé buňky namísto čtyř životaschopných spor pouze dvě (ty které obsahují neporušenou alelu ACC). Buňky ze spor s přerušenou alelou ACC se rozdělí jen několikrát a potom hynou. Pokud je ale nedostatek jejich ACC dodán z jiného zdroje, mohou se dále množit. V kvasinkovém GR systému je nulová mutace ACC1 komplementována cizí ACC exprimovanou z vysoko-kopiového plasmidu řady pRS. V plasmidu pRS je cizí komplementující gen vložen za kvasinkový promotor GAL10 a kvasinkovou ACC1 vedoucí sekvenci, k němu je připojen kvasinkový 3'-konec (obr. 1.5). Silný promotor GAL10 umožňuje vysokou hladinu a regulovatelnost exprese ACC. Vedoucí a koncová sekvence z kvasinkové ACC1 byly fúzovány s cizím genem pro zajištění správné interpretace transkripčních a translačních signálů a stability mRNA [86].



Obr. 1.5 Struktura kvasinkového expresního plasmidu pRS423, kódujícího pšeničnou plastidovou ACC. Podle [86].

Plazmidem pRS423 s vloženým genem pro cizí ACC jsou transformovány kvasinkové buňky *Saccharomyces cerevisiae* kmene W303D-ACC1^{ΔLEU2} (MATa/α, ura3, his3, trp1, ade1, acc1). Tento kmen vznikl z laboratorního kmene W303d (MATa/α, ura3, leu2, his3, trp1, ade1) vložením kazety s genem LEU2 do kódující sekvence genu ACC1. Proto kmen W303D-ACC1^{ΔLEU2} na rozdíl od kmene W303D může syntetizovat leucin ale nese pouze jednu funkční alelu pro ACC1. Po sporulaci je možné testovat komplementaci cizí ACC kódované plazmidem v haploidních buňkách obsahujících pouze mutovanou alelu kvasinkové ACC1. A haploidní kmeny s úspěšnou komplementací mohou být použity k testování inhibitorů ACC [86].

S pomocí kvasinkového GR systému se již podařilo exprimovat ACC pšenice [112] a *Toxoplasma gondii* [113] v jejich aktivní konformaci v *S. cerevisiae*. Vysoký stupeň aktivity v transgenních kvasinkových kmenech naznačuje, že cizí apoprotein je účinně modifikován kvasinkovou apoprotein-biotin ligázou. Každý izozym nebo forma ACC může být analyzována *in vivo* (v příslušném kvasinkovém kmenu) a *in vitro* (extrakty z kvasinek) a purifikována pro biochemické a strukturní studie. Silný promotor GAL10 a vysoko-kopiové plasmidy řady pRS umožňují vysokou hladinu a regulovatelnost exprese. Při nízkých koncentracích galaktosy se ACC stává limitující pro růst, což zvyšuje citlivost transgenní kvasinky k inhibitorům specifickým pro ACC. Při plné indukci je možné získat dostatek aktivní ACC pro biochemické a strukturní studie.

2. Cíle práce

Cílem první části disertační práce bylo potvrzení spojitosti mutací Cys-1999, Cys-2027, Asn-2041, Gly-2078 a Ala-2096 v plastidové formě ACC s resistencí vůči aryloxyfenoxypionátovým (APP) a cyklohexandionovým (CHD) herbicidům. Tyto mutace byly s pomocí sekvenování a specifické PCR metody nalezeny v rostlinách *Avena sterilis* ssp. *ludoviciana* Durieu resistantních vůči používaným herbicidům (APP) a (CHD). Naším úkolem bylo ověřit, zda tyto jednotlivé mutace způsobí resistenci i u pšeničné ACC. Konkrétně to znamenalo:

1. Připravit konstrukty nesoucí v kvasinkovém kyvadlovém vektoru pRS423 pšeničnou chimérní ACC nesoucí jednu z pěti mutací: Cys-1999, Cys-2027, Asn-2041, Gly-2078 a Ala-2096.
2. Testovat komplementaci kvasinkové ACC1 nulové mutace chimérní ACC nesoucí jednu z pěti mutací. Testovat citlivost komplementujících kvasinkových kmenů k herbicidům fenoxaprop-P-ethylu, haloxyfopu a sethoxydimu.

Druhá část práce měla za cíl analýzu sekvence lokusů pšeničné ACC1 a ACC2, kódujících plastidovou a cytosolovou formu enzymu ACC za účelem prohloubení znalostí evoluce těchto genů a původu tří genomů v moderní hexaploidní pšenici. K tomu bylo potřeba:

1. Isolovat klony BAC DNA obsahující homology A genů ACC1 a ACC2 z *T. urartu* a *T. aestivum*, homology B genů ACC1 a ACC2 z *T. turgidum* a *T. aestivum* a homology D genů ACC1 a ACC2 z *Ae. tauschii* a *T. aestivum*.
2. Sekvenovat vybrané klony BAC DNA.
3. Porovnat získané sekvence mezi sebou a s dalšími známými sekvencemi genu ACC a odhadnout doby oddělení linií předků hexaploidní pšenice.

Cílem poslední části práce bylo vyvinout systém pro rychlé vyhledávání nových specifických inhibitorů lidské ACC2. K tomu jsme se rozhodli použít kvasinkový GR systém. Pro dosažení našeho cíle bylo třeba:

1. Připravit konstrukty nesoucí v kvasinkovém kyvadlovém vektoru pRS423 cDNA lidské ACC1 a ACC2 a chimérní gen složený ze sekvencí kódujících pšeničnou cytosolickou ACC a lidskou ACC2.

2. Testovat komplementaci kvasinkové ACC1 nulové mutace ACC kódovanou v připravených konstruktech. Optimalizovat podmínky pro vysokokapacitní testování potenciálních inhibitorů lidské ACC.
3. Testovat tři knihovny chemických látek s cílem najít potenciální inhibitory lidských ACC.

3. Materiál a metody

Použitý materiál je uveden v přílohách 1,2 a 3.

K dosažení výsledků jsme použili metody:

Isolace BAC DNA, příprava knihovny fragmentů BAC DNA a její sekvenování, a analýza sekvencí: BAC DNA byla izolována pomocí Large-Construct Kit (Qiagen), poté byla fragmentována pomocí Hydroshear Instrument (GeneMachines). Fragменты dlouhé 1,5–3 kb byly po elektroforese purifikovány z agarozového gelu a klonovány do vektoru pSMART (Lucigen) nebo pIK96 (Stanford Human Genome Center). Všechny fragmenty byly sekvenovány z jednoho konce a potom byly na základě částečného poskládání sekvencí vybrány klony pro sekvenování z druhého konce. Mezery byly doplněny sekvenováním vybraných klonů se specifickými primery nebo sekvenováním produktů PCR získaných s použitím primerů nasedajících na konce subkontigů. Sekvenční kontigy byly poskládány a editovány v programu Sequencher (Gene Codes). Struktura intronů/exonů genů ACC byla určena na základě publikovaných informací [108-110]. DNA sekvence byly porovnávány v programu Clustal X 1.83.1 [114] a, kde to bylo nezbytné, dále editovány pomocí MacClade 4.08 (Sinauer Associates). Frekvence substitucí mezi párovanými nukleotidy byly po manuálním uspořádání sekvencí vypočítány s použitím programu Microsoft Excel, všechny mezery byly z porovnání vyloučeny. Pro výpočty jsme použili okno velikosti 1 kb pohybující se po 1 bp. Všechny nesynonymní pozice z porovnání více sekvencí byly z výpočtu vyloučeny. Tyto výsledky byly použity pouze k určení rozložení synonymních sekvencí uvnitř sekvence genu. Frekvence synonymních substitucí byly vypočítány metodou Nei–Gojobori s korekcí Jukes-Cantora pro vícečetné substituce, jak je to provedeno v MEGA [115]. Všechny pozice s mezerami byly z těchto výpočtů vyřazeny. Doby oddělení genů ACC byly vypočítány pomocí frekvence synonymních substitucí, kdy jsme při kalibraci molekulárních hodin vycházeli z doby oddělení *Pooideae* a *Panicoideae* před 60 miliony let, a z frekvencí intronových substitucí, kdy jsme při kalibraci molekulárních hodin vycházeli z doby oddělení pšenice a ječmene před 11,6 miliony let. Odchyly frekvence substitucí spojené s analýzou souboru dat (mnohočetné porovnání) a od nich odvozené doby oddělení byly vyhodnoceny metodou bootstrap (5000 opakování) jak je to provedeno v MEGA. Zdroje dalších kódujících sekvencí genu ACC jsou uvedeny v příloze 3 (doplňující informace).

Systém s kvasinkovými kmeny s nahrazenými geny (GR systém) – princip je popsán v kapitole literární úvod (1.3.). **Příprava konstruktů** pšeničné ACC s aminokyselinovými

substitucemi je popsána v příloze 1. **Příprava konstruktů** pro vysokokapacitní GR systém s lidskými ACC1 a ACC2 a chimérami pšeničné cytosolové ACC2/lidské ACC2 je popsána v příloze 3 (doplňující informace).

Připravenými konstrukty byly **transformovány** buňky *Saccharomyces cerevisiae* kmene W303D-ACC1^{ΔLEU2} (MATa/α, ura3, his3, trp1, ade1, acc1) s použitím EZ kitu (Zymo Research, Orange, CA) podle pokynů výrobce. Transformované buňky byly selektovány na miskách s minimálním médiem (0,17% kvasinková dusíkatá báze, 0,5% sulfát amonný, 2% D- glukosa, adenin sulfát (10mg/l), uracil (20mg/l), leucin (200mg/l), tryptofan (50mg/l) a ampicilin (50mg/l)). **Sporulace** byla indukována v SPII médiu (2% acetát draselný, adenin sulfát (7,5mg/l), uracil (7,5mg/l), leucin (7,5mg/l), tryptofan (7,5mg/l) a ampicilin (50mg/l)) 2-3 dny ve 30°C. Sporulující buňky byly suspendovány v 50μl zásobního roztoku zymolázy T100 (ICN)(50μg/ml v 1M sorbitolu) a suspenze byla inkubována při 30°C přibližně 5 minut. Když se začala rozvolňovat stěna asků, byly zkumavky přeneseny na led a bylo k nim přidáno 150 μl sterilní vody. Z každého z přibližně 20-30 vybraných asků byly s pomocí mikroskopu s mikrojehlou rozmístěny 4 spory na misce s YPRG médiem (1% bacto-yeast extract, 2% pepton-trypton, 2% rafinosa, 2% galaktosa, 0,1% adenin sulfát, ampicillin (50mg/l), 1,5% agar) pro tetrádovou analýzu. Přítomnost komplemetujícího genu byla ověřena růstem na selekčních médiích a závislostí růstu na galaktose.

Testování růstu a inhibice kmenů s pšeničnou ACC s aminokyselinovými substitucemi bylo prováděno měřením optické density při 600 nm. Jedna jednotka OD odpovídá hustotě přibližně $1,3 \times 10^7$ buněk na mililitr. Experimenty byly prováděny v 3ml kulturách ve zkumavkách nebo 0,2ml kulturách v 96-jamkových destičkách, v YPRG médiu, při 23°C nebo 30°C. Inhibitory byly přidávány ze 100x koncentrovaného zásobního roztoku v DMSO. Do kontrolního média pro měření růstu kvasinek bez inhibitorů bylo přidáváno 1% DMSO.

Testování účinku inhibitorů vysokokapacitním systémem je popsáno v příloze 3 (doplňující informace).

V příloze 3 (doplňující informace) je uveden i postup **isolace proteinu** pro testování aktivity *in vitro*. **Testování aktivity** bylo prováděno s použitím radioaktivního NaH¹⁴CO₃ (příloha 3, doplňující informace).

4. Výsledky a diskuse

Předkládaná disertační práce je koncipována jako komentovaný soubor publikací s původními výsledky, jejichž společným tématem je acetyl-CoA karboxylasa (ACC). ACC je důležitým enzymem metabolismu lipidů. Je také proto vhodným cílem pro působení inhibitorů – ať již dlouho používaných herbicidů inhibujících plastidovou ACC travinných plevelů (kterým se věnuji v kapitole 4.1) nebo potenciálních léčiv proti obezitě inhibujících lidskou mitochondriální formu ACC (které jsou studovány v kapitole 4.3). Geny kódující multidoménovou ACC jsou navíc pro svoji velikost vhodné jako výchozí bod pro komparativní genomovou analýzu, obzvláště u pšenice, která má obě formy ACC multidoménové a jejíž intergenové sekvence podléhají velmi častým změnám. Této tematice se věnuje kapitola 4.2.

4.1 Mutace plastidové ACC a resistance vůči herbicidům

4.1.1 Mutace Trp-1999-Cys, Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn a Asp-2078-Gly a Gly-2096-Ala a resistance vůči herbicidům

Cílem této části práce bylo ověřit spojitost mutací Trp-1999-Cys, Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn, Asp-2078-Gly a Gly-2096-Ala v plastidové ACC s resistencí travinného plevelu ovsu jalového (*Avena sterilis* ssp. *ludoviciana* Durieu) k aryloxyfenoxypropionátovým (APP) a cyklohexandionovým (CHD) herbicidům.

APP a CHD herbicidy jsou často používány k selektivní redukci travinných plevelů. Mnoho z těchto plevelů se však stalo vůči používaným herbicidům resistantní [116]. Sekvenováním genomové DNA a cDNA a metodou PCR bylo v CT doméně ACC z rostlin *A. sterilis* ssp. *ludoviciana* resistantních k herbicidům odhaleno pět substitucí aminokyselin: Trp-1999-Cys, Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn, Asp-2078-Gly a Gly-2096-Ala. Každá z 279 rostlin v devíti populacích nesla pouze jednu z pěti mutací spojených s resistencí. Tyto zmutované aminokyselinové zbytky nebyly nalezeny na odpovídajících místech ACC žádných citlivých druhů travin. Navíc čtyři z těchto mutací, Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn a Asp-2078-Gly a Gly-2096-Ala, byly nalezeny v dalších plevelných travinných druzích resistantních k inhibitorům ACC [91-96, 116, 117], hlavně v psárce polní (*Alopecurus myosuroides*). Mutace Trp-1999-Cys ještě nebyla u žádného rostlinného druhu v souvislosti s resistencí k herbicidům popsána.

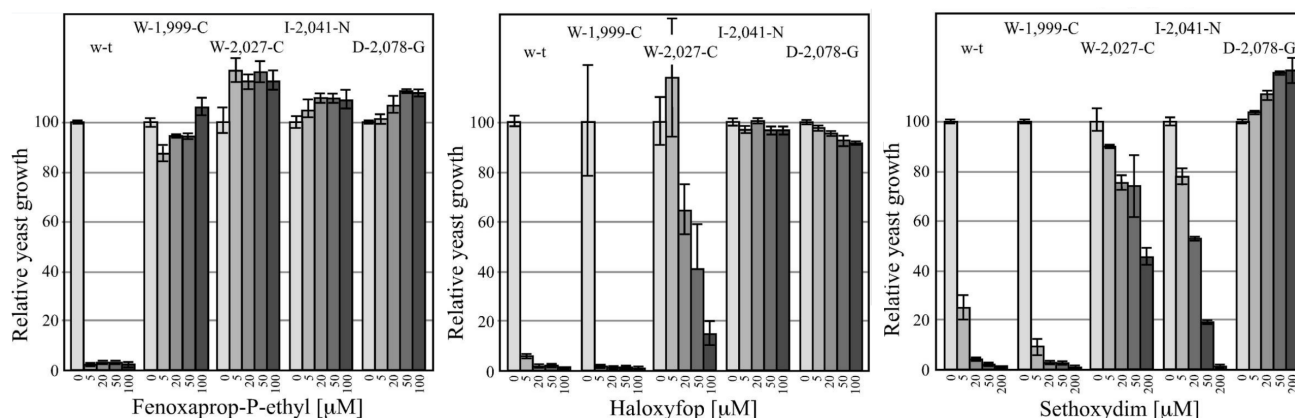
Sekvenční porovnání alel Cys-1999, Asn-2041 a Gly-2078 se třemi homology ACC1 z *A. fatua* ukázalo, že mutaci udělující resistenci k herbicidům může nést kterýkoli ze tří homologů hexaploidní *A. sterilis ssp. ludoviciana*. Proto je šance k získání mutované alely vyšší u hexaploidních trav než u diploidních. Křížením rostlin obsahujících různé resistenční alely a získáním potomstva s resistenčními mutacemi na každém z homologních chromosomů by se mohl zkoumat vliv množství mutovaných genů na míru resistance v polyploidních druzích plevelů. Zajímavé je, že jedna populace (Shk) obsahovala nejméně tři různé mutace vedoucí k resistenci, ale žádná jednotlivá rostlina neobsahovala více než jednu mutaci. Je možné, že vícečetné mutace jsou spojené se snížením fitness.

4.1.2 Ověření vlivu mutací pomocí (GR) systému

K ověření vlivu zmíněných mutací na resistenci vůči herbicidům jsme použili kvasinkové GR kmeny exprimující chimérickou ACC. Chimérická ACC se skládala z N-terminální části pšeničné cytosolové ACC a C-terminální části pšeničné plastidové ACC zahrnující celé vazebné místo herbicidů.

Získali jsme čtyři kvasinkové GR kmeny, jejichž růst závisel na chimérické pšeničné ACC nesoucí jednu z mutací: Trp-1999-Cys, Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn a Asp-2078-Gly, a testovali jsme jejich odolnost vůči herbicidům.

Naše pokusy užívající kvasinkové GR kmeny potvrzují výsledky fenotypových a sekvenčních analýz: jediná změna aminokyseliny Asp-2078-Gly uděluje silnou resistenci k herbicidům typu APPs i CHDs; Trp-2027-Cys a Ile-2041-Asn uděluje silnou resistenci k APPs (a slabou resistenci k CHDs) a Trp-1999-Cys uděluje silnou resistenci pouze k jednomu z testovaných APP herbicidů, fenoxapropu (obr. 4.1). Tyto aminokyselinové substituce jsou spojené s resistencí rostlin jako *A. sterilis*, *A. myosuroides* a *L. rigidum*. Působí také ve strukturním kontextu pšeničné plastidové ACC, což naznačuje, že takovéto mutované alely se zaměněnou jedinou aminokyselinou mohou být snadno selektovány v dalších travních plevelech vystavených ošetřování herbicidy.



Obr. 4.1 Reakce kvasinkových GR kmenů, závislých svým růstem na chimérní pšeničné ACC nesoucí bodové mutace, na fenoxaprop-P-ethyl, haloxyfop a sethoxydim. Kontrolní (citlivý) kmen s chimérní pšeničnou ACC (bez mutace) je označen w-t.

Co se týče úspěšnosti komplementace kvasinkové nulové mutace pšeničnou ACC nesoucí jednotlivé mutace, rostly kvasinkové kmeny s chimérními ACC nesoucími mutace Trp-2027-Cys, Ile-2041-Asn a Asp-2078-Gly stejně dobře jako kmen bez mutací. Chimérní ACC s mutací Gly-2096-Ala nekomplementuje kvasinkovou ACC1 nulovou mutaci, pravděpodobně z důvodu nedostatku enzymové aktivity potřebné k udržení růstu kvasinek. GR kmen s mutací Trp-1999-Cys v ACC rostl podstatně pomaleji (s dvakrát delší dobou zdvojení), což naznačuje, že tato mutace má významný vliv na aktivitu enzymu. Přestane-li působit selekční tlak, může takto snížená aktivita způsobit významné snížení fitness svého nositele ovlivňující jeho přetrvání v divokých populacích. Dopad na hexaploidní rostliny by nemusel být tak závažný. Snížení enzymové aktivity bylo navrženo u ACC s mutacemi Trp-2027-Cys a Asp-2078-Gly, ale ne s mutacemi Ile-2041-Asn a Gly-2096-Ala [93, 116]. Samotná přítomnost aminokyselinového zbytku Ala v pozici 2096 by neměla mít zásadní vliv na aktivitu enzymu obecně, protože kvasinková ACC divokého typu má na odpovídajícím místě Ala a je plně funkční. Nedostatečná komplementace ACC s mutací Gly-2096-Ala musí být způsobena specifickým problémem ve strukturním kontextu pšeničné plastidové ACC.

4.1.3 Význam detekce mutací

Naše pokusy s kvasinkovými GR kmeny potvrdily spojitost mutací, detekovaných pomocí PCR testů a sekvenování, s resistencí rostlin k herbicidům. Bylo ověřeno, že tyto molekulární

metody (PCR a sekvenování) je možné používat k detekci resistance u rostlin. Uvedený způsob detekce je rychlý, na rozdíl od testů v květináčích, které jsou pracné a časově a prostorově náročné. Spolehlivé, rychlé a jednoduché detekce resistance k herbicidům jsou potřebné pro farmáře, aby mohli včas zavést alternativní strategie používání herbicidů a zabránili tak dalšímu rozšiřování resistantního plevele. Avšak pouze fenotypové analýzy mohou identifikovat jedince, jejichž mechanismus resistance ještě nebyl charakterizován na molekulární úrovni.

Podrobnější informace jsou uvedeny v příloze 1.

4.2 Homologické lokusy ACC a evoluce pšeničných genomů

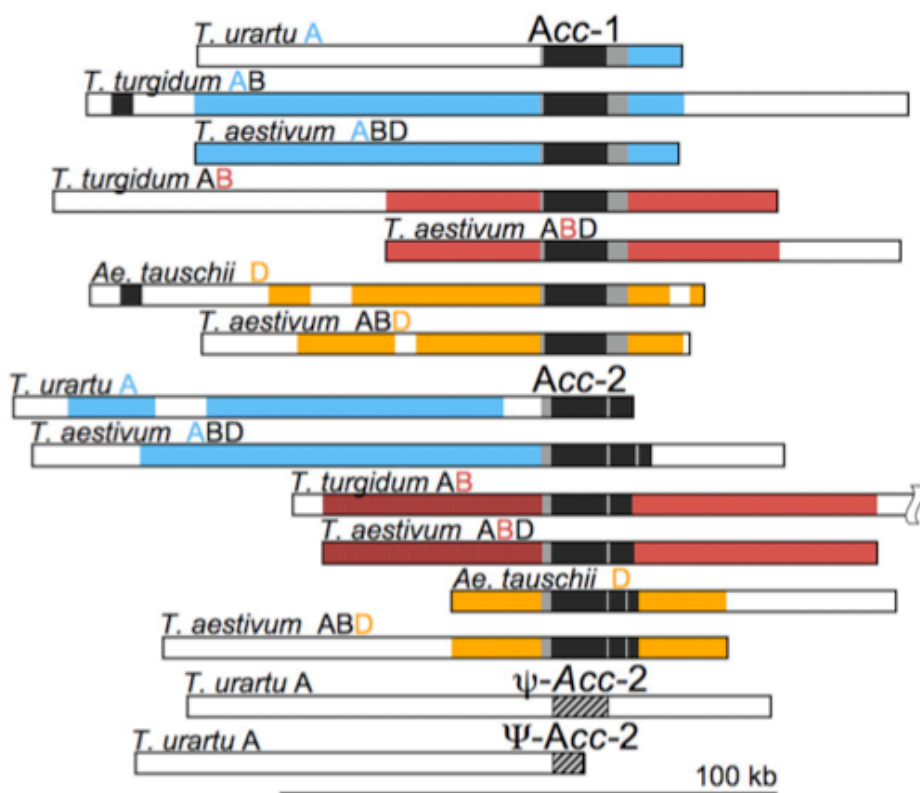
4.2.1 Evoluční historie pšenice

V této části práce jsme se soustředili na studium evoluce rodů pšenice (*Triticum*) a mnohoštetu (*Aegilops*), jednak pro důležitost pšenice jako hlavní zemědělské plodiny, jednak pro složitost její evoluční historie: od oddělení diploidních předků pšenice, přes dva kroky polyploidizace, domestikaci a dlouhodobé šlechtění. U pšenice je většina aktivních genů značně rozptýlená mezi dlouhými, rychle se měnícími intergenovými oblastmi, které sestávají hlavně z repetitivních sekvencí. Kromě mutací podléhají aktivní geny častým duplikacím a delecím a také konverzím a nepravidelným překřížením (crossing-over) mezi paralogy což vede k hybridním genům. Tyto procesy jsou specifické pro rody, genomy a počet genů [118-120].

Na základě archeologických artefaktů bylo odhadnuto, že hexaploidní genom pšenice seté (*T. aestivum*), ABD, vznikl před 10000 lety [125]. Podle metody molekulárních hodin došlo k oddělení pšeničných předků *Triticum urartu* (A genom), mnohoštetu *Aegilops tauschii* (D genom) a mnohoštetu *Aegilops speltoides* (S genom, předek B genomu) před 2– 4 miliony let a ke vzniku tetraploidní pšenice naduřelé (*Triticum turgidum*, AB genom) před 0.5 milionem let [22, 24]. Na základě analýzy genů *Sut1* a *PhyC* byla navržena časnější oddělení předků A, B a D genomů [21]. Všechny tyto odhady mohou nést chybu spojenou s datováním fosilií, které bylo použito k určení oddělení hlavních podčeledí trav.

4.2.2 Analýza sekvence pšeničných lokusů ACC1 a ACC2

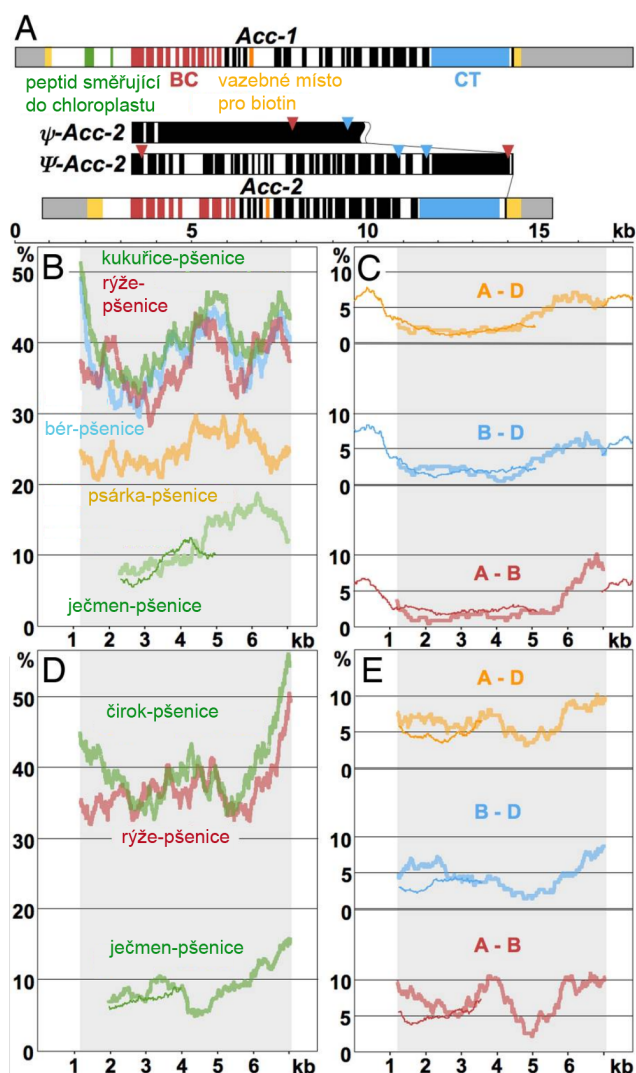
Pro porozumění evoluce genů ACC1 a ACC2 a původu tří genomů moderní hexaploidní pšenice jsme se pokusili analyzovat sekvence pšeničných lokusů ACC1 a ACC2, kódujících plastidovou a cytosolovou formu enzymu ACC. Sekvenovali jsme lokusy ACC1 a ACC2 z *Triticum urartu* (A genom), *Aegilops tauschii* (D genom), *Triticum turgidum* (AB genom) a *Triticum aestivum* (ABD genom) a také dva ACC2 pseudogeny z *T. urartu*.



Obr. 4.2 Sekvenované lokusy ACC. Kódující sekvence genů pro ACC a konservovaných genů nacházejících se před (upstream) ACC1 a bezprostředně za (downstream) ACC2 jsou znázorněny černě. Pseudogeny jsou označeny černými šikmými pruhy. Lokusy ACC1 a ACC2 vykazují podobnost pouze mezi kódujícími sekvencemi exonů. Oblasti po stranách kódující sekvence Acc označené šedě obsahují sekvence konservované mezi A, B a D homology. Podobnost sekvencí mezi homology je znázorněna barevně. Tmavší barva úseku před (upstream) genem ACC2 B označuje nižší míru identity než u úseku downstream. Bíle jsou označeny části postrádající sekvenční podobnost orthologů.

Na základě dříve publikovaných informací o sekvencích [23, 24, 107] jsme vybrali, izolovali a sekvenovali BAC DNA všech zmíněných homologů (obr. 4.2) kromě homologu A

ACC2 z *T. turgidum*. Všechny tři ACC2 BAC klony izolované z knihovny *T. turgidum* obsahovaly pouze homolog B. Dále jsme našli BAC z *T. turgidum* a *T. urartu* obsahující ACC2 pseudogeny (Ψ -ACC2).

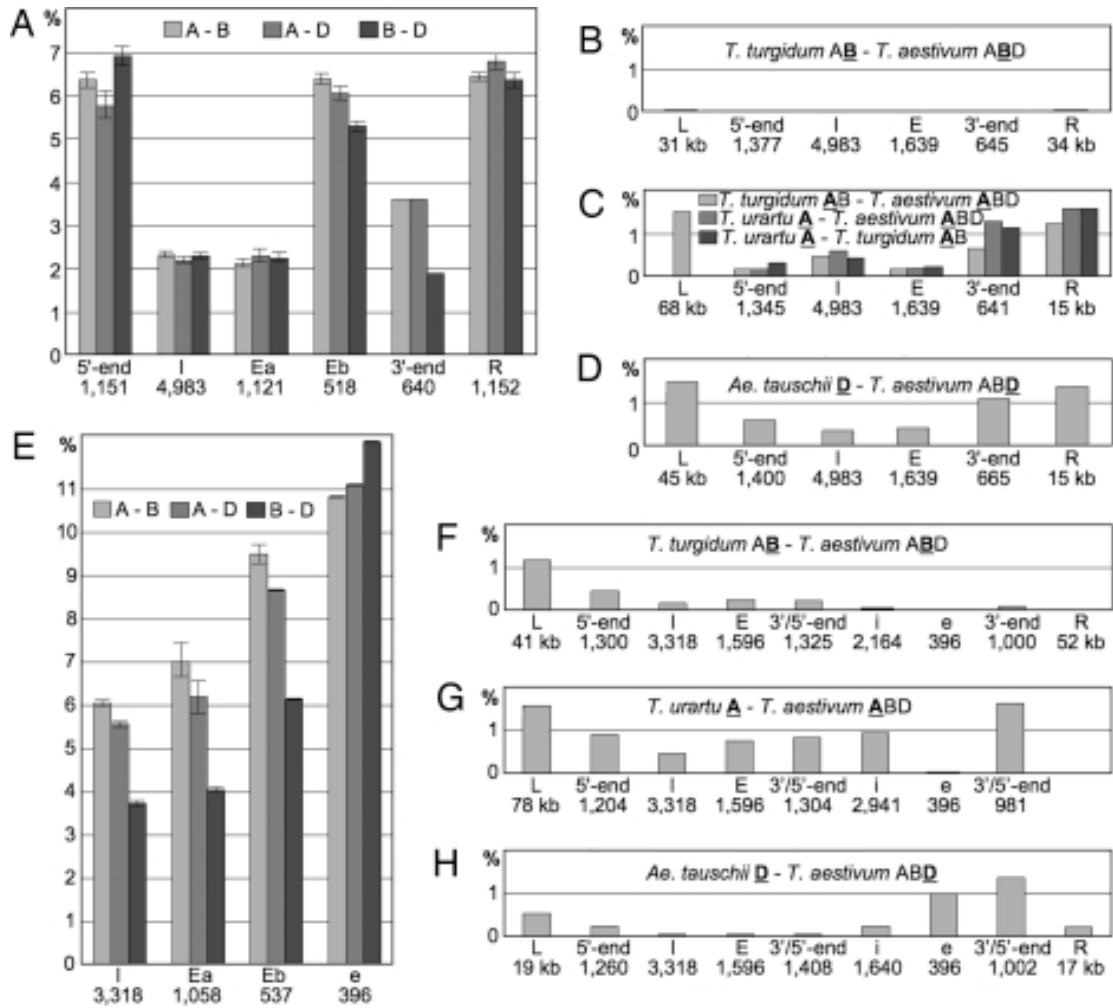


Obr. 4.3 Struktura ACC genů a porovnání dvojic (pairwise) sekvencí synonymních částí a intronů. (A) Exony kódující vysoce konservované BC a CT domény ACC jsou znázorněny ve stejných barvách. Introny jsou znázorněny bíle, 5'- a 3'-UTR žlutě. 5'- a 3'-konce genů znázorněné šedě obsahují části sekvence konservované mezi homology A, B a D ACC1 a ACC2 genů. Mezi geny ACC1 a ACC2 není žádná sekvenční podobnost vně kódujících exonů. Červené trojúhelníky označují polohu předčasných stop kodónů, modré trojúhelníky polohu posunů čtecího rámce. Schéma zobrazuje geny z *T. urartu*, ale struktura ACC genů ostatních druhů pšenice je velice podobná. (B-E) Porovnání sekvence genů ACC1 (B a C) a ACC2 (D a E) mezi synonymními místy (silná čára) a spojenými nekódujícími a intronovými místy (tenká čára). Procento odlišných nukleotidů bylo vypočítáno s použitím 1-kb okna posunovaného po 1 bp. První nukleotid prvního intronu v kódující oblasti (zvýrazněné šedě) je spojen s prvním nukleotidem iniciačního kodónu translace. Intronové a exonové sekvence nejsou seřazené přesně protože mají různé pozice a délky. Poslední intron byl spojen s 3'-koncem genu. 5'- a 3'- koncové sekvence genu ACC1 použité pro tato porovnání obsahovala pouze dlouhé konservované části. Z ječmene byla k dispozici pouze neúplná sekvence genů ACC.

Žádný ze sekvenovaných lokusů neobsahoval více než jeden gen ACC nebo pseudogen. Geny a pseudogeny ACC se nenacházejí v těsné blízkosti (na stejném BAC insertu), ale podle výsledků pokusů mapování chromosomů se nacházejí na stejném segmentu chromosomu [23]. Toto pozorování je v souladu i s různou lokalizací genů ACC1 a ACC2. Struktura genů ACC je ukázána na obr. 4.3 A. Na obr. 4.3 B-E je znázorněno rozložení synonymních a intronových substitucí v genech ACC a v sekvencích vně genů. Rozdíly mezi sekvencemi intronů neumožňují porovnání vzdálenějších příbuzných než na úrovni rodu *Triticeae* a odlišnost sekvencí ohraničujících geny umožňuje pouze porovnání mezi homology. Pro porovnání tří podčeledí čeledi lipnicovitých jsme použili sekvence ACC z psárky (*Alopecurus*, podčeleď *Pooideae*), rýže (podčeleď *Erhartoideae*) a kukuřice, čiroku (*Sorghum*) a béru (*Setaria*) (podčeleď *Panicoideae*).

Rozložení synonymních substitucí mezi těmito druhy se významně liší v různých částech kódující sekvence způsobem, který naznačuje souvislost s konservovaností sekvence na aminokyselinové úrovni: biotin karboxylasa (BC) a karboxyl transferasa (CT) jsou nejvíce konservované části ACC. Tato tendence je méně výrazná u ACC2 (obr. 4.3 D). Gen ACC2 nekóduje peptid pro transport do chloroplastu, který je méně konservovaný. Proto se konservovaná BC doména nachází velmi blízko 5- konce genu.

Pro získání kvantitativního popisu porovnání sekvencí a odhadu doby oddělení vývojových linií jsme v tabulce 4.1 uvedli vzdálenosti dvojic podle synonymních a intronových substitucí. Molekulární hodiny byly nastaveny podle oddělení *Pooideae* a *Panicoideae* před 60 miliony let. Molekulární hodiny pro introny, které mohou být spolehlivě porovnávány pouze na úrovni rodu a níže, byly kalibrovány s užitím doby oddělení pšenice a ječmene vypočítané podle synonymních substitucí v každém genu (tab. 4.1). Pro ACC1 geny byly vypočítány dvě vzdálenosti: jedna založená na celé délce a jedna založená na prvních dvou třetinách (segment Ea) kódující sekvence. Tyto dvě vzdálenosti jsou odlišné pro homology A, B a D a mezi pšenicí a ječmenem, ale jsou shodné (v rámci odchylky) pro všechny další dvojice sekvencí. Tento výsledek je v souladu se zvýšeným výskytem substitucí v poslední třetině kódující sekvence ACC1 (segment Eb) pozorovaným pouze na úrovni homologů a ovlivňujícím podstatně pouze vzdálenosti mezi dvojicemi A, B a D genů a v menší míře vzdálenosti mezi ječmenem a pšeničnými A, B a D sekvencemi. Tento jev se nezdá být obecnou vlastností genu ACC1. Sekvence segmentu Ea byla použita také k porovnání synonymních a intronových míst. Vzdálenosti intronů se velmi podobají vzdálenostem synonymních míst sousedních exonů (obr. 4.4). Doby oddělení vypočítané s použitím obou souborů dat jsou shodné (tab. 4.1).



Obr. 4.4 Frekvence nukleotidových substitucí v různých částech lokusů ACC1 (A-D) a ACC2 (E-H). Frekvence synonymních substitucí je ukázána pro tyto kódující sekvence: Ea – od iniciačního kodónu k začátku CT domény; Eb – od začátku CT domény ke stop kodónu; E – celá délka kódující sekvence. Intronové sekvence (I) obsahují všechny introny kromě prvního (vedoucího) intronu, který byl připojen ke konci 5'-koncevého segmentu, a posledního intronu, který byl připojen na začátek 3'-koncevého segmentu. 3'-/5'- konec označuje celou oblast mezi stop kodónem ACC2 a iniciačními kodóny genů nalezených hned za (downstream) ACC2 (obr. 4.2). i - intronové sekvence genu hned za (downstream) ACC2. e - exonové sekvence genu hned za (downstream) ACC2. V těchto porovnáních byly použity pouze dlouhé konservované části sekvence před (upstream) (L) a za (downstream) (R) kódující částí genu ACC1. Počet nukleotidů nebo počet synonymních míst v exonech je uveden pod označením segmentu. Vymezení chyby u A a E označují směrodatné odchytky všech vzdáleností mezi porovnávanými páry. Podtržené písmeno u genomového složení každého druhu označuje porovnávané lokusy homologů.

Tab. 4.1. Doby oddělení genomů travin založené na ACC genech

Dvojice genomů	Celá délka ACC		Ea fragment ACC		všechny introny kromě prvního a posledního	
	Počet substitucí na synonymní místo	Doba oddělení, miliony let	Počet substitucí na synonymní místo	Doba oddělení, miliony let	Počet substitucí na synonymní místo	Doba oddělení, miliony let
ACC1						
<i>Pooideae–Panicoideae</i>	0.576 ± 0.029	<u>60</u>	0.577 ± 0.036	60	n.d.	n.d.
rýže– <i>Panicoideae</i>	0.559 ± 0.028	<u>60</u>	0.556 ± 0.031	60	n.d.	n.d.
rýže– <i>Pooideae</i>	0.502 ± 0.023	52.2 ± 2.4	0.494 ± 0.030	51.4 ± 3.1	n.d.	n.d.
kukuřice– <i>Setaria</i>	0.261 ± 0.015	27.2 ± 1.5	0.251 ± 0.018	26.1 ± 1.8	n.d.	n.d.
pšenice– <i>Alopecurus</i>	0.299 ± 0.016	31.2 ± 1.7	0.292 ± 0.021	30.4 ± 2.2	n.d.	n.d.
pšenice– <i>Brachypodium</i>	0.312 ± 0.017	32.4 ± 1.8	0.316 ± 0.020	32.9 ± 2.1	n.d.	n.d.
pšenice–ječmen	0.125 ± 0.011 (157)	13.6 ± 1.2	0.107 ± 0.011 (84)	11.8 ± 1.8	0.092 ± 0.005 (317)	<u>11.8</u>
A–B	0.033 ± 0.004 (53)	3.5 ± 0.5	0.019 ± 0.004 (21)	2.0 ± 0.5	0.022 ± 0.002 (78)	2.8 ± 0.3
A–D	0.034 ± 0.005 (54)	3.5 ± 0.5	0.022 ± 0.005 (24)	2.3 ± 0.5	0.018 ± 0.002 (66)	2.3 ± 0.3
B–D	0.032 ± 0.004 (50)	3.3 ± 0.5	0.022 ± 0.005 (24)	2.3 ± 0.5	0.019 ± 0.003 (67)	2.4 ± 0.3
Ad–At	0.0019 ± 0.0010 (3)	0.20 ± 0.11	NU	NU	0.0044 ± 0.0011 (16)	0.56 ± 0.14
Ad–Ah	0.0012 ± 0.0012 (2)	0.12 ± 0.08	NU	NU	0.0061 ± 0.0013 (22)	0.78 ± 0.17
At–Ah	0.0019 ± 0.0010 (3)	0.20 ± 0.11	NU	NU	0.0044 ± 0.0012 (16)	0.56 ± 0.15
Bt–Bh	0.0000 ± 0.0000 (0)	0.00 ± 0.00	NU	NU	0.0000 ± 0.0000 (0)	0.00 ± 0.00
Dd–Dh	0.0037 ± 0.0017 (6)	0.39 ± 0.16	NU	NU	0.0038 ± 0.0011 (14)	0.49 ± 0.14
ACC2						
<i>Pooideae–Panicoideae</i>	0.578 ± 0.029	60	NU	NU	n.d.	n.d.
rýže– <i>Panicoideae</i>	0.570 ± 0.029	60	NU	NU	n.d.	n.d.
rýže– <i>Pooideae</i>	0.534 ± 0.028	55.4 ± 2.9	NU	NU	n.d.	n.d.
pšenice– <i>Brachypodium</i>	0.359 ± 0.017	37.3 ± 1.8	NU	NU	n.d.	n.d.
pšenice–ječmen	0.100 ± 0.009 (132)	10.6 ± 0.9	NU	NU	0.076 ± 0.005 (209)	<u>10.6</u>
A–B	0.084 ± 0.009 (126)	8.7 ± 0.9	NU	NU	0.055 ± 0.004 (153)	7.7 ± 0.6

Výsledky a diskuse

Dvojice genomů	Celá délka ACC		Ea fragment ACC		všechny introny kromě prvního a posledního	
	Počet substitucí na synonymní místo	Doba oddělení, miliony let	Počet substitucí na synonymní místo	Doba oddělení, miliony let	Počet substitucí na synonymní místo	Doba oddělení, miliony let
A-D	0.074 ± 0.007 (112)	7.7 ± 0.8	NU	NU	0.048 ± 0.004 (135)	6.7 ± 0.6
B-D	0.049 ± 0.006 (76)	5.1 ± 0.6	NU	NU	0.034 ± 0.004 (97)	4.8 ± 0.5
Ad-Ah	0.0076 ± 0.0022 (12)	0.79 ± 0.23	NU	NU	0.0052 ± 0.0014 (15)	0.73 ± 0.20
Bt-Bh	0.0025 ± 0.0012 (4)	0.26 ± 0.13	NU	NU	0.0017 ± 0.0008 (5)	0.24 ± 0.11
Dd-Dh	0.0006 ± 0.0006 (1)	0.06 ± 0.06	NU	NU	0.0007 ± 0.0005 (2)	0.10 ± 0.07

Molekulární hodiny byly kalibrovány podle oddělení *Pooideae* od *Panicoideae* před 60 miliony let. Molekulární hodiny pro sekvence intronů byly kalibrovány podle doby oddělení pšenice a ječmene vypočítané ze synonymních substitucí v každém genu. Ea fragment kóduje aminokyseliny 1-1498. Počet nukleotidových substitucí je uveden v závorkách. První intron (v 5'-UTR) a poslední intron (v CT doméně) byly z porovnání vyloučeny. Průměrný počet synonymních míst v porovnáních ACC1: 1610 (celá délka), 1100 (Ea segment), 1358 (část sekvence pro porovnání s ječmenem), 845 (částečná sekvence Ea segmentu pro porovnání s ječmenem). Průměrný počet synonymních míst v porovnáních ACC2: 1538 (celá délka), 1404 (část sekvence pro porovnání s ječmenem). Počet intronových míst v porovnání ACC1 a ACC2: 3651 a 2893. A, B a D označují homology diploidní (d) *T. urartu* nebo *Ae. tauschii*, tetraploidní (t) *T. turgidum* a hexaploidní (h) *T. aestivum*. Chyby uvedené u jednotlivých hodnot byly vypočítány metodou bootstrap. n.d. – není k dispozici; NU – není určeno.

4.2.3 Shrnutí výsledků provedených analýz

Naše analýzy ukazují odklon od neutrální evoluce u obou ACC lokusů; frekvence substitucí synonymních a intronových míst se mění podle místa v genech pro ACC (obr. 4.3) a v průměru jsou tyto frekvence nižší než frekvence substitucí vně kódující části genů (obr. 4.3 a 4.4). Význam těchto rozdílů lze obtížně posoudit, protože evoluce sekvencí nekódujících částí genů a intergenových sekvencí není ještě plně prostudována. Navíc porovnávání mezi homologními lokusy, což je jediná úroveň, na které mohou být intergenové sekvence porovnávány, může být ovlivněna variací haplotypů. Na druhou stranu frekvence substitucí synonymních a intronových míst ze stejné části genu jsou velmi podobné (obr. 4.3 a 4.4, tab. 4.1). Počet synonymních substitucí mezi homology je pro spolehlivý odhad příliš malý, dokonce i u genů tak velkých jako ACC. I tak jsou frekvence synonymních a intronových substitucí velmi podobné, až na A homology ACC1 (tab. 4.1 a obr. 4.4 C).

Promotorové oblasti genů pro ACC jsou velmi kompaktní (kratší než 1 kb). Je to zřejmé z porovnání sekvencí homologních genů. V případě A homologů ACC1 a ACC2 byly sekvence před (upstream) genem úplně vyměněny velkými indely (mutace zahrnující inserce a/nebo delece) v těsné blízkosti iniciačního kodónu (obr. 4.2). Pokud jsou porovnávány homology A, B a D, jsou zde přítomny velké bloky konservované sekvence na 5'- a 3'- koncích ACC1 i ACC2, ale pouze sekvence ACC1 mohou být použity k výpočtům frekvence mutací (obr. 2C a 3A). Pro geny ACC2 by takové porovnání vyžadovalo značné manuální úpravy porovnávaných sekvencí, což by přesahovalo naše časové a finanční možnosti. Frekvence substitucí na nekódujících 5'- a 3'- koncích ACC1 je průměrně 3,5krát vyšší než frekvence synonymních nebo intronových substitucí.

Porovnání intergenových sekvencí lokusů ACC bylo možné pouze pro homologní páry; mezi homology A, B a D není sekvenční podobnost vně sekvence genu (obr. 4.2). Porovnání genových a intergenových sekvencí představuje ještě další problém: intergenové frekvence se významně liší napříč lokusem, což pravděpodobně odráží kombinaci skladby DNA (aktivní geny, různé repetitivní sekvence, DNA metylace) a variace haplotypů. V sekvenovaných lokusech nejsou kromě ACC žádné nebo jen velmi málo předpokládaných genů (obr. 4.2). Průměrná frekvence substitucí v intergenových oblastech je 3,5krát vyšší než v intronech (obr. 4.4 C, D a G).

Předpokládáme-li, že frekvence substitucí v intronech genů pro ACC v *Triticeae* je $3,6 \cdot 10^{-9}$ substitucí na místo za rok (průměrná frekvence substitucí v intronech mezi ječmenem a pšenicí je 0,084 substitucí na synonymní místo, tab. 4.1, a doba oddělení je před 11,6 miliony let, obr. 4.5), je průměrná frekvence substitucí v intergenových oblastech (vypočítaná jako počet substitucí na místo za rok) $13 \cdot 10^{-9}$, podobně jak již bylo publikováno [121]. Je zřejmé, že frekvence nukleotidových substitucí ohraničujících intergenových oblastí neodpovídají přímo frekvencím synonymních a intronových substitucí.

Průměrná vzdálenost synonymních míst celé délky ACC1 je 0,58, 0,56 a 0,50 substitucí na synonymní místo, když jsou porovnány sekvence *Pooideae* a *Panicoideae*, rýže a *Panicoideae* a rýže a *Pooideae* (tab. 4.1). Podle porovnání sekvencí ACC2 jsou odpovídající vzdálenosti 0,58, 0,57 a 0,53 substitucí na synonymní místo. Tato čísla se velmi podobají námi vypočítaným průměrům z více genů, 0,59, 0,56 a 0,48 substitucí na synonymní místo a také vzdálenostem dříve určeným zkoumáním vícečetných genů kukuřice, rýže, čiroku a ječmene [118, 119]. Odpovídající multigenová průměrná frekvence substitucí (včetně genů ACC) je $4,8 \cdot 10^{-9}$ substitucí na synonymní místo za rok, předpokládáme-li, že se *Pooideae* (pšenice, ječmen) a

Ehrhartoideae (rýže) oddělily od *Panicoideae* (kukuřice, čirok) před 60 miliony let. Doba oddělení rýže od *Triticeae* před 50 miliony let odhadnutá ze sekvencí vícečetných genů (obr. 4.5) odpovídá převažujícímu názoru, že pšenice a rýže se od sebe oddělily až po jejich oddělení od kukuřice. Sekvence celých genů pro ACC byly také použity k odhadu doby oddělení *Avena* (*Alopecurus* – psárka) od *Triticeae* před 31 miliony let, *Brachipodieae* (*Brachipodium* – válečka) od *Triticeae* před 35 miliony let, a *Paniceae* (*Setaria* – bér) od *Andropogoneae* (kukuřice) před 27 miliony let (tab. 4.1). Doba oddělení *Brachypodium*–*Triticeae* je v rámci rozsahu předchozího odhadu z více genů (před 35-40 miliony let, [122]). *Setaria* a kukuřice se podle našich výpočtů oddělily dříve než před 24 miliony let, jak bylo vypočítáno z částečných sekvencí ACC1 z *Panicum virgatum* (proso prutnaté) a kukuřice [123]. Doba oddělení dvou kopií kukuřičného genu pro ACC1 před 16 miliony let a doba oddělení kukuřice a čiroku před 13 miliony let souhlasí s dříve navrženým vývojem evoluce těchto druhů včetně duplikace celého genomu (polyploidizace) kukuřice [120].

Ječmen je důležitá vzdálená skupina (outgroup) studia molekulární evoluce souboru *Triticum/Aegilops*. Použití doby oddělení pšenice a ječmene k nastavení molekulárních hodin pro datování následných událostí v evoluci pšenice může pomoci minimalizovat dopad variability frekvence substitucí v různých vzdáleně příbuzných liniích a mělo by zabránit problémům s kalibrací hodin pro jednotlivé geny způsobeným ztrátou různých kopií duplikovaných genů. Navíc intronové sekvence mohou být porovnávány s vysokou spolehlivostí a mohou být použity k evolučním analýzám druhů rodu *Triticeae*. Pro geny ACC dávají frekvence intronových a synonymních substitucí shodné odhady doby oddělení pokud jsou porovnávány sousední introny a exony, ale introny mají mnohem vyšší obsah informací (obr. 4.4 a tab. 4.1).

Vzdálenost mezi pšenicí a ječmenem vypočítaná pro synonymní místa ACC1 (Ea segment) je 0,107 substitucí na synonymní místo a pro ACC2 (celé délky) 0,100 substitucí na synonymní místo a odpovídající doby oddělení jsou před 11,8 a 10,6 miliony let (tab. 4.1). Tato čísla se velmi podobají průměrným multigenovým odhadům 0,114 substitucí na synonymní místo a doba oddělení před 11,6 miliony let (obr. 4.5). Odhady doby oddělení pšenice a ječmene kolísají mezi dobami před 6,7 a 16,2 miliony let, což odráží vlastnosti a evoluční historii jednotlivých genů.

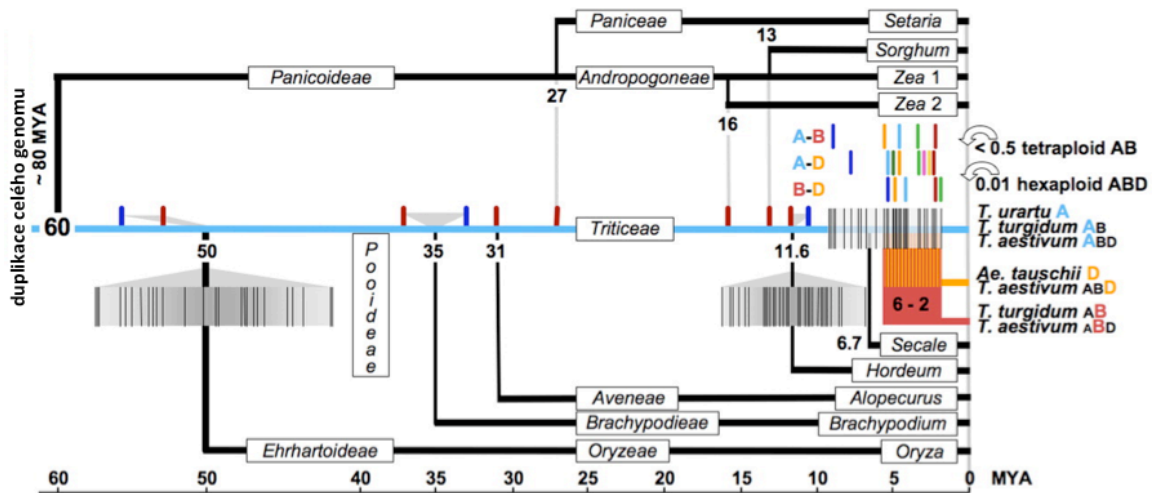
Použijeme-li hodnotu 11,6 milionů let pro dobu, před kterou se oddělila pšenice od ječmene, a dále kódující a intronové sekvence prvních dvou třetin genů ACC1, jsou vypočítané doby oddělení homologů A, B a D před 2,3 – 2,4 miliony let. To je v souladu s předchozími

odhady založenými na krátkých fragmentech genu s použitím dvou různých evolučních modelů [21, 24].

Analyzovali jsme skupinu genů, pro kterou jsou k dispozici homologní sekvence z ječmene, rýže, kukuřice a větší počet sekvencí z pšenice (obr. 4.5). Doby, před kterými se oddělily tyto druhy pšenice, vypočítané vzhledem k oddělení stejného genu ječmene, kolísají mezi 2 a 9 miliony let. Pouze několik z těchto genů bylo studováno v míře umožňující fylogenetickou analýzu. Doby oddělení těchto genů se pohybují v rozmezí před 2 až 6 miliony let, s výjimkou oddělení A-B a A-D homologů ACC2, kdy doby oddělení vycházejí na dobu před 9 a 8 miliony let. Odhady u spodní hranice rozsahu (před 2-3 miliony let) pravděpodobně ukazují přesněji dobu oddělení předků A, B a D genomů pšenice a jejich příbuzných. Vyšší odhady zachycují variaci haplotypů, duplikaci genů a specifickou ztrátu, včetně možnosti vytvoření chimérických genů nerovnoměrným překřížením (crossing-over) mezi duplikovanými geny.

Délka genů pro ACC nám umožnila identifikovat sekvenční rozdíly neznámého původu, které ovlivňují odhady dob rozdělení: zvýšená četnost synonymních substitucí v poslední třetině genu ACC1 a významná proměnlivost frekvence substitucí v sekvenci genu ACC2.

Skladba homolokusů ACC naznačuje významnou rozdílnost haplotypů, která v některých případech dosahuje nebo dokonce přesahuje 0,5 milionu let. Taková rozdílnost by mohla mít za následek významné nadsazení odhadu doby vzniku tetraploidní pšenice. Podle odhadů založených na ACC1 (tab. 4.1) vznikla tetraploidní pšenice před ne více než 0,5 milionem let. Tento odhad je v souladu s dříve publikovanými výsledky [22, 24]. Doba byla odvozena z porovnání homologu A ACC1 z *T. urartu* k *T. turgidum* a *T. aestivum* (průměr dvou synonymních a dvou intronových odhadů). Odhady založené na synonymních substitucích jsou vzhledem k velmi malé rozdílnosti sekvencí pouze přibližné. Odhad založený na intronových sekvencích, které nesou více informací, je vyšší: vznik tetraploidní pšenice se datuje před 0,7 miliony let.



Obr. 4.5 Časová přímka evoluce pšenice. Molekulární hodiny použité k výpočtu dob rozdělení byly kalibrovány s použitím doby oddělení *Pooideae* od *Panicoideae* před 60 miliony let a doby oddělení ječmene od pšenice před 11,6 miliony let. Druhý kalibrační bod byl použit pouze pro geny *Triticum* a *Aegilops*. Každá tenká černá svislá čára ve stínované oblasti označuje jeden odhad doby rozdělení rýže a pšenice, ječmene a pšenice a mezi geny *Triticum* a *Aegilops*. Barevné značky nad modrou linkou označují doby rozdělení odhadnuté podle genů ACC1 (červená) a ACC2 (modrá). Doby oddělení mezi homology A a B, A a D, B a D jsou znázorněny v řádcích označených písmeny. Tyto odhady jsou založené na genech ACC1 a ACC2, na genech *Pgk-1* (světle zelená), *PhyC* (oranžová), *Sut1* (světle modrá), Q (tmavě zelená) a 6GPDH (fialová) a na průměru ze čtyř genů publikovaném dříve (žlutá). Čísla označují odhady doby různých uzlů. Vyšší odhad pro vznik tetraploidní pšenice je založen na sekvenci ACC1. Doba vzniku genomu hexaploidní pšenice vychází z archeologických artefaktů.

4.2.4 Význam analýzy studovaných sekvencí

Studium evoluce pšenice budí zájem nejen proto, že se jedná o jednu z hlavních zemědělských plodin, ale i pro složitost její evoluční historie. Vzhledem k tomu, že intergenové sekvence u pšenice podléhají velmi častým změnám, je evoluce studována převážně na kódujících částech genů. Porovnáním velmi dlouhých sekvencí kódujících ACC1 a ACC2 jsme přispěli ke studiu evoluce pšenice seté a jejích příbuzných z čeledi lipnicovitých.

Podrobnější informace jsou uvedeny v příloze 2.

4.3 Rekombinantní kvasinkový systém pro identifikaci nových inhibitorů lidské ACC2

4.3.1 Systém pro rychlé vyhledávání inhibitorů lidské ACC2

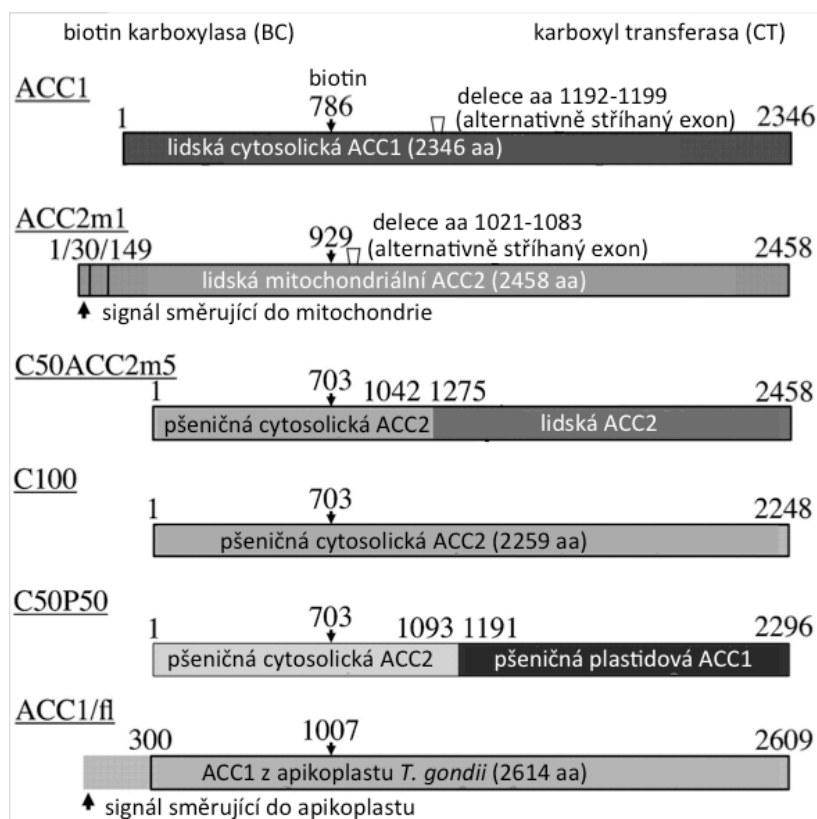
V kapitole 4.1 jsme s pomocí kvasinkového GR systému testovali citlivost ACC z *A. sterilis* k různým herbicidům. V této práci jsme systém modifikovali pro vysokokapacitní testování potenciálních inhibitorů lidské ACC.

Jak již bylo uvedeno v literárním úvodu (1.3.1., 1.6), některá pozorování naznačují, že inhibitory ACC2 by mohly být využity kléčbě obezity, diabetu a metabolického syndromu. Takových specifických inhibitorů je však známo jen velmi málo, a proto jsme se pokusili vyvinout systém pro jejich rychlé vyhledávání.

4.3.2 Příprava kvasinkových GR kmenů a ověření komplementace ACC1 nulové mutace heterologními geny

Nejprve jsme připravili kvasinkové kmeny, kde vložený gen pro ACC komplementoval nulovou mutaci kvasinkového genu ACC1. cDNA kódující celou délku lidské ACC1 byla poskládána z velkých fragmentů cDNA a vložena do vektoru pRS423 nesoucího GAL10 promotor a 5'-UTR a 3'-UTR kvasinkového genu pro ACC1 [86] (schéma vektoru s vloženým genem pro pšeničnou ACC je na obr. 1.5 v kap. 1.3.). Podobně byl vytvořen i konstrukt nesoucí lidskou ACC2. Pro chimérní gen složený ze sekvencí kódujících pšeničnou a lidskou ACC jsme použili již dříve připravený konstrukt vektoru pRS423 nesoucí pšeničnou cytosolickou ACC [86, 113] (obr. 1.5 v kap. 1.3.). V něm jsme nahradili část pšeničné cytosolické ACC odpovídající kódující sekvenci lidské ACC2. Přehled doménové struktury genů pro ACC získané z eukaryot a struktury různých syntetických genů použitých v této práci je uveden na obr. 4.6. Konstrukty nesoucí pšeničnou cytosolickou ACC, pšeničnou cytosolickou/plastidovou chiméru a ACC1 z apikoplastu *Toxoplasma gondii* byly připraveny již dříve a všechny komplementují ACC nulovou mutaci v kvasinkách [86, 96, 112, 113, 124]. V naší práci jsme připravili dvě varianty konstruktů pro každý z genů lidské ACC1 a ACC2. Lišily se v přítomnosti malého exonu uprostřed kódující sekvence (obr. 4.6), podléhajícího alternativnímu sestřihu. Obě varianty genu lidské ACC1 komplementovaly ACC1 nulovou mutaci v kvasinkách. Varianta celé délky genu ACC2 obsahující N-terminální signální doménu a alternativně stříhaný exon také komplementovala nulovou mutaci v kvasinkách. Varianta ACC2 bez alternativně stříhaného

exonu nulovou mutaci nekomplementovala. Výchozí kmeny s komplementující lidskou ACC2 rostly na miskách velmi pomalu (takže byly nevhodné pro další testování), ale isolovali jsme několik mutant s vhodnějšími růstovými vlastnostmi.



Obr. 4.6 Přehled doménové struktury multidoménové ACC a struktura různých chimérických genů komplementujících ACC1 nulovou mutaci v kvasinkách. Signál směřující ACC z *Toxoplasma gondii* do apikoplastu byl v použitém konstrukt odstraněn [113]. Kromě konstrukt s celou délkou genu lidské ACC2 byly vytvořeny 2 další konstrukty v nichž byla odstraněna sekvence směřující protein do mitochondrie (delece 29 nebo 148 aminokyselin). Zobrazeny jsou pouze kódující části syntetických genů v kvasinkových kyvadlových vektorech pRS423 nesoucích GAL10 promotor a 5'-UTR a 3'-UTR z kvasinkového genu ACC1 [86]. Čísla označují pozice aminokyselin v nativních ACC. Pozice delecí jsou popsány v textu. Vlevo jsou podtrženě uvedena jména kvasinkových GR kmenů.

Chimérická ACC složená z pšeničné cytosolové ACC a lidské ACC2 (obr. 4.6) také komplementovala nulovou mutaci. Výsledný GR kmen rostl velmi pomalu, ale opět jsme isolovali mutanty s dostatečně rychlým růstem.

Relativní růstové rychlosti GR kmenů ukazují, že přesto že je v kvasinkách produkována aktivní lidská ACC2, je její aktivita mnohem nižší než aktivita lidské ACC1. Nízký stupeň aktivity lidské ACC2 o úplné délce (full length) v kvasinkách může být způsoben tím, že kvasinkový transportní aparát špatně rozpoznává signál směřující protein do mitochondrie. Proto jsme testovali další dvě varianty lidské ACC2 s N-terminálními delecemi (29 a 148 aminokyselin).

Obě varianty komplementovaly nulovou mutaci v kvasinkách a oba kmeny rostly podstatně rychleji než kmeny ACC2m1 (ACC2 o úplné délce) a C50ACC2m5 (chimérická ACC složená z pšeničné cytosolové ACC a lidské ACC2). Enzymová aktivita lidské ACC2 v proteinových extraktech připravených z GR kmenů byla však velice nízká i u kmenů s N-terminálními delecemi. Naproti tomu aktivita lidské ACC1 v těchto extraktech byla detekována velmi snadno. Také jsme s použitím kvasinkového komplementačního testu zjistili, že připojení His-kotvy k C-konci nebo N-konci lidských ACC nebrání jejich aktivitě.

Všechny kvasinkové GR kmeny s výjimkou ACC1/fl1 (*Toxoplasma gondii*) a C100 (pšeničná cytosolová) rostou podstatně pomaleji než haploidní kvasinkové kmeny divokého typu (WT). Doba zdvojení je 1,5 až 7 krát vyšší než u WT kvasinek. Pomalý růst, pravděpodobně způsobený limitujícím stupněm aktivity ACC, je vhodný pro identifikaci inhibitorů, protože se může projevit vyšší citlivost kmenů k inhibitorům a lze tak spolehlivě rozpoznat i slabé a středně silné inhibitory [113].

4.3.3 Vytvoření a ověření protokolu pro vysoce kapacitní testování knihoven chemických látek

Vytvořili jsme protokol pro vysoce kapacitní testování knihoven chemických látek s využitím kvasinkových GR kmenů. Náš testovací systém jsme ověřili s použitím známých inhibitorů lidské ACC a kvasinkových GR kmenů ACC1 a ACC2m1.

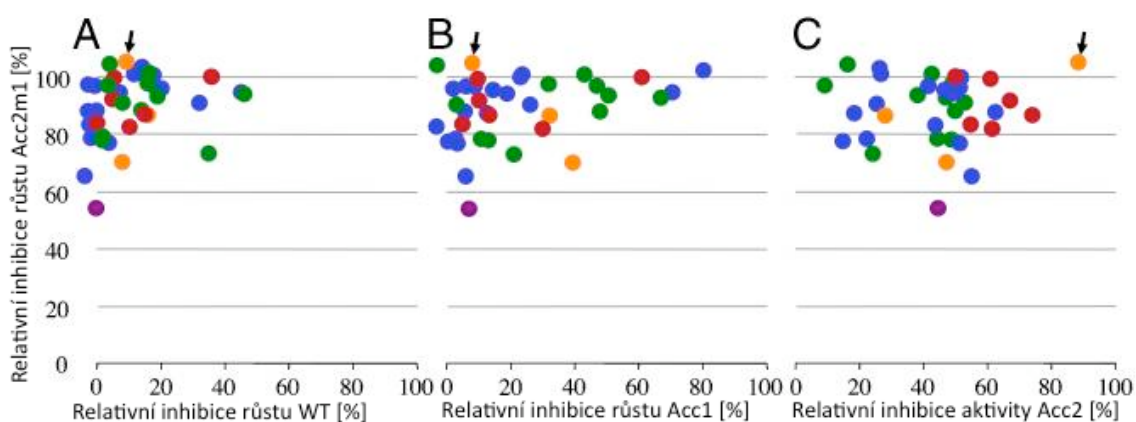
4.3.4 Testování aktivity lidské ACC1 a ACC2 *in vitro*

Sloučeniny identifikované naším GR systémem jako inhibitory lidské ACC byly testovány také *in vitro*. Protože úroveň exprese lidských ACC v kvasinkách byla nízká, použili jsme v naší laboratoři k produkci obou proteinů pro biochemické studie místo kvasinek bakulovirus/hmyzí Sf9 buněčný expresní systém.

4.3.5 Identifikace nových inhibitorů

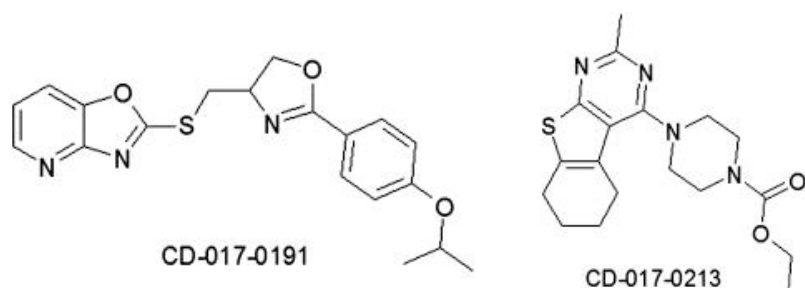
Knihovny chemických látek pro identifikaci nových inhibitorů byly připraveny společností ChemDiv, Inc., San Diego, USA. Jejich testováním jsme získali 38 sloučenin potenciálně selektivních vůči ACC2. Sloučeniny patřily do pěti skupin: thieno[2,3-d]pyrimidin (11 sloučenin), 5H-pyrolo[1,2-a]quinoxalin-4-on (1 sloučenina), oxazol[4,5-b]pyridin (3 sloučeniny), 2-piperidin-1-yl-1H-benzoimidazol (17 sloučenin) a 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin (6

sloučenin). Účinnost a specifita těchto inhibitorů vůči enzymové aktivitě ACC u kmenů ACC2m1, ACC1, WT kvasinek a ACC2 jsou zobrazeny na obr. 4.7.

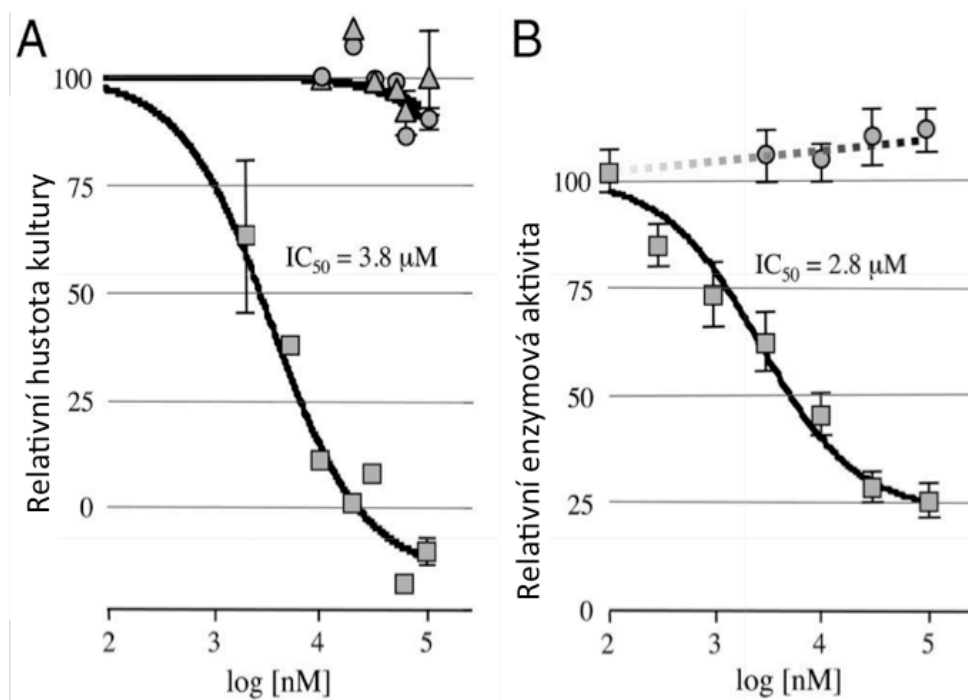


Obr. 4.7 Specifita nalezených potenciálních inhibitorů ACC2. Inhibice růstu kvasinkového kmene ACC2m1 oproti kmenům WT a ACC1 (A a B) a souvislost mezi inhibicí růstu kmene ACC2m1 a inhibicí enzymové aktivity ACC2 (C). Šipka ukazuje body odpovídající sloučenině CD-017-0191. Skupiny chemických sloučenin: zelená, thieno[2,3-d]pyrimidin; fialová, 5H-pyrolo[1,2-a]quinoxalin-4-on; oranžová, oxazolo[4,5-b]pyridiny; modrá, 2-piperidin-1-yl-1H-benzoimidazol; červená, 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin.

Nejnadějnějším potenciálním inhibitorem ACC2 se zdá být sloučenina CD-017-0191 (obr. 4.8) z první knihovny. Tato látka inhibuje aktivitu lidské ACC2 *in vitro* s $IC_{50} = 2,8 \mu M$, což je velmi podobné $IC_{50} = 3,8 \mu M$, pozorované u růstových experimentů kvasinek (obr. 4.9). CD-017-0191 neinhibuje růst kvasinkových kmenů WT nebo ACC1 ani ve 100 μM koncentraci. Rovněž enzymová aktivita ACC1 nebyla inhibována 100 μM koncentrací. Ve třetí knihovně byly nalezeny další dvě sloučeniny ze stejné skupiny chemických sloučenin, obě byly slabší než CD-017-0191 (obr. 4.7).

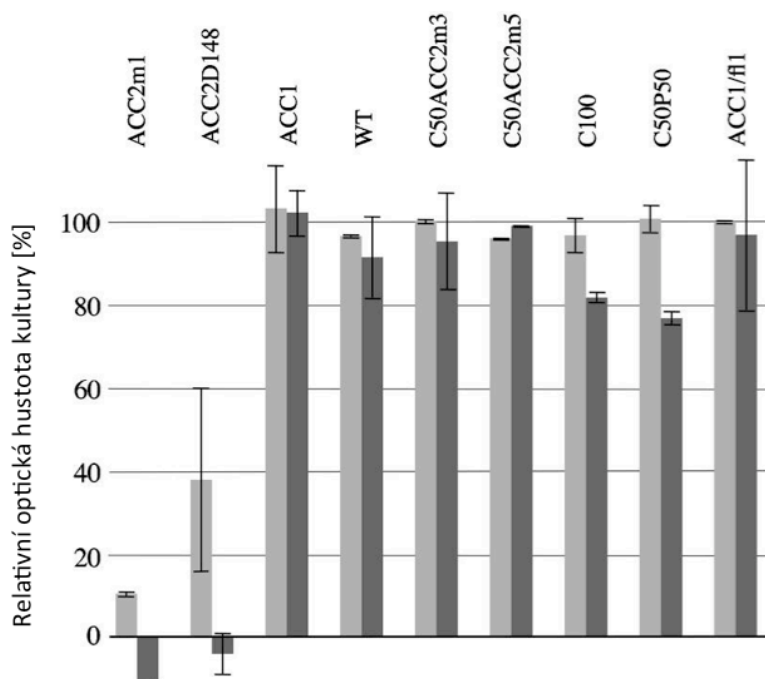


Obr. 4.8 Struktura CD-017-0191, 2-[[[5-methyl-2-[4-(1-methylethoxy)fenyl]-4-oxazolyl]methyl]thio]-oxazolo[4,5-b]pyridin) a CD-017-0213, 4-(2-methyl-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-1-ethoxycarbonylpiperazin.



Obr. 4.9 (A) Inhibice růstu kvasinkových GR kmenů ACC2m1 a ACC1 (obr. 4.6) a WT kvasinek sloučeninou CD-017-0191. (B) Inhibice enzymové aktivity ACC1 a ACC2 *in vitro* sloučeninou CD-017-0191. Čtverečky, růst kmene ACC2m1 a enzymová aktivita ACC2; kolečka, růst kmene ACC1 a enzymová aktivita ACC1; trojúhelníky, růst kmene WT.

Specificita sloučeniny CD-017-0191 byla dále testována s použitím kvasinkových GR kmenů s ACC z různých druhů (obr. 4.10). Jak jsme předpokládali, byl kmen ACC2 Δ 148, jehož ACC se liší od ACC2m1 delecí 148 aminokyselin na N-konci, sloučeninou CD-017-0191 silně inhibován. Růst dalších kmenů inhibován nebyl nebo byl inhibován pouze z 20% (pšeničné ACC) ve 100 μM koncentraci CD-017-0191, což naznačuje vysokou specifitu této sloučeniny vůči lidské ACC2. To, že nebyly inhibovány kmeny C50ACC2m3 a C50ACC2m5, naznačuje, že CT doména lidské ACC2 buď není místem účinku CD-017-0191 nebo neobsahuje celé vazebné místo tohoto inhibitoru.



Obr. 4.10 Inhibice růstu kvasinkových GR kmenů sloučeninou CD-017-0191. Složení ACC v různých kvasinkových kmenech je uvedeno na obr. 4.6. Koncentrace inhibitorů: světle šedé sloupce - 10 μM ; tmavě šedé sloupce - 100 μM . Optická hustota v nepřítomnosti inhibitoru = 100%.

Sloučenina CD-017-0213 (obr. 4.8) se nejprve jevila jako silný inhibitor kmene ACC2m1. Pokusy *in vitro* bylo zjištěno že inhibuje ACC2 a ACC1 s $\text{IC}_{50} = 20 \mu\text{M}$. Další testování ukázalo, že 100 μM koncentrace CD-017-0213 inhibuje růst kvasinkových kmenů (stejných jako byly použity k testování CD-017-0191 na obr. 4.10) z 50 % až 80 %. Tyto výsledky naznačují, že CD-017-0213 je nespecifickým inhibitorem ACC.

Kromě CD-017-0191 a CD-017-0213 byly identifikovány další sloučeniny inhibující kmen ACC2m1. Ty potom ve 100 μM koncentraci inhibovaly aktivitu ACC2 *in vitro* z 10 % až 90 % (obr. 4.7 C). Žádná nebo částečná inhibice aktivity ACC2 těmito látkami *in vitro* může být způsobena jejich přeměnou na aktivní formy během testování v kvasinkách, ale ne v podmínkách testování *in vitro*. Přeměnami látek v médiu nebo *in vivo* kvasinkovými enzymy může být navýšen počet sloučenin v testování. Například, pokud jsou inaktivní estery hydrolyzovány na aktivní volné kyseliny, mohou pomoci rozpoznat nové skupiny chemických látek pro další analýzy chemické modifikace kombinatoriální chemií nebo identifikovat aktivní pozměněný produkt a následně ho syntetizovat *de novo*. Touto cestou mohou být identifikovány důležité sloučeniny, které by jinak nemohly být metodami užívanými enzymy *in vitro* nalezeny.

Přeměna sloučeniny během testování v kvasinkách by mohla znemožnit detekci nestálých látek kvasinkovým systémem. Proto testování kvasinkovým systémem probíhá za použití 100 μ M koncentrace zkoumaných látek, která je dostatečně vysoká, aby omezila účinek degradace na výsledky testování pouze na látky podléhající přeměně na inaktivní deriváty s poločasem rozpadu v řádu hodin. CP-640186 byl opakovaně zaznamenán jako silný inhibitor lidské ACC přes jeho známou metabolickou nestabilitu.

Mezi CD-017-0191 a CD-017-0213 a 158 známými inhibitory ACC přístupnými v Integrity database (Prous Science SAU, Barcelona, Spain) nebyla nalezena strukturně chemická podobnost. CD-017-0191 a jeho analogy (16 sloučenin) nejsou zaznamenány v databázi SciFinder. O CD-017-0213 a jeho analogiích (10 sloučenin) je v databázi SciFinder jen jediná zmínka, která ale není spojená s inhibicí ACC. Mezi našimi molekulami a sloučeninami z databáze SciFinder byla zjištěna jen velmi malá strukturně chemická podobnost. CD-017-0191 a CD-017-0213 tedy představují jedinečné typy chemických látek se středně velkým účinkem a velmi malou strukturní podobností jak se známými inhibitory ACC tak se známými léčivými obecně.

4.3.6 Význam našeho testovacího systému

Vyvinuli jsme poměrně levný, neradioaktivní, vysoce kapacitní testovací systém využívající kvasinkové GR kmeny, vhodný pro identifikaci silných inhibitorů ACC. Strategie spočívá v testování knihoven s použitím kvasinkového kmene a ověřování všech pozitivních záchyťů zkouškou enzymové aktivity *in vitro*. Validace testovacího systému se známými účinnými inhibitory lidských ACC ukázaly jeho vysokou sensitivitu umožňující vysokokapacitní identifikaci nových inhibitorů.

Širší studie pěti různých tříd silných inhibitorů ACC, tří tříd herbicidů zaměřených na rostlinnou multidoménovou ACC a dvou tříd sloučenin zaměřených na lidské ACC ukázaly, že inhibice růstu kvasinkových GR kmenů věrně odráží citlivost cizorodé ACC k těmto inhibitorům. Navíc tyto výsledky ukázaly, že tento princip testování funguje pro celou škálu látek s různými chemickými strukturami a vlastnostmi. Dokonce i v případě metabolicky nestálého inhibitoru lidské ACC2 odpovídal příslušný GR kmen správně na přítomnost inhibitoru, i když v koncentracích podstatně vyšších, než by se očekávalo podle IC_{50} sloučeniny naměřené enzymatickým testem *in vitro*.

K testování specifity a mechanismu působení každého nového inhibitoru byly vytvořeny kvasinkové GR kmeny s ACC z různých druhů a jejich chimérami. Tyto kmeny mohou sloužit

jako testovací kmeny pro kandidáty na inhibitory/léčiva s alternativní specificitou. Také mohou být použity k vyčlenění ACC resistantních k inhibitorům, čímž můžeme identifikovat aminokyselinové zbytky lemující vazebnou kapsu nově objevených inhibitorů a určit jejich mechanismus účinku.

Kvasinkové GR kmeny mohou sloužit jako zdroj jiných cizorodých ACC a jejich chimér pro enzymatické studie s novými inhibitory. Kazety s geny testovanými kvasinkovým systémem mohou být snadno a účinně přeneseny do bakulovirového systému. Expresní systém bakuloviru sf9 v hmyzích buňkách je schopný produkce velkého množství vysoce aktivních multidoménových ACC pro biochemické a strukturní studie.

Testování knihoven chemických látek identifikovalo řadu látek, které jsou potenciálními specifickými inhibitory lidské ACC2. Tyto látky budou po dalších analýzách sloužit jako primární soubor látek pro vývoj léčiv cílených proti lidské ACC2 pro léčbu obezity. Specificita a účinnost jedné z těchto sloučenin (CD-017-0191) již byla potvrzena enzymatickými testy s ACC *in vitro*. Její IC₅₀ pro lidskou ACC2 je 2,8 μM. Tato sloučenina až do koncentrace 100 μM neinhibuje lidskou ACC1 (*in vitro* ani *in vivo*). Nepůsobí ani na ACC z několika dalších zdrojů. S využitím GR kmenů s chimérou ACC jsme prokázali, že cílovým místem této sloučeniny je buď jiná doména než CT nebo kromě CT domény potřebuje další strukturní elementy. Testováním knihoven jsme identifikovali i další sloučeninu (CD-017-0213), která se ukázala být nesespecifickým inhibitorem ACC s IC₅₀ 20 μM pro obě ACC *in vitro*.

Naše pokusy potvrzují realizovatelnost vysokokapacitního testování velkých knihoven chemických látek s použitím technologie založené na kvasinkových GR kmenech. Tento systém by se mohl uplatnit v identifikaci nových léčiv k léčbě parazitických onemocnění, protože ACC parazitů, jako jsou *Plasmodium* a *Leishmania*, mají odlišnou sekvenci od obou lidských ACC.

Rozsáhlé studie lidských ACC, včetně pokusů se snížením hmotnosti ACC2 knockoutovaných myší [13-16], potvrdily, že enzym ACC je potenciálním cílem léčiv proti obezitě. Specifické nízkomolekulární inhibitory tohoto enzymu, jako sloučenina identifikovaná v naší laboratoři, poskytují užitečné vodítko k dalšímu úsilí vývoje léčiv.

Podrobnější informace jsou uvedeny v příloze 3.

5. Závěry

Předkládaná disertační práce je komentovaným souborem tří odborných prací zaměřených na studium ACC z hlediska evoluce a inhibice. Zabývá se fylogenetickou analýzou genů kódujících ACC pšenice a dalších rostlinných druhů, čímž přispívá k získání poznatků v oblasti evoluce těchto genů a genomů hexaploidní pšenice. Dále je uvedený enzym zkoumán ve spojitosti s výzkumem rostlin resistantních vůči herbicidům. V neposlední řadě je ACC studována jako cíl účinku inhibitorů potenciálně využitelných při léčbě obezity. Nejdůležitější poznatky, kterých bylo v disertační práci dosaženo, jsou shrnuty do následujících bodů:

- Testováním inhibice růstu kvasinkových kmenů, kde je nulová mutace komplementována pšeničnou chimérní ACC nesoucí jednotlivé mutace Cys-1999, Cys-2027, Asn-2041 a Gly-2078, jsme ukázali, že Asp-2078-Gly způsobuje resistenci k APPs a CHDs, Trp-2027-Cys a Ile-2041-Asn způsobují resistenci k APPs a Trp-1999-Cys způsobuje resistenci pouze k fenoxapropu, což je v souladu s výsledky pozorování fenotypů sledovaných rostlin.
- Pro účel studia evoluce pšenice jsme sekvenovali lokusy ACC1 a ACC2 z *Triticum urartu* (A genom), *Aegilops tauschii* (D genom), *Triticum turgidum* (AB genom) a *Triticum aestivum* (ABD genom) a také dva ACC2 pseudogeny z *T. urartu*. Nepodařilo se sekvenovat homolog A ACC2 z *T. turgidum*, neboť všechny tři ACC2 BAC klony izolované z knihovny *T. turgidum* obsahovaly pouze homolog B. Získané sekvence byly porovnány mezi sebou a s dalšími dostupnými sekvencemi kódující ACC rostlin čeledi lipnicovitých. Frekvence substitucí synonymních a intronových míst se mění podle místa v genech pro ACC a v průměru jsou tyto frekvence nižší než frekvence substitucí vně kódující části genů. Na základě sekvencí ACC a dalších genů se pšenice a ječmen oddělily před 11,6 miliony let. Tři homologní genomy (A, B a D) se podle našich výpočtů oddělily před 2,3-2,4 miliony let, což je na dolní hranici jiných odhadů.
- Vyvinuli jsme poměrně levný, neradioaktivní, vysoce kapacitní testovací systém využívající kvasinkové kmeny s nahrazenými geny, vhodný pro identifikaci silných inhibitorů ACC. Strategie spočívá v testování knihoven s použitím kvasinkového kmene a ověřování všech pozitivních záchytů zkouškou enzymové aktivity *in vitro*. Testování knihoven sloučenin identifikovalo řadu látek, které jsou potenciálními specifickými inhibitory lidské ACC2. Tyto

sloučeniny mohou po dalších analýzách sloužit jako první soubor látek pro vývoj léčiv cílených proti lidské ACC2 pro léčbu obezity.

6. Seznam publikací

1. Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides.
Liu W, Harrison DK, **Chalupska D**, Gornicki P, O'donnell CC, Adkins SW, Haselkorn R, Williams RR.
Proc Natl Acad Sci USA. 2007 Feb 27; 104(9):3627-3
2. Acc homoeoloci and the evolution of wheat genomes.
Chalupska D, Lee HY, Faris JD, Evrard A, Chalhoub B, Haselkorn R, Gornicki P
Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Jul 15; 105(28):9691-6
3. Exploration of acetyl-CoA carboxylase as a target for new drugs to treat obesity.
Marjanovic J, **Chalupska D**, Patenode C, Coster A, Arnold E, Ye A, Agnesi G, Lu RY, Kozmin S, Okun I, Haselkorn R, Gornicki P
Proc Natl Acad Sci USA. 2010 May 18; 107(20):9093-8

7. Použitá literatura

1. Wakil SJ, Stoops JK, Joshi VC: **Fatty acid synthesis and its regulation.** *Annual review of biochemistry* 1983, **52**:537-579.
2. Tong L: **Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2005, **62**(16):1784-1803.
3. Knowles JR: **The mechanism of biotin-dependent enzymes.** *Annual review of biochemistry* 1989, **58**:195-221.
4. Cronan JE, Jr., Waldrop GL: **Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases.** *Progress in lipid research* 2002, **41**(5):407-435.
5. Alban C, Job D, Douce R: **Biotin Metabolism in Plants.** *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 2000, **51**:17-47.
6. Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas RS, Del Rio AL: **Biotin in metabolism and its relationship to human disease.** *Archives of medical research* 2002, **33**(5):439-447.
7. Sasaki Y, Nagano Y: **Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding.** *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2004, **68**(6):1175-1184.
8. Nikolau BJ, Ohlrogge JB, Wurtele ES: **Plant biotin-containing carboxylases.** *Archives of biochemistry and biophysics* 2003, **414**(2):211-222.
9. Turner JA, Pernich DJ: **Origin of enantiomeric selectivity in the aryloxyphenoxypropionic acid class of herbicidal acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase) inhibitors.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2002, **50**(16):4554-4566.
10. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Kordari P, Oh W, Shaikenov T, Gu Z, Wakil SJ: **Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(34):12011-12016.
11. Mao J, DeMayo FJ, Li H, Abu-Elheiga L, Gu Z, Shaikenov TE, Kordari P, Chirala SS, Heird WC, Wakil SJ: **Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(22):8552-8557.
12. Mao J, Yang T, Gu Z, Heird WC, Finegold MJ, Lee B, Wakil SJ: **aP2-Cre-mediated inactivation of acetyl-CoA carboxylase 1 causes growth retardation and reduced lipid accumulation in adipose tissues.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(41):17576-17581.
13. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ: **Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2.** *Science* 2001, **291**(5513):2613-2616.
14. Choi CS, Savage DB, Abu-Elheiga L, Liu ZX, Kim S, Kulkarni A, Distefano A, Hwang YJ, Reznick RM, Codella R *et al*: **Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(42):16480-16485.
15. Essop MF, Camp HS, Choi CS, Sharma S, Fryer RM, Reinhart GA, Guthrie PH, Bentebibel A, Gu Z, Shulman GI *et al*: **Reduced heart size and increased myocardial fuel substrate oxidation in ACC2 mutant mice.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2008, **295**(1):H256-265.

16. Oh W, Abu-Elheiga L, Kordari P, Gu Z, Shaikenov T, Chirala SS, Wakil SJ: **Glucose and fat metabolism in adipose tissue of acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(5):1384-1389.
17. Friedman JM: **A war on obesity, not the obese.** *Science* 2003, **299**(5608):856-858.
18. Flier JS: **Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic.** *Cell* 2004, **116**(2):337-350.
19. Lazar MA: **How obesity causes diabetes: not a tall tale.** *Science* 2005, **307**(5708):373-375.
20. Reaven GM: **Why Syndrome X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome.** *Cell metabolism* 2005, **1**(1):9-14.
21. Devos KM, Beales J, Ogihara Y, Doust AN: **Comparative sequence analysis of the phytochrome C gene and its upstream region in allohexaploid wheat reveals new data on the evolution of its three constituent genomes.** *Plant molecular biology* 2005, **58**(5):625-641.
22. Dvorak J, Akhunov ED: **Tempos of gene locus deletions and duplications and their relationship to recombination rate during diploid and polyploid evolution in the Aegilops-Triticum alliance.** *Genetics* 2005, **171**(1):323-332.
23. Faris J, Sirikhachornkit A, Haselkorn R, Gill B, Gornicki P: **Chromosome mapping and phylogenetic analysis of the cytosolic acetyl-CoA carboxylase loci in wheat.** *Molecular biology and evolution* 2001, **18**(9):1720-1733.
24. Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, Gornicki P: **Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(12):8133-8138.
25. Huang SX, Sirikhachornkit A, Faris JD, Su XJ, Gill BS, Haselkorn R, Gornicki P: **Phylogenetic analysis of the acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses.** *Plant molecular biology* 2002, **48**(5):805-820.
26. Choi-Rhee E, Cronan JE: **The biotin carboxylase-biotin carboxyl carrier protein complex of Escherichia coli acetyl-CoA carboxylase.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(33):30806-30812.
27. Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ: **The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(4):1444-1449.
28. Munday MR: **Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase.** *Biochemical Society transactions* 2002, **30**(Pt 6):1059-1064.
29. Diacovich L, Peiru S, Kurth D, Rodriguez E, Podesta F, Khosla C, Gramajo H: **Kinetic and structural analysis of a new group of Acyl-CoA carboxylases found in Streptomyces coelicolor A3(2).** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(34):31228-31236.
30. Hugler M, Krieger RS, Jahn M, Fuchs G: **Characterization of acetyl-CoA/propionyl-CoA carboxylase in Metallosphaera sedula. Carboxylating enzyme in the 3-hydroxypropionate cycle for autotrophic carbon fixation.** *European journal of biochemistry / FEBS* 2003, **270**(4):736-744.
31. Barber MC, Price NT, Travers MT: **Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa.** *Biochimica et biophysica acta* 2005, **1733**(1):1-28.
32. Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J: **Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects.** *Molecular aspects of medicine* 2004, **25**(5-6):495-520.
33. Foster DW: **The role of the carnitine system in human metabolism.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004, **1033**:1-16.

34. McGarry JD, Brown NF: **The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis.** *European journal of biochemistry / FEBS* 1997, **244**(1):1-14.
35. Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR: **Molecular enzymology of carnitine transfer and transport.** *Biochimica et biophysica acta* 2001, **1546**(1):21-43.
36. Abu-Elheiga L, Oh W, Kordari P, Wakil SJ: **Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(18):10207-10212.
37. Harwood HJ, Jr.: **Acetyl-CoA carboxylase inhibition for the treatment of metabolic syndrome.** *Curr Opin Investig Drugs* 2004, **5**(3):283-289.
38. Lenhard JM, Gottschalk WK: **Preclinical developments in type 2 diabetes.** *Advanced drug delivery reviews* 2002, **54**(9):1199-1212.
39. Chakraborty G, Ledeen R: **Fatty acid synthesizing enzymes intrinsic to myelin.** *Brain research Molecular brain research* 2003, **112**(1-2):46-52.
40. Salles J, Sargueil F, Knoll-Gellida A, Witters LA, Cassagne C, Garbay B: **Acetyl-CoA carboxylase and SREBP expression during peripheral nervous system myelination.** *Biochimica et biophysica acta* 2003, **1631**(3):229-238.
41. Sorensen A, Travers MT, Vernon RG, Price NT, Barber MC: **Localization of messenger RNAs encoding enzymes associated with malonyl-CoA metabolism in mouse brain.** *Brain research Gene expression patterns* 2002, **1**(3-4):167-173.
42. Ohlrogge JB, Jaworski JG: **Regulation of Fatty Acid Synthesis.** *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 1997, **48**:109-136.
43. Baud S, Bellec Y, Miquel M, Bellini C, Caboche M, Lepiniec L, Faure JD, Rochat C: **gurke and pasticcino3 mutants affected in embryo development are impaired in acetyl-CoA carboxylase.** *EMBO reports* 2004, **5**(5):515-520.
44. Baud S, Guyon V, Kronenberger J, Wuillemme S, Miquel M, Caboche M, Lepiniec L, Rochat C: **Multifunctional acetyl-CoA carboxylase 1 is essential for very long chain fatty acid elongation and embryo development in Arabidopsis.** *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2003, **33**(1):75-86.
45. Kajiwara T, Furutani M, Hibara K, Tasaka M: **The GURKE gene encoding an acetyl-CoA carboxylase is required for partitioning the embryo apex into three subregions in Arabidopsis.** *Plant & cell physiology* 2004, **45**(9):1122-1128.
46. Focke M, Gieringer E, Schwan S, Jansch L, Binder S, Braun HP: **Fatty acid biosynthesis in mitochondria of grasses: malonyl-coenzyme A is generated by a mitochondrial-localized acetyl-coenzyme A carboxylase.** *Plant physiology* 2003, **133**(2):875-884.
47. Heazlewood JL, Howell KA, Whelan J, Millar AH: **Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome.** *Plant physiology* 2003, **132**(1):230-242.
48. Al-Feel W, DeMar JC, Wakil SJ: **A Saccharomyces cerevisiae mutant strain defective in acetyl-CoA carboxylase arrests at the G2/M phase of the cell cycle.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(6):3095-3100.
49. Hoja U, Marthol S, Hofmann J, Stegner S, Schulz R, Meier S, Greiner E, Schweizer E: **HFA1 encoding an organelle-specific acetyl-CoA carboxylase controls mitochondrial fatty acid synthesis in Saccharomyces cerevisiae.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(21):21779-21786.
50. Walsh CT: **Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility.** *Science* 2004, **303**(5665):1805-1810.
51. James ES, Cronan JE: **Expression of two Escherichia coli acetyl-CoA carboxylase subunits is autoregulated.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(4):2520-2527.

52. Zuther E, Huang S, Jelenska J, Eilenberg H, Arnold EM, Su X, Sirikhachornkit A, Podkowinski J, Zilberstein A, Haselkorn R *et al*: **Complex nested promoters control tissue-specific expression of acetyl-CoA carboxylase genes in wheat.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(5):1403-1408.
53. Podkowinski J, Jelenska J, Sirikhachornkit A, Zuther E, Haselkorn R, Gornicki P: **Expression of cytosolic and plastid acetyl-coenzyme A carboxylase genes in young wheat plants.** *Plant physiology* 2003, **131**(2):763-772.
54. Mao J, Chirala SS, Wakil SJ: **Human acetyl-CoA carboxylase 1 gene: presence of three promoters and heterogeneity at the 5'-untranslated mRNA region.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(13):7515-7520.
55. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F: **SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis.** *Biochimie* 2004, **86**(11):839-848.
56. Foufelle F, Ferre P: **New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c.** *The Biochemical journal* 2002, **366**(Pt 2):377-391.
57. Oh SY, Park SK, Kim JW, Ahn YH, Park SW, Kim KS: **Acetyl-CoA carboxylase beta gene is regulated by sterol regulatory element-binding protein-1 in liver.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(31):28410-28417.
58. Field FJ, Born E, Murthy S, Mathur SN: **Polyunsaturated fatty acids decrease the expression of sterol regulatory element-binding protein-1 in CaCo-2 cells: effect on fatty acid synthesis and triacylglycerol transport.** *The Biochemical journal* 2002, **368**(Pt 3):855-864.
59. Ishii S, Iizuka K, Miller BC, Uyeda K: **Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(44):15597-15602.
60. Rumberger JM, Wu T, Hering MA, Marshall S: **Role of hexosamine biosynthesis in glucose-mediated up-regulation of lipogenic enzyme mRNA levels: effects of glucose, glutamine, and glucosamine on glycerophosphate dehydrogenase, fatty acid synthase, and acetyl-CoA carboxylase mRNA levels.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(31):28547-28552.
61. Puigserver P, Spiegelman BM: **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator.** *Endocrine reviews* 2003, **24**(1):78-90.
62. Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, Yang W, Pei L, Uldry M, Tontonoz P *et al*: **Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP.** *Cell* 2005, **120**(2):261-273.
63. Beaty NB, Lane MD: **Kinetics of activation of acetyl-CoA carboxylase by citrate. Relationship to the rate of polymerization of the enzyme.** *The Journal of biological chemistry* 1983, **258**(21):13043-13050.
64. Rubink DS, Winder WW: **Effect of phosphorylation by AMP-activated protein kinase on palmitoyl-CoA inhibition of skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase.** *J Appl Physiol* 2005, **98**(4):1221-1227.
65. Hardie DG, Pan DA: **Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase.** *Biochemical Society transactions* 2002, **30**(Pt 6):1064-1070.
66. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG: **AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.** *Cell metabolism* 2005, **1**(1):15-25.

67. Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, Chen ZP, Murthy S, Walter M, Gupta A, Adams JJ, Katsis F, van Denderen B *et al*: **AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator.** *Biochemical Society transactions* 2003, **31**(Pt 1):162-168.
68. Ruderman NB, Park H, Kaushik VK, Dean D, Constant S, Prentki M, Saha AK: **AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise.** *Acta physiologica Scandinavica* 2003, **178**(4):435-442.
69. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Flamez D, Mu J, Wojtaszewski JF, Schuit FC, Birnbaum M, Richter E *et al*: **Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models.** *Biochemical Society transactions* 2003, **31**(Pt 1):216-219.
70. Fasshauer M, Paschke R, Stumvoll M: **Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease.** *Biochimie* 2004, **86**(11):779-784.
71. Friedman JM: **The function of leptin in nutrition, weight, and physiology.** *Nutrition reviews* 2002, **60**(10 Pt 2):S1-14; discussion S68-84, 85-17.
72. Gil-Campos M, Canete RR, Gil A: **Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity.** *Clin Nutr* 2004, **23**(5):963-974.
73. Wong GW, Wang J, Hug C, Tsao TS, Lodish HF: **A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(28):10302-10307.
74. Swinnen JV, Brusselmans K, Verhoeven G: **Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets.** *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2006, **9**(4):358-365.
75. Lane MD, Wolfgang M, Cha SH, Dai Y: **Regulation of food intake and energy expenditure by hypothalamic malonyl-CoA.** *Int J Obes (Lond)* 2008, **32** Suppl 4:S49-54.
76. Ussher JR, Lopaschuk GD: **The malonyl CoA axis as a potential target for treating ischaemic heart disease.** *Cardiovascular research* 2008, **79**(2):259-268.
77. Harwood HJ, Jr., Petras SF, Shelly LD, Zaccaro LM, Perry DA, Makowski MR, Hargrove DM, Martin KA, Tracey WR, Chapman JG *et al*: **Isozyme-nonspecific N-substituted bipiperidylcarboxamide acetyl-CoA carboxylase inhibitors reduce tissue malonyl-CoA concentrations, inhibit fatty acid synthesis, and increase fatty acid oxidation in cultured cells and in experimental animals.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(39):37099-37111.
78. Ohmori K, Yamada H, Yasuda A, Yamamoto A, Matsuura N, Kuniwa M: **Anti-hyperlipidemic action of a newly synthesized benzoic acid derivative, S-2E.** *European journal of pharmacology* 2003, **471**(1):69-76.
79. Cramer CT, Goetz B, Hopson KL, Fici GJ, Ackermann RM, Brown SC, Bisgaier CL, Rajeswaran WG, Oniciu DC, Pape ME: **Effects of a novel dual lipid synthesis inhibitor and its potential utility in treating dyslipidemia and metabolic syndrome.** *Journal of lipid research* 2004, **45**(7):1289-1301.
80. Levert KL, Waldrop GL: **A bisubstrate analog inhibitor of the carboxyltransferase component of acetyl-CoA carboxylase.** *Biochemical and biophysical research communications* 2002, **291**(5):1213-1217.
81. Levert KL, Waldrop GL, Stephens JM: **A biotin analog inhibits acetyl-CoA carboxylase activity and adipogenesis.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(19):16347-16350.
82. Burton JD, Gronwald JW, Somers DA, Connelly JA, Gengenbach BG, Wyse DL: **Inhibition of plant acetyl-coenzyme A carboxylase by the herbicides sethoxydim and haloxyfop.** *Biochemical and biophysical research communications* 1987, **148**(3):1039-1044.
83. Alban C, Baldet P, Douce R: **Localization and characterization of two structurally different forms of acetyl-CoA carboxylase in young pea leaves, of which one is**

- sensitive to aryloxyphenoxypropionate herbicides. *The Biochemical journal* 1994, **300** (Pt 2):557-565.**
84. Egli MA, Gengenbach BG, Gronwald JW, Somers DA, Wyse DL: **Characterization of Maize Acetyl-Coenzyme A Carboxylase.** *Plant physiology* 1993, **101**(2):499-506.
85. Herbert D, Price LJ, Alban C, Dehaye L, Job D, Cole DJ, Pallett KE, Harwood JL: **Kinetic studies on two isoforms of acetyl-CoA carboxylase from maize leaves.** *The Biochemical journal* 1996, **318** (Pt 3):997-1006.
86. Joachimiak M, Tevzadze G, Podkowinski J, Haselkorn R, Gornicki P: **Wheat cytosolic acetyl-CoA carboxylase complements an ACC1 null mutation in yeast.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(18):9990-9995.
87. Price LJ, Herbert D, Cole DJ, Harwood JL: **Use of plant cell cultures to study graminicide effects on lipid metabolism.** *Phytochemistry* 2003, **63**(5):533-541.
88. Cocker KM, Moss SR, Coleman JOD: **Multiple mechanisms of resistance to fenoxaprop-P-ethyl in United Kingdom and other European populations of herbicide-resistant *Alopecurus myosuroides* (Black-Grass).** *Pestic Biochem Phys* 1999, **65**(3):169-180.
89. Devine MD, Shukla A: **Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance.** *Crop Prot* 2000, **19**(8-10):881-889.
90. Kim TJ, Kim JS, Hong KS, Hwang IT, Kim KM, Kim HR, Cho KY: **EK-2612, a new cyclohexane-1,3-dione possessing selectivity between rice (*Oryza sativa*) and barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*).** *Pest management science* 2004, **60**(9):909-913.
91. Delye C, Calmes E, Matejicek A: **SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) genotypes resistant to acetyl CoA-carboxylase inhibiting herbicides.** *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 2002, **104**(6-7):1114-1120.
92. Delye C, Matejicek A, Gasquez J: **PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum gaud*).** *Pest management science* 2002, **58**(5):474-478.
93. Delye C, Zhang XQ, Chalopin C, Michel S, Powles SB: **An isoleucine residue within the carboxyl-transferase domain of multidomain acetyl-coenzyme A carboxylase is a major determinant of sensitivity to aryloxyphenoxypropionate but not to cyclohexanedione inhibitors.** *Plant physiology* 2003, **132**(3):1716-1723.
94. Christoffers MJ, Berg ML, Messersmith CG: **An isoleucine to leucine mutation in acetyl-CoA carboxylase confers herbicide resistance in wild oat.** *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* 2002, **45**(6):1049-1056.
95. Delye C, Wang T, Darmency H: **An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-CoA carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim.** *Planta* 2002, **214**(3):421-427.
96. Zagnitko O, Jelenska J, Tevzadze G, Haselkorn R, Gornicki P: **An isoleucine/leucine residue in the carboxyltransferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(12):6617-6622.
97. Dubcovsky J, Dvorak J: **Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication.** *Science* 2007, **316**(5833):1862-1866.
98. Nesbitt M, Samuel D: **Wheat domestication: Archaeobotanical evidence.** *Science* 1998, **279**(5356):1433-1433.
99. Wendel JF: **Genome evolution in polyploids.** *Plant molecular biology* 2000, **42**(1):225-249.
100. Luo MC, Yang ZL, You FM, Kawahara T, Waines JG, Dvorak J: **The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of**

- emmer domestication.** *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 2007, **114**(6):947-959.
101. Ozkan H, Brandolini A, Pozzi C, Effgen S, Wunder J, Salamini F: **A reconsideration of the domestication geography of tetraploid wheats.** *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 2005, **110**(6):1052-1060.
102. Heun M, SchaferPregl R, Klawan D, Castagna R, Accerbi M, Borghi B, Salamini F: **Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting.** *Science* 1997, **278**(5341):1312-1314.
103. Dvorak J, Luo MC, Yang ZL: **Restriction fragment length polymorphism and divergence in the genomic regions of high and low recombination in self-fertilizing and cross-fertilizing aegilops species.** *Genetics* 1998, **148**(1):423-434.
104. Chen ZJ, Ni Z: **Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids.** *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2006, **28**(3):240-252.
105. Wang J, Tian L, Madlung A, Lee HS, Chen M, Lee JJ, Watson B, Kagochi T, Comai L, Chen ZJ: **Stochastic and epigenetic changes of gene expression in Arabidopsis polyploids.** *Genetics* 2004, **167**(4):1961-1973.
106. Talbert LE, Smith LY, Blake MK: **More than one origin of hexaploid wheat is indicated by sequence comparison of low-copy DNA.** *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* 1998, **41**(3):402-407.
107. Huang S, Sirikhachornkit A, Faris JD, Su X, Gill BS, Haselkorn R, Gornicki P: **Phylogenetic analysis of the acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses.** *Plant molecular biology* 2002, **48**(5-6):805-820.
108. Gornicki P, Faris J, King I, Podkowinski J, Gill B, Haselkorn R: **Plastid-localized acetyl-CoA carboxylase of bread wheat is encoded by a single gene on each of the three ancestral chromosome sets.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(25):14179-14184.
109. Gornicki P, Podkowinski J, Scappino LA, DiMaio J, Ward E, Haselkorn R: **Wheat acetyl-coenzyme A carboxylase: cDNA and protein structure.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(15):6860-6864.
110. Podkowinski J, Sroga GE, Haselkorn R, Gornicki P: **Structure of a gene encoding a cytosolic acetyl-CoA carboxylase of hexaploid wheat.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**(5):1870-1874.
111. Schneiter R, Hitomi M, Ivessa AS, Fasch EV, Kohlwein SD, Tartakoff AM: **A yeast acetyl coenzyme A carboxylase mutant links very-long-chain fatty acid synthesis to the structure and function of the nuclear membrane-pore complex.** *Molecular and cellular biology* 1996, **16**(12):7161-7172.
112. Nikolskaya T, Zagnitko O, Tevzadze G, Haselkorn R, Gornicki P: **Herbicide sensitivity determinant of wheat plastid acetyl-CoA carboxylase is located in a 400-amino acid fragment of the carboxyltransferase domain.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(25):14647-14651.
113. Jelenska J, Sirikhachornkit A, Haselkorn R, Gornicki P: **The carboxyltransferase activity of the apicoplast acetyl-CoA carboxylase of Toxoplasma gondii is the target of aryloxyphenoxypropionate inhibitors.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(26):23208-23215.
114. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic acids research* 1994, **22**(22):4673-4680.

115. Kumar S, Tamura K, Nei M: **MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment.** *Briefings in bioinformatics* 2004, **5**(2):150-163.
116. Delye C, Zhang XQ, Michel S, Matejcek A, Powles SB: **Molecular bases for sensitivity to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in black-grass.** *Plant physiology* 2005, **137**(3):794-806.
117. Zhang XQ, Powles SB: **The molecular bases for resistance to acetyl co-enzyme A carboxylase (ACCase) inhibiting herbicides in two target-based resistant biotypes of annual ryegrass (*Lolium rigidum*).** *Planta* 2006, **223**(3):550-557.
118. Paterson AH, Bowers JE, Chapman BA: **Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(26):9903-9908.
119. Wang X, Shi X, Hao B, Ge S, Luo J: **Duplication and DNA segmental loss in the rice genome: implications for diploidization.** *The New phytologist* 2005, **165**(3):937-946.
120. Wei F, Coe E, Nelson W, Bharti AK, Engler F, Butler E, Kim H, Goicoechea JL, Chen M, Lee S *et al*: **Physical and genetic structure of the maize genome reflects its complex evolutionary history.** *PLoS genetics* 2007, **3**(7):e123.
121. Dvorak J, Akhunov ED, Akhunov AR, Deal KR, Luo MC: **Molecular characterization of a diagnostic DNA marker for domesticated tetraploid wheat provides evidence for gene flow from wild tetraploid wheat to hexaploid wheat.** *Molecular biology and evolution* 2006, **23**(7):1386-1396.
122. Bossolini E, Wicker T, Knobel PA, Keller B: **Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation.** *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2007, **49**(4):704-717.
123. Huang SX, Su XJ, Haselkorn R, Gornicki P: **Evolution of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) based on sequences of the nuclear gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase.** *Plant Sci* 2003, **164**(1):43-49.
124. Jelenska J, Crawford MJ, Harb OS, Zuther E, Haselkorn R, Roos DS, Gornicki P: **Subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(5):2723-2728.
125. Nesbitt M, Samuel D (1996) in Proceedings of the First International Workshop on Hulled Wheats, eds Padulosi S, Hammer K, Heller J (International Plant Genetic Resources Institute, Rome), pp 41-100.

Přílohy 1-3

Příloha č. 1

Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides.

Liu W, Harrison DK, **Chalupska D**, Gornicki P, O'donnell CC, Adkins SW, Haselkorn R, Williams RR.

Proc Natl Acad Sci USA. 2007 Feb 27; 104(9):3627-3

Příloha č. 2

Acc homoeoloci and the evolution of wheat genomes.

Chalupska D, Lee HY, Faris JD, Evrard A, Chalhoub B, Haselkorn R, Gornicki P

Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Jul 15; 105(28):9691-6

Příloha č. 3

Exploration of acetyl-CoA carboxylase as a target for new drugs to treat obesity.

Marjanovic J, **Chalupska D**, Patenode C, Coster A, Arnold E, Ye A, Agnesi G, Lu RY, Kozmin S, Okun I, Haselkorn R, Gornicki P

Proc Natl Acad Sci USA. 2010 May 18; 107(20):9093-8

Příloha č. 1

Single-site mutations in the carboxyltransferase domain of plastid acetyl-CoA carboxylase confer resistance to grass-specific herbicides.

Liu W, Harrison DK, **Chalupska D**, Gornicki P, O'donnell CC, Adkins SW, Haselkorn R, Williams RR.

Proc Natl Acad Sci USA. 2007 Feb 27; 104(9):3627-3

Příloha č. 2

Acc homoeoloci and the evolution of wheat genomes.

Chalupska D, Lee HY, Faris JD, Evrard A, Chalhoub B, Haselkorn R,
Gornicki P

Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Jul 15; 105(28):9691-6

Příloha č. 3

Exploration of acetyl-CoA carboxylase as a target for new drugs to treat obesity.

Marjanovic J, **Chalupska D**, Patenode C, Coster A, Arnold E, Ye A, Agnesi G, Lu RY, Kozmin S, Okun I, Haselkorn R, Gornicki P

Proc Natl Acad Sci USA. 2010 May 18; 107(20):9093-8

