

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Alžběta Baudyšová**

Mitochondriální beta-laktamasa a její role v lidském organismu

Mitochondrial beta-lactamase and its role in humans

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Pavel Šácha, Ph.D.

Praha 2017

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 dne 12. května 2017

Alžběta Baudyšová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli Pavlu Šáchovi za trpělivost, vedoucímu skupiny Janu Konvalinkovi za možnost vypracování bakalářské práce v jeho laboratoři, Zuzaně Kečkové za cenné rady, Tomáši Knedlíkovi a Michalu Svobodovi ochotu odpovídat na opravdu velké množství otázek a celkově celému týmu za vstřícné přijetí. Zároveň bych chtěla poděkovat svým blízkým za podporu během celého mého studia.

## **Abstrakt**

Nádorová onemocnění jsou v současné době jednou z hlavních příčin úmrtí. Lidské tělo má řadu ochranných mechanismů bránících vzniku nádorů. Jedním z těchto mechanismů jsou tumor supresorové geny. Jedním z nedávno popsáných tumor supresorových genů je gen kódující protein LACTB. LACTB je savčím homologem bakteriálních beta-laktamas a proteinů vázajících penicilin (PBPs). PBPs se podílejí na tvorbě bakteriální buněčné stěny, konkrétně na syntéze peptidoglykanu a mohou být inhibovány penicilinovými antibiotiky. Beta-laktamasy jsou enzymy schopné štěpit beta-laktamový kruh penicilinu a rušit tak účinek antibiotik. Hlavním tématem této práce je protein LACTB. LACTB se nachází v mezimembránovém prostoru savčích mitochondrií, kde tvoří filamenta, jejichž funkce není zatím známá. LACTB byl kromě souvislosti s nádorovými onemocněními také asociován s obezitou a alergií na penicilin. V této práci je kladena pozornost především na shromáždění již známých informací o proteinu LACTB a jejich uvedení do širších souvislostí.

**Klíčová slova:** nádorové onemocnění, tumor supresor, LACTB, beta-laktamasa, mezimembránový mitochondriální prostor, fosfatidylserin-dekarboxylasa

## **Abstract**

Cancer is one of the most frequent causes of death. Fortunately, human body has a number of various mechanisms that protect cells from tumorigenic transformation. One of those mechanisms are tumor suppressor genes. The latest described tumor suppressor gene encodes LACTB protein. LACTB is the mammalian homolog of bacterial beta-lactamases and penicillin binding proteins (PBPs). PBPs are involved in construction of bacterial cell walls (specifically in the synthesis of peptidoglycan) and they could be inhibited by penicillin antibiotics. Beta-lactamases are able to break the beta-lactam ring of penicillin and provide resistance to the antibiotics. The main topic of this work will be the LACTB protein. LACTB is localized in the intermembrane space of mammalian mitochondria. Here it forms filaments whose physiological function still remains unknown. LACTB, apart from its connection with cancer, was also associated with obesity and penicillin allergy. Main focus of this work will be to gather all known information about the LACTB protein and put them into a wider context.

**Key words:** cancer, tumor suppressor, LACTB, beta-laktamase, intermembrane mitochondrial space, phosphatidylserin decarboxylase

## Seznam zkratek

AIF	Faktor indukující apoptózu
BMI	Index tělesné hmotnosti (z angl. body mass index)
DOX	Doxycyklin
EST	Část exprimované mRNA (z angl. expressed sequence tag)
LACTB	Mitochondriální beta laktamasa
LPE	Lysofosfatidylethanolamin
NAG	N-acetylglukosamin
NAM	Kyselina N-acetylmuramová
PBP	Protein vázající penicilin (z angl. penicilin binding protein)
PE	Fosfatidylethanolamin
PISD	Fosfatidylserin-dekarboxylasa
pRb	Retinoblastomový protein
PS	Fosfatidylserin
RFP	Červený fluorescenční protein (z angl. red fluorescent protein)
RMS	Rabdomyosarkom
ROS	Kyslíkový radikál
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus (z angl. single nucleotide polymorphism)

## Obsah

1 Úvod.....	1
2 Beta-laktamasy a proteiny vázající penicilin.....	2
2.1 Stavba buněčné stěny bakterií .....	2
2.2 Proteiny vázající penicilin.....	4
2.3 Beta-laktamasy .....	4
3 Proteiny podobné beta-laktamasam v eukaryotických buňkách .....	6
3.1 Identifikace LACTB.....	6
3.2 Lokalizace LACTB v buňce.....	7
3.3 Organizace LACTB.....	9
4 Vztah LACTB a obezity.....	9
4.1 Obezita ve světě.....	9
4.2 Genetická složka obezity.....	10
5 Vztah LACTB a nádorových onemocnění .....	11
5.1 Rbdomyosarkom a jiná vzácná nádorová onemocnění .....	11
5.2 Tumor supresorové geny .....	11
5.3 LACTB jako tumor supresor.....	12
5.4 Mechanismus působení LACTB .....	16
5.4.1 Vztah mezi LACTB a fosfatidylserin-dekarboxylasou (PISD) .....	17
5.4.2 Vliv mutace R469K na funkci LACTB .....	19
6 Závěr.....	19
7 Seznam literatury.....	21

# 1 Úvod

Nádorová onemocnění mohou postihnout téměř jakoukoliv tkáň lidského těla a patří spolu se srdečními chorobami k nejčastějším příčinám smrti v Evropě. Podle Eurostatu zapříčila v roce 2013 nádorová onemocnění 265 úmrtí na 100 000 obyvatel. Oproti roku 2004 se sice jedná o 11% snížení u mužů a 5,9% snížení u žen, bohužel čísla zůstávají stále vysoká. I proto je do výzkumu nádorových onemocnění investováno nemalé množství financí, úsilí a času [1]. Důvody vzniku nádorů jsou různé. Nejčastější příčinou je působení nějakého genotoxického jevu – ionizujícího záření, chemických látek nebo virů. Rozvoj onemocnění může být urychlen přítomností některých dědičných mutací v důležitých genech nebo přítomností epigenetických faktorů ovlivňujících expresi genetické informace. Buňky, u kterých dojde k transformaci v nádorové, se vyznačují především nekontrolovatelným růstem napříč hierarchickým výstavbovým plánem organismu. Dochází u nich k autonomii v produkci růstových signálů a snížení citlivosti na inhibiční signály, k poruchám v reparaci DNA a následné genomové nestabilitě. Také získávají schopnost tkáňové invazivity a metastazování.

Lidské tělo má naštěstí mechanismy, kterými se dokáže vzniku nádorů bránit. Jedním z nich je exprese tak zvaných tumor supresorových genů, které zabraňují vzniku nádorových buněk. Většina těchto genů byla objevena při výzkumu častých typů nádorových onemocnění, jako je karcinom prsu či plic. V nedávné době naopak došlo k objevu nového tumor supresoru při výzkumu tkání, ve kterých se nádory vyskytují jen zřídka – konkrétně kosterního svalstva u dospělého člověka. Tento tumor supresor je LACTB, mitochondriální protein, který je homologem bakteriálních beta-laktamas. Shromáždění informací o tomto proteinu je věnována tato bakalářská práce.

## 2 Beta-laktamasy a proteiny vázající penicilin

### 2.1 Stavba buněčné stěny bakterií

Buněčná stěna vytváří pevný obal, který chrání buňku před vnějšími vlivy a udržuje její tvar. Najdeme ji u *Archaea*, většiny bakterií (pouze rod *Mycoplasma* ji nemá, místo toho je chráněn třívrstvou plazmatickou membránou [2]), u řas, rostlin a hub. Stavba buněčné stěny se liší mezi jednotlivými skupinami organismů a může záviset i na vývojovém stádiu daného organismu (obr. 1).

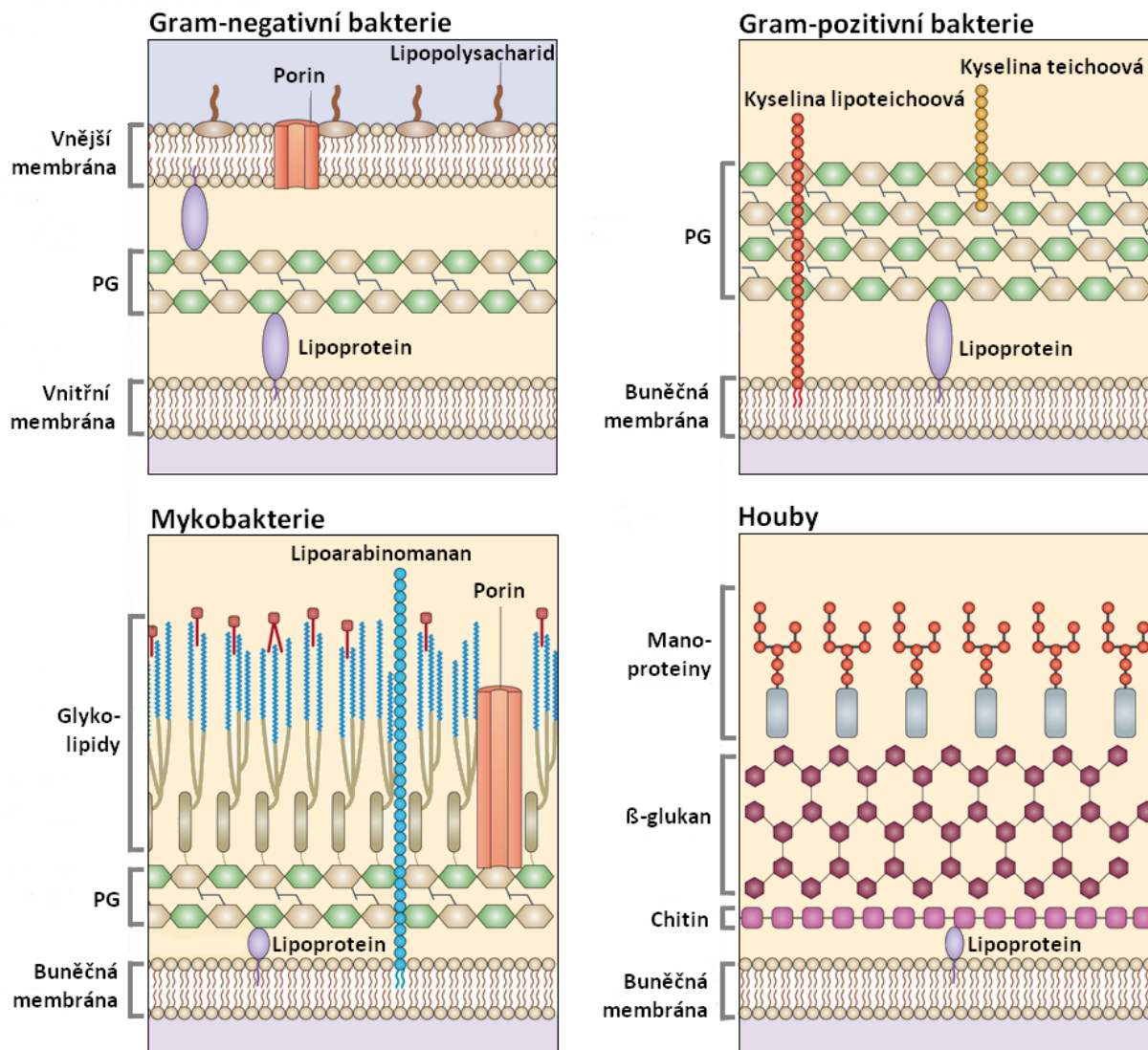
Buněčná stěna rostlin se může skládat až ze tří vrstev – střední lamely, primární stěny a sekundární stěny. Střední lamela se objevuje již během dělení buňky a určuje, kde se bude následně nacházet buněčná stěna. Je tvořena fúzováním váčků z Golgiho aparátu obsahujících pektin. Následně směrem do středu buňky od střední lamely vzniká primární stěna, která je tenká a je tvořena především celulosou, hemicelulosou a pektinem. V některých typech rostlinných buněk po ukončení růstu buňky vzniká navíc sekundární stěna, která má především funkci mechanického zpevnění buněk [3].

Buněčná stěna hub obsahuje především chitin, glukany a proteiny (často jsou glykosylovány a spojeny s manosou, jedná se tedy o manoproteiny). Na rozdíl od rostlinných buněk, buněčná stěna hub neobsahuje celulosu [4].

Stavba buněčné stěny řas je různorodá. Nejčastějšími stavebními prvky jsou polysacharidy (celulosa) a glykoproteiny. Přesné složení buněčné stěny se často používá k taxonomickému zařazení organismu [5].

Bakteriální buněčná stěna je tvořena především peptidoglykanem. Podobné složení má i buněčná stěna u *Archaea*, tam se ovšem jedná o tzv. pseudopeptidoglykan [6].

Peptidoglykan je komplex tvořený N-acetylglukosaminem a kyselinou N-acetylmuramovou spojenými navzájem glykosidickými vazbami. Tato struktura je velice pevná a odolná, ale dostatečně volná k poskytnutí pohybu menších částic až do velikosti 2nm [7]. Lze ji přirovnat například ke struktuře drátěného plotu [8]. Procentuální zastoupení množství peptidoglykanu v buněčné stěně se ale liší u jednotlivých druhů bakterií, obecně patří k jednomu ze zásadních rozdílů mezi gram-pozitivními a gram-negativními bakteriemi [9].



Obr. 1: Stavba buněčné stěny gram-negativních bakterií, gram-pozitivních bakterií, mykobakterií a hub. Buněčná stěna gram-negativních bakterií obsahuje tenkou vrstvu peptidoglykanu v perioplazmatickém prostoru mezi vnější a vnitřní membránou. Naopak v ostatních zobrazených organismech vnější membrána chybí. U gram-pozitivních bakterií ji nahrazuje silnější vrstva peptidoglykanu, u mykobakterií se nachází nad peptidoglykanem ještě glykolipidy. Buněčná stěna hub má zcela odlišné složení, peptidoglykan je nahrazen chitinem, beta-glukanem a manoproteiny [9]. (obrázek upraven podle [9])

## 2.2 Proteiny vázající penicilin

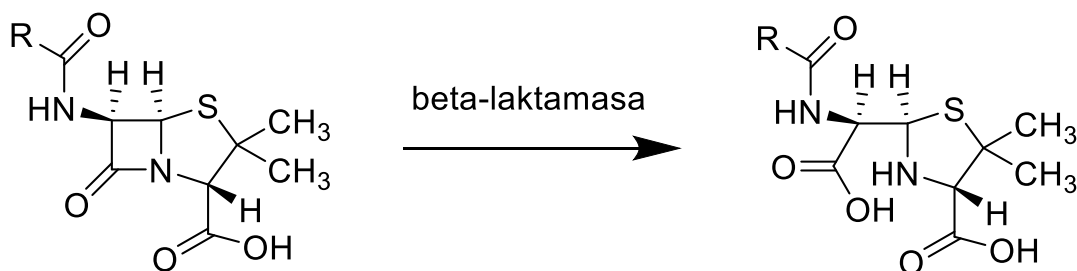
V syntéze peptidoglykanu hrají nezastupitelnou roli proteiny vázající penicilin (PBPs – penicilin binding proteins). Ty katalyzují transglykosylaci (polymeraci glykanového řetězce) a transpeptidaci (zesíťování řetězců) [10]. Syntéza peptidoglykanu začíná již v cytoplazmě. Tam je kyselina N-acetylmuramová (NAM) spojena s pentapeptidem (přesná sekvence aminokyselin se liší mezi jednotlivými druhy bakterií [7]) a N-acetylglukosaminem (NAG). Na připojování pentapeptidu se podílí speciální enzymy; ribosomy a tRNA se procesu neúčastní. Pentapeptid-NAM-NAG prekurzor je poté transportován na vnější stranu plazmatické membrány. Tam je pomocí PBPs připojen k rostoucímu konci peptidoglykanového řetězce (proces transglykosylace). Zesíťování je dosaženo odstraněním poslední aminokyseliny z pentapeptidu a jeho připojením k jinému aminokyselinovému řetězci [11].

Mechanismem účinku můžeme PBPs zařadit mezi acyl serinové transferasy. Aktivní serin se nachází ve vysoce konzervovaném motivu SXXK. Tam dochází k acylaci a deacylaci serinu a následnému vzniku kovalentní vazby se substrátem. Kromě tohoto motivu obsahují všechny PBPs ještě dva, rovněž vysoce konzervované motivy: (S/Y)XN a (K/H)(T/S)G. První se účastní hydrolyzy a druhý se podílí na vazbě substrátu [12]. PBPs můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin – vysokomolekulární a nízkomolekulární. Vysokomolekulární se podílejí na polymeraci peptidoglykanu a jeho vkládání do již existující buněčné stěny. Nízkomolekulární PBPs fungují jako transpeptidasy – hydrolyzují poslední aminokyselinu pentapeptidu. Obě skupiny PBPs se dále dělí na podskupiny A, B a C na základě sekvenční podobnosti [13].

Jak již název napovídá, PBPs jsou místem působení penicilinových antibiotik a dalších látek obsahujících beta-laktamový kruh. Mechanismus působení je celkem jednoduchý – dochází k acylaci serinového zbytku v aktivním místě, PBP ztrácí schopnost transpeptidasové aktivity a stavba buněčné stěny je tak inhibována [12].

## 2.3 Beta-laktamasy

Penicilinová antibiotika od svého objevu před 70 lety zachránila nespočet životů. Bohužel, jejich časté a mnohdy nekontrolované používání vedlo k selekci resistantních patogenů. Jedna z možných cest vzniku resistance je syntéza proteinů velmi sekvenčně podobné PBPs – beta-laktamas, které inaktivují antibiotika hydrolyzou peptidové vazby v beta-laktamovém kruhu (obr. 2) [14].



Obr. 2: Účinek beta-laktamasy na penicilin. Reakčním místem penicilinu je peptidová vazba beta-laktamového kruhu. Hydrolýzou této vazby se penicilin stává neaktivním [14].

V současnosti je známo okolo 1300 různých beta-laktamas [15] a podle rozdílů ve struktuře a funkci se dají rozdělit do čtyř skupin. Tři z nich (A, C a D) jsou enzymy se serinem v aktivním místě, čtvrtá skupina (B) obsahuje enzymy, které potřebují ke své aktivitě zinek. Fylogenetické studie ukázaly, že beta-laktamasy se vyvinuly z PBPs nejspíše celkem třikrát, což ukazuje na opakovanou potřebu chránit části dráhy vedoucí k syntéze peptidoglykanu [16].

Gram-negativní bakterie v ochraně před penicilinovými antibiotiky volí hlavně cestu tvorby beta-laktamas. Penicilin proniká do bakterie volnou difuzí, nejprve skrz poriny vnější membrány, poté skrz buněčnou stěnu. To není velkým problémem, peptidoglykanová síť buněčné stěny je dostatečně volná na to, aby skrz ni pronikla malá molekula jako penicilin. Místem působení penicilinu je vnitřní membrána, kde se nachází PBPs. Předtím musí ale překonat periplazmatický prostor, kde, pokud bakterie nese gen pro syntézu beta-laktamasy je tento protein zastoupen v tisících kopiích. Například buňka *E. coli* nesoucí plasmid RP4 obsahuje v periplazmě 65 tisíc kopií beta-laktamasy [14].

U gram-pozitivních bakterií se dlouho předpokládalo, že v otázce vzniku resistance volí jinou strategii. Až nedávná studie z roku 2016 ukázala, že i v těchto mikroorganismech lze najít beta-laktamasy a to konkrétně takové, které by se daly zařadit do skupiny D. Výzkum popsáný v tomto článku se zaměřil na tři rodiny bakterií – *Bacillaceae*, *Clostridiaceae* a *Eubacteriaceae*. Nejčastěji se beta-laktamasy vyskytovaly v *Bacillaceae*, kde byly objeveny v nejméně 12 druzích rodu *Bacillus* [17].

Bakteriální infekce stále zůstávají nejčastější příčinou úmrtí, ročně ukončí miliony životů. Odhaduje se, že v roce 2050 globální míra úmrtnosti v důsledku bakteriálních infekcí by vzrostla na 10 milionů za rok, pokud by se nijak neřešila stále se zvyšující resistance mikroorganismů

na antibiotika. Vývoji nových, modifikovaných antibiotik je tak věnováno mnoho úsilí a financí. Do klinických zkoušek je v současnosti zařazeno zhruba 150 nových látek, z toho modifikovaná beta-laktamová antibiotika tvoří zhruba 60% [17].

### 3 Proteiny podobné beta-laktamasam v eukaryotických buňkách

#### 3.1 Identifikace LACTB

V roce 2001 byly na základě procházení databází nalezeny u myši části exprimované mRNA (ESTs – expressed sequence tags) se signifikantním skóre vůči bakteriálním beta-laktamasam, což ukazovalo na to, že by se mohlo jednat o jejich nové savčí homology. Žádné takové do té doby objeveny nebyly. Pomocí primerů navržených podle EST byla z myších jater naklonována cDNA v celé délce – ta kódovala 551 aminokyselin dlouhý protein (obr. 3). Tento gen byl pojmenován *Lactb* a s použitím mapování radioaktivním hybridem byl lokalizován na myším chromozomu 9 ve vzdálenosti 40,5 cR od markeru D9MIT64. Celý gen je dlouhý 14 735 bp a obsahuje 6 exonů [18].

Lidský protějšek myšního genu *Lactb* byl nalezen na chromozomu 15q22.1, obsahuje 8 exonů [18]. Myší a lidský LACTB mají 90% aminokyselinovou sekvenční identitu. Při porovnání bez prvních sta aminokyselin se sekvenční identita zvýší až na 95%. Pokud navíc vezmeme v potaz, že pozice obou genů na chromozomech je syntenická, je jisté, že myší a lidský LACTB jsou opravdu ortology. Další homology byly nalezeny v sekvenčních datech jiných organismů – potkanovi, krávi, králíkovi, praseti, ropuše, zebřičce a háďátku. Překvapením je, že se nenašly v modelových organismech jako *Drosophila melanogaster* nebo *Saccharomyces cerevisiae* [18].

Analýzou pomocí northern blotu bylo zjištěno v jakých tkáních se LACTB nejvíce exprimuje. U myši to bylo v játrech, srdci a kosterním svalstvu, o něco méně pak v ledvinách, mozku a plicích. U člověka byla pozorována poměrně velká exprese v kosterním svalstvu a v mozku. V játrech naopak byla podstatně menší než u myši [18].

Po identifikaci LACTB dlouho zůstávalo otázkou, proč lze i v obratlovcích najít homolog beta laktamas a PBPs, když eukaryotické buňky nemají dráhy vedoucí k syntéze peptidoglykanu. Co je tedy funkcí LACTB?

10	20	30	40	50
MYRLMSAVTA	RAAAPGGLAS	SCGRRGVHQR	AGLPPLGHGW	VGGLGLGLGL
60	70	80	90	100
ALGVKLAGGL	RGAAPAQSPA	APDPEASPLA	EPPQEQSLAP	WSPQTPAPPC
110	120	130	140	150
SRCFARAIES	SRDLLHRIKD	EVGAPGIVVG	VSVDGKEVWS	EGLGYADVEN
160	170	180	190	200
RVPCKPETVM	RIASISKSLT	MVALAKLWEA	GKLDLDIPVQ	HVYPEFPEKE
210	220	230	240	250
YEGEKVSVTT	RLLIHLSGI	RHYEKDIKKV	KEEKAYKALK	MMKENVAFEQ
260	270	280	290	300
EKEGKSNEKN	DFTKFKTEQE	NEAKCRNSKP	GKKKNDFEQG	ELYLREKFEN
310	320	330	340	350
SIESLRLFKN	DPLFFKPGSQ	FLYSTFGYTL	LAAIVERASG	CKYLDYMQKI
360	370	380	390	400
FHDLMLTTV	QEENEPVIYN	RARFYVYNKK	KRLVNTPYVD	NSYKWAGGGF
410	420	430	440	450
LSTVGDLLKF	GNAMLYGYQV	GLFKNSNENL	LPGYLKPETM	VMMWTPVPNT
460	470	480	490	500
EMSWDKEGKY	AMAWGVVERK	QTYGSCRKQR	HYASHTGAV	GASSVLLVLP
510	520	530	540	
EELDTETINN	KVPPRGIIVS	IICNMQSVGL	NSTALKIALE	FDKDRSD

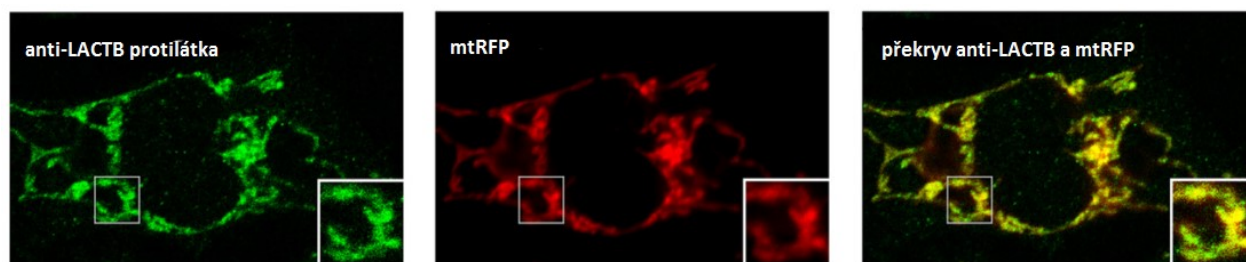
Obr. 3: Sekvence lidského LACTB. Barevně jsou vyznačeny konzervované motivy, které mají PBPs a beta-laktamasy a stejně tak je má i LACTB. Červeně je označen motiv SXXK, ve kterém se nachází aktivní serin, zeleně motiv (S/Y)XN a modře motiv (K/H)(T/S)G [19].

### 3.2 Lokalizace LACTB v buňce

Mitochondrie, která se vyvinula z endosymbiózy s gram-negativní bakterií, se stala trvalou součástí eukaryotické buňky [20]. Proto také v mitochondrii najdeme stavební prvky podobné těm bakteriálním – například stejnou organizaci DNA, dvojitou membránu a taktéž stejné principy základního metabolismu. Co naopak mitochondrie nemá, je vrstva peptidoglykanu mezi vnější a vnitřní membránou, která by jí zajišťovala pevnost a tím ochranu před mechanickým stresem. Nic takového díky svému umístění uvnitř eukaryotické buňky nepotřebuje [21].

Protein LACTB, který je exprimován u savců v mnoha různých tkáních, je homologem PDPs a beta-laktamasy, které se v bakterii podílejí právě na dráze vedoucí k syntéze peptidoglykanu. To by napovídalo, že umístění LACTB by mohlo být v mitochondrii. Bohužel proteomické studie se na tom příliš neshodovaly. Některé ukazovaly na to, že LACTB se nachází

v mitochondrii [22–24], jiné uváděly, že LACTB se nachází v cytoplazmě [25, 26]. Proto se finští vědci v publikaci z roku 2009 zaměřili na experimentální ověření lokalizace LACTB. Nejprve detekovali endogenní expresi LACTB pomocí protilátky proti LACTB a to v buňkách HeLa modifikovaných tak, aby ve svých mitochondriích produkovaly červený fluorescenční protein (RFP). Protože se signály RFP a protilátky proti LACTB překrývaly, potvrdilo se, že LACTB je lokalizován v mitochondrii (obr. 4) [19].



Obr. 4: Lokalizace LACTB v buňce pomocí konfokální mikroskopie. Na prvním obrázku je vizualizován LACTB pomocí anti-LACTB protilátky, na druhém jsou vizualizovány mitochondrie pomocí červeného fluorescenčního proteinu (RFP). Překrytí obou signálů potvrzuje umístění LACTB v mitochondrii. Použity buňky HeLa exprimující mtRFP (mitochondriální RFP) [19]. (obrázek upraven podle [19])

Dalším krokem bylo určení, ve kterém konkrétním mitochondriálním kompartmentu se LACTB nachází. Mitochondrie byly inkubovány s trypsinem a digitoninem tak, aby došlo k rozrušení pouze vnější membrány. Pomocí western blotu bylo ukázáno, že LACTB po solubilizaci vnější membrány je dostupné a nachází se tedy v mezimembránovém prostoru – například jako AIF (faktor indukující apoptózu) [27]. K určení, zda je LACTB rozpustným nebo integrálním membránovým proteinem, byly mitochondrie ošetřeny uhličitanem sodným a následně centrifugovány tak, aby došlo k precipitaci membrán. Western blot výsledných frakcí bylo ukázáno, že LACTB byl kompletně oddělen od membránových markerů – porinu a prohibitinu. LACTB je tedy rozpustným proteinem [19].

Pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že mitochondriální LACTB se tvoří z preproteinu odštěpením 62 aminokyselin z N-konce. Aminokyselinová sekvence tak začíná motivem AVPI, který taktéž mají i další proteiny z mezimembránového prostoru mitochondrií [28]. Před místem štěpení se nachází úsek 23 hydrofobních aminokyselin, což napovídá tomu, že se signální sekvence odštěpuje nadvrát. Nejprve se mitochondriální peptidasou odštěpí

první část signální sekvence a poté na vnitřní membráně mitochondrie dojde ke druhému štěpení zbytku sekvence další proteasou. Tento princip je u proteinů mezimembránového prostoru poměrně častý [29].

### **3.3 Organizace LACTB**

Po provedení nativního western blotu s proteiny z mezimembránového prostoru s protilátkou proti LACTB, se objevily proužky s velikostí od 600 kDa do několika MDa. Nicméně při denaturovaném provedení western blotu proužek označený protilátkou proti LACTB byl jen jeden a měl velikost 55 kDa. Hmotnostní spektrometrií bylo potvrzeno, že tento proužek obsahuje pouze LACTB, a tudíž LACTB pravděpodobně vytváří homopolymery [19]. Struktura tohoto polymeru byla studována pomocí elektronové mikroskopie. Ta ukázala, že LACTB opravdu polymeruje a vytváří filamenta, která jsou složena z tetramerních podjednotek. Dalším výzkum ukázal, že filamenta se tvoří přímo v mitochondriálním mezimembránovém prostoru a že jsou asociována s vnitřní membránou [19].

Aminokyselinová sekvence LACTB byla analyzována prediktorem strukturních motivů pro protein-proteinové interakce. Byla nalezena část sekvence s velkým počtem nabitých a hydrofobních aminokyselin, která pravděpodobně vytváří smyčku zodpovědnou za polymerizaci LACTB. U PBPs a beta-laktamas se ale tento motiv nevyskytuje. Polymerizace je tedy pravděpodobně unikátním rysem LACTB a jeho živočišných ortologů [19].

## **4 Vztah LACTB a obezity**

### **4.1 Obezita ve světě**

Obezita je jedním z nejčastějších civilizačních onemocnění a je často asociována se zvýšeným rizikem diabetu druhého typu, srdečních chorob, hypertenze, mrtvice a některých druhů nádorových onemocnění. V roce 2013 celosvětově trpělo nadváhou nebo obezitou 2,1 miliardy lidí, zatímco v roce 1980 to bylo pouhých 850 milionů [30].

Obezita se obvykle určuje podle BMI (index tělesné hmotnosti), který se vypočítá jako tělesná hmotnost daného člověka (v kg) dělená druhou mocninou jeho výšky (v m<sup>2</sup>). Za nadváhu se bere BMI vyšší než 25 kg/m<sup>2</sup> a za obezitu vyšší než 30 kg/m<sup>2</sup>. Jedná se o hodnoty běžně uznávané v evropské a americké společnosti. Asiáté používají hodnoty nižší, obezita u nich

začíná na 27,5 kg/m<sup>2</sup> [31]. Taktéž se BMI nedá dobře vztáhnout na aktivní sportovce, kteří mají velký objem svalové hmoty. Mohou pohybovat v kategorii nadváhy, přestože díky nízkému objemu tukové tkáně nemají zvýšená rizika např. kardiovaskulárních onemocnění.

Příčiny obezity jsou často snadno odhalitelné – přílišný energetický příjem a nedostatek pohybu [32]. Pouze malé množství případů je způsobeno primárně genetickými predispozicemi, zdravotními problémy nebo psychickou poruchou [33]. Nárůst počtu obézních lidí souvisí především se zrychlením životního stylu, zvýšením potřeby používání automobilů a mechanizací většiny prací, které dříve vyžadovaly lidskou fyzickou aktivitu [34].

## 4.2 Genetická složka obezity

Na základě studií dvojčat a adoptovaných dětí bylo potvrzeno, že geny mohou ovlivnit náchylnost jedince k obezitě [35, 36]. Dědičnost je jistě důležitým rizikovým faktorem vzniku obezity, různé studie se ale bohužel neshodují v tom, jak velký je vliv dědičnosti. Co se ale zdá dobře ověřené je, že matka má větší vliv [37] a že přírůstek váhy matky v těhotenství koreluje s BMI dítěte v dospělosti [38]. V roce 2010 finský vědec Silvetoinen tyto a další podobné studie shrnul a došel k závěru, že genetické faktory mohou mít větší vliv než ty environmentální a to až do 18 let věku dítěte [39].

K hledání genů spojených s obezitou se používají především různé bioinformatické metody. Nejčastějším přístupem je tak zvaná přímá genetika – tedy snaha nalézt konkrétní gen, jehož změna je odpovědná za daný znak fenotypu nemoci. Genů spojených s obezitou bylo do dnešní doby nalezeno mnoho, vyskytují se na všech lidských chromozomech. [40] Vědci ze Spojených států amerických v roce 2008 přišli s jiným přístupem. Zkusili vytvořit síť genů, u kterých zjistili, že by mohly být navzájem propojené a hledali síť, jejíž změna by ovlivnila všechny fenotypické znaky obezity – množství glukosy, volných mastných kyselin, triglyceridů a cholesterolu, přírůstek váhy a lézi aorty [41]. V jedné z takto vytvořených sítí genů se našly i tři nové geny, dosud neasociované s obezitou – *Lpl* (lipoprotein-lipasa), *Lactb* a *Ppm1l* (protein podobný protein-fosfatase-1). Souvislost všech tří genů s obezitou byla následně potvrzena i experimentálně – *in vivo* na trasgenních myších. *Lactb* transgenní myši, exprimující více LACTB než je endogenní exprese LACTB, přibíraly tukovou hmotu rychleji v porovnání s kontrolními zvířaty – po 7 týdnech se jednalo o 20% nárůst. Tato studie bohužel také nevysvětluje, jak přesně LACTB souvisí se vznikem obezity, ukazuje však, že LACTB je pravděpodobně zapojen do metabolických procesů [41].

## 5 Vztah LACTB a nádorových onemocnění

### 5.1 Rabdomyosarkom a jiná vzácná nádorová onemocnění

Rabdomyosarkom (RMS) je agresivní maligní nádor kosterního svalstva, prvně popsán v roce 1945 německým lékařem Weberem a oficiálně klasifikovaným o rok později [42]. RMS postihuje v podstatě jen děti, u osob starších osmnácti let se téměř nevyskytuje (celosvětově se jedná o 10 až 20 případů ročně) [43]. U dětí se naopak jedná o nejčastější sarkom měkké tkáně a celkově o třetí nejčastější pevný (solidní) nádor. Ročně přibude kolem 40 000 nových pacientů [44]. U většiny případů nelze jednoznačně určit žádný rizikový faktor, který by stál za vznikem RMS. Zdá se, že často vzniká sporadicky, bez zjevné příčiny. Nicméně, RMS byl zatím dán výzkumem do souvislosti s některými syndromy a vrozenými vadami – neurofibromatóza typu I [45], Beckwith-Wiedemannův syndrom [46], Li-Fraumeniho syndrom [47] a Costellův syndrom [48]. Také je vznik RMS spojován s užíváním kokainu a marihuany u rodičů [49].

Léčba RMS je multidisciplinární proces, zahrnující chirurgický zákrok, chemoterapii, ozařování a občas i imunoterapii. Naděje na uzdravení je v případě, že se nejedná o metastáze, kolem 70%, bohužel v případě vzniku metastáz klesá pod 20% [50].

Vzácnost vzniku RMS u dospělých osob je zajímavým jevem. Kromě kosterního svalstva existují i další tkáně, ve kterých se nádory téměř nevyskytují, jako například srdce a slezina. Zdá se, že buňky těchto tkání jsou v podstatě protikladem buněk nádorových [51]. Myogenní prekursor musí například nevratně vystoupit z buněčného cyklu, aby se staly zralými myotubuly. Zůstávají diferencované, nemnoží se a to znemožňuje jejich zvrát v nádorové [52].

### 5.2 Tumor supresorové geny

Tumor supresorové geny brání buňce v přeměně na nádorovou. Mutace v těchto genech a následná ztráta jejich funkce bývá častou molekulární příčinou vzniku nádorového onemocnění [53]. Prvním objeveným tumor supresorem byl retinoblastomový protein (pRb) v roce 1971 [54]. pRb je proteinem vázajícím DNA a hraje významnou roli v regulaci transkripčních faktorů – je schopen tlumit buněčné dělení. Mutace v genu kódující pRb je příčinou vzniku retinoblastomu, zhoubného nádoru oční sítnice, který může být jak dědičné, tak nedědičné povahy [55].

Dalším, pravděpodobně nejznámějším tumor supresorem, je transkripční faktor p53. Byl pojmenován podle toho, že na elektroforéze v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) vykazuje zdánlivou

molekulovou hmotnost 53 kDa. Ale jelikož obsahuje vysoké procentuální zastoupení aminokyseliny prolinu zpomalující migraci proteinu v gelu, je reálná molekulová hmotnost p53 43 kDa [56]. Protein p53 bývá bez nadsázky nazýván strážcem genomu díky jeho roli v udržování stability díky předcházení vzniku genomových mutací. p53 vyhledává poškozená místa na DNA a v okamžiku, kdy nějaké nalezne, spustí transkripci genu p21 (ten tlumí činnost cyklin-dependentních kinas). Dokud není dané místo opraveno, je zastaven buněčný cyklus [57].

Protein p53 je kódován genem *TP53* lokalizovaným na krátkém rameni chromozomu 17 (17p13.1) [57, 58]. Pokud je tento gen poškozen, je ochrana lidského těla před vznikem nádorů vážně ohrožena. Dochází ke zvýšení pravděpodobnosti zahájení nekontrolovaného dělení buněk a možnému vzniku aneuploidie [59]. Zděděné poškození jedné kopie genu se nazývá Li-Fraumeniho syndrom – jedinci jím trpící jsou náchylní ke vzniku nádorů už od útlého dětství [60]. *TP53* může být také poškozen chemickými mutageny nebo radiací. Přibližně 50% vzniku nádorů u člověka je spojeno s mutací *TP53* [61].

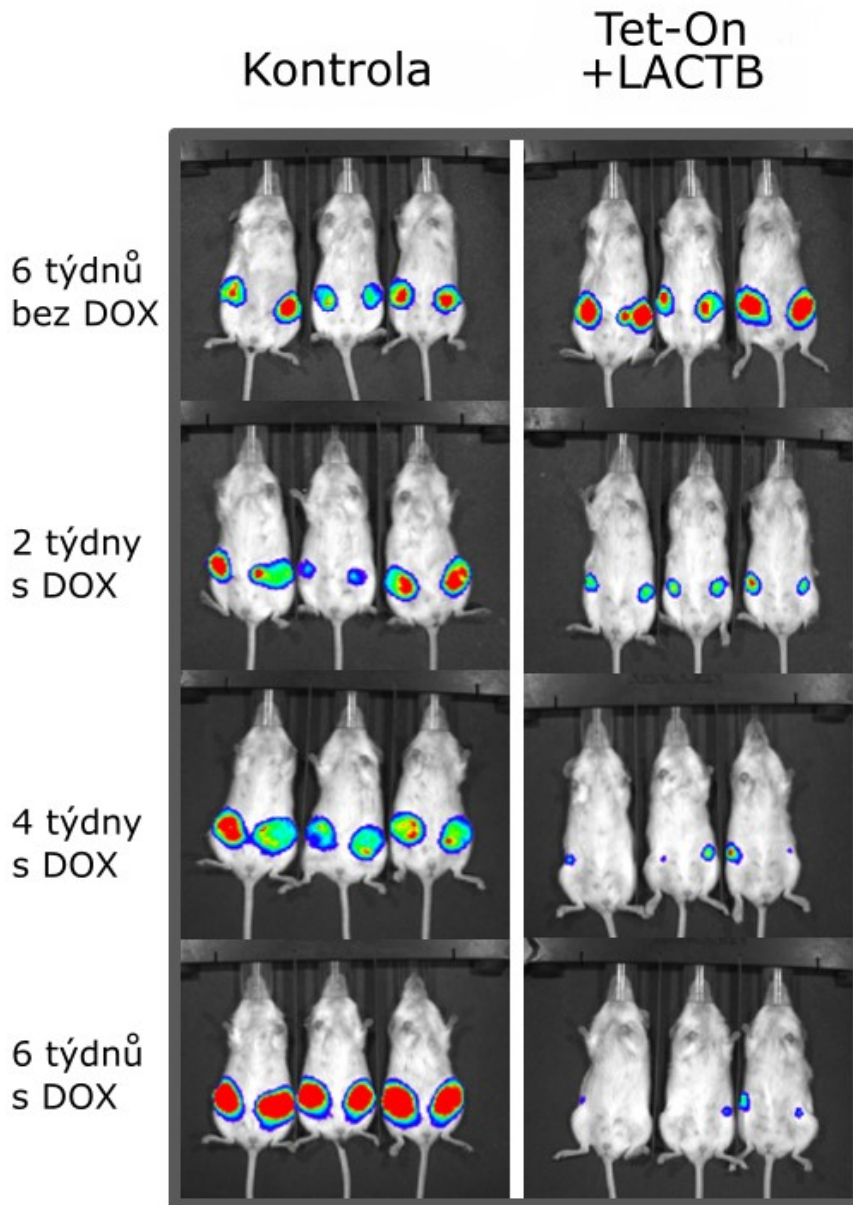
Dalšími tumor supresory jsou například pVHL (von Hippel-Lindauho tumor supresor), jehož mutace je spojována se vznikem nádorů v oku, mozku a míše [62] nebo receptor pro ligand Fas (CD95), který navázáním ligandu Fas spouští apoptózu [63].

### **5.3 LACTB jako tumor supresor**

Na nové tumor supresorové geny se přichází stále, většinou během hledání příčiny vzniku nějakého nádoru. Zuzana Kečkovéšová se ale ve své práci z roku 2017 vydala úplně jiným směrem a zaměřila se na to, co zabraňuje vzniku vzácných nádorových onemocnění, jako vznik rhabdomyosarkomu u dospělých osob. Provedla analýzu exprese genů v postmitotických (diferencovaných) a mitotických (nediferencovaných) buňkách kosterního svalstva a získala 87 genů, které byly signifikantně více exprimované v buňkách diferencovaných. Tyto geny by potencionálně mohly být zapojeny v inhibici buněčného cyklu nebo v indukci diferenciaci buňky a to bych z nich dělalo kandidáty na tumor supresorové geny. Z nalezených genů bylo pět vybráno pro další analýzu – mezi nimi i LACTB. Geny byly exprimovány v buňkách nádoru prsu a bylo sledováno chování těchto buněk, především jejich rychlost proliferace. V buňkách, ve kterých byl exprimován LACTB, došlo k výrazné změně – buňky se přestaly množit a začaly se diferenciovat. Ostatní geny buňky nijak neovlivnily a tak byl pouze LACTB vybrán k dalšímu studiu [51].

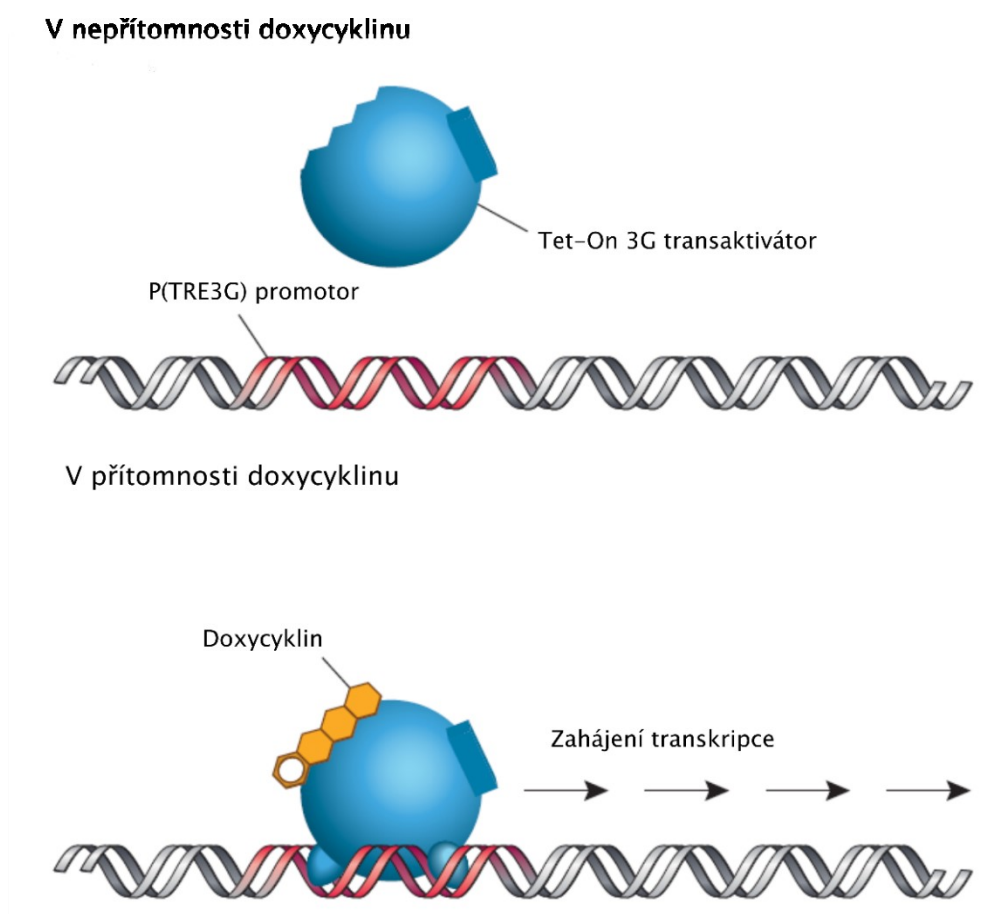
Výsledky dalších testů potvrdily hypotézu toho, že LACTB je opravdu tumor supresorem. Bylo porovnáno množství LACTB v tumorigenních a netumorigenních buněčných liniích. V 15 z 18 testovaných buněčných linií z nádoru prsu bylo signifikantně menší množství LACTB než v liniích ze zdravé tkáně. V dalších dvou se nacházel LACTB s mutací R469K (jedná se o tranzici guaninu za adenin na druhé pozici tripletu kódující 469 aminokyselinu arginin). Pouze jedna tumorigenní linie vykazovala stejné množství wild-type LACTB jako bylo v netumorigenních liniích [51].

LACTB je schopný zastavit růst nádoru a dokonce již narostlý nádor zmenšit. To bylo prokázáno na myších, do kterých byly vpraveny buňky karcinomu prsu s expresí LACTB indukovanou doxycyklinem (Tet-On systém). Nádory se nechaly narůst do velikosti zhruba 10 mm v průměru a poté byl do myši vpraven spolu se stravou doxycyklin. LACTB se začal v buňkách exprimovat a nádory se po 2-3 týdnech signifikantně zmenšily, některé dokonce po 6 týdnech zcela zmizely (obr. 5) [51].



Obr. 5: Zobrazení růstu nádorů. Do kontrolních myší byly vpraveny buňky karcinomu prsu. Do dalších myší byly vpraveny buňky karcinomu prsu s expresí LACTB indukovatelnou doxycyklinem (Tet-On systém). Myši byly nejprve pozorovány po šest týdnů bez přidání doxycyklinu (DOX). Poté byl do myší spolu se stravou vpraven DOX (LACTB se tedy začal exprimovat) a myši byly pozorovány po dalších šest týdnů. U kontrolních myší se nádory stále zvětšovaly. U myší, v jejichž nádorech se exprimoval LACTB, došlo ke zmenšení nádorů (až téměř k jejich vymizení) [51]. (obrázek upraven podle [51])

Derivát tetracyklinu doxycyklin, který byl pro pokus použit, je antibiotikum používané při léčbě mnoha různých onemocnění jako chlamydiová infekce, syfilis nebo cholera [64]. Ve výzkumu se doxycyklin používá v takzvaných systémech Tet-On a Tet-Off (obr. 6). Jedná se o systémy indukované genové exprese, kdy je transkripce reverzibilně zapnutá (Tet-On) nebo vypnutá (Tet-Off) v přítomnosti doxycyklinu nebo tetracyklinu. Tyto systémy byly vynalezeny na základě výzkumu resistance gram-negativních bakterií na tetracyklin. Oproti jiným podobným systémům mají Tet-On a Tet-Off výhodu především v tom, že jsou reverzibilní a transkripce je dobře kontrolovatelná [65].



Obr. 6: Nákres mechanismu Tet-On systému. Za P(TRE3G) promotorem je vložen gen zájmu. Promotor je spouštěn Tet-On 3G transaktivátorem, který na něj nasedá pouze v přítomnosti doxycyklinu. Tet-Off systém funguje podobně, ale transaktivátor nasedá na promotor pouze v nepřítomnosti doxycyklinu [65].

Role LACTB jako tumor supresoru byla také ověřena jeho knockdownem (snížením exprese). Pokud buňka přestala exprimovat LACTB, žádná znatelná změna nenastala. Ovšem po zavedení onkogenu se buňka zvrhla v nádorovou (pokud byl jen zaveden onkogen a exprese LACTB zůstala stále stejná, buňka se nádorovou nestala) [51]. Takto přesně fungují tumor supresory – k tomu, aby došlo ke vzniku nádoru, je vždy potřeba, aby byl v buňce přítomný nějaký onkogen, ale aby zároveň byl poškozený tumor supresor. To představuje jeden ze základních ochranných mechanismů buněk před vznikem nádorového onemocnění [53].

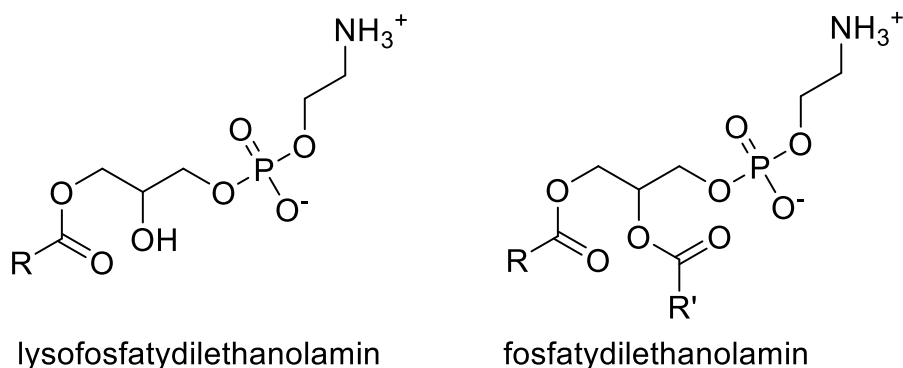
#### **5.4 Mechanismus působení LACTB**

Po indukci exprese LACTB buňky karcinomu prsu mění svou morfologii a tento proces je dobře pozorovatelný i pod mikroskopem [51]. Původně epiteliální buňky se totiž nádorovým zvratem dediferencují a připomínají pak spíše buňky mezenchymální [66]. Zvýšená exprese LACTB je pak přiměje opět diferencovat a tím sníží jejich tumorogenicitu. Dalším tématem výzkumu bylo nalezení buněčných procesů vedoucích tomuto účinku. Vzhledem k tomu, že LACTB je umístěno v mitochondrii, se jejich pozornost obrátila nejprve ke změnám v produkci ATP nebo ROS (kyslíkových radikálů). Chtěli ověřit, zda LACTB nebrání proliferaci například potlačením syntézy ATP. Když sledovali mitochondrie po jednom dni od zvýšení exprese LACTB, žádné změny v produkci ATP a ROS nebyly pozorovány. Taktéž nedošlo k žádným změnám v mitochondriálním potenciálu či změně počtu mitochondrií a jejich tvaru. Určité změny byly pozorovány až po delší době (3-6 dní). To vedlo autory studie k závěru, že LACTB nezpůsobuje diferenciaci nádorových buněk přímo, ale přes nějakou signální dráhu [51].

Jelikož LACTB je asociováno s obezitou [41], stal se dalším předmětem výzkumu vztah LACTB a mitochondriálních lipidů. Analýza na přístroji kombinující kapalinovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) ukázala signifikantní změnu množství (konkrétně došlo ke snížení) lysofosfatidylethanolaminů (LPE) a fosfatidylethanolaminů (PE) 24 hodin po zvýšení exprese LACTB v nádorových buňkách. Množství ostatních mitochondriálních lipidů se nijak výrazně nezměnilo [51].

LPE (obr. 7) patří v membránách spíše k méně zastoupeným fosfolipidům. Jeho nejznámější role je inhibice fosfolipasy D, která je enzymem schopným degradace membrán a je aktivní v průběhu senescence [67]. Zvýšená koncentrace LPE tak oddaluje senescenci, což je fenomén prozkoumaný především u rostlin [68].

PE (obr. 7), ze kterých jsou LPE odvozeny, se v membránách nacházejí častěji, tvoří 25% všech fosfolipidů. V bílé hmotě mozku a míchy dokonce tvoří až 45% [69]. Hrají roli v cytokinezi a v tvorbě kontraktilního prstence během buněčného dělení [70]. Taktéž jsou PE důležité v zástavě krvácení nebo v sekreci lipoproteinů v játrech [71].



Obr. 7: Vzorec lysofosfatidylethanolaminu (LPE) a fosfatidylethanolaminu (PE). LPE je možné připravit z PE deacylací a naopak acylací připravit PE z LPE [69].

LPE mohou být acylací přeměněny na PE. Také mohou být z extracelulárního prostoru účinně transportovány do mitochondrie, což u PE není možné, protože savčí mitochondrie neobsahují transportéry pro import PE. PE proto musí být právě v mitochondrii vyrobeny acylací z LPE nebo dekarboxylací fosfatidylserinu (PS) [72]. Pro ověření, zda spolu opravdu souvisí exprese LACTB, snížení množství LPE a PE a diferenciaci nádorových buněk, bylo do živného média přidáno větší množství LPE a zároveň byla zvýšena exprese LACTB. Oproti kontrolním buňkám, které byly v normálním médiu a jen exprimovaly LACTB ve zvýšené míře, byla u buněk z média s LPE pozorována pětinašobně větší rychlost proliferace a buňky zůstaly dediferenciované. Přidání LPE tedy snížilo tumor supresorový účinek LACTB. Pokud se do média přidaly jen PE, tento efekt nebyl pozorován – PE se z média do mitochondrie nedostalo [51].

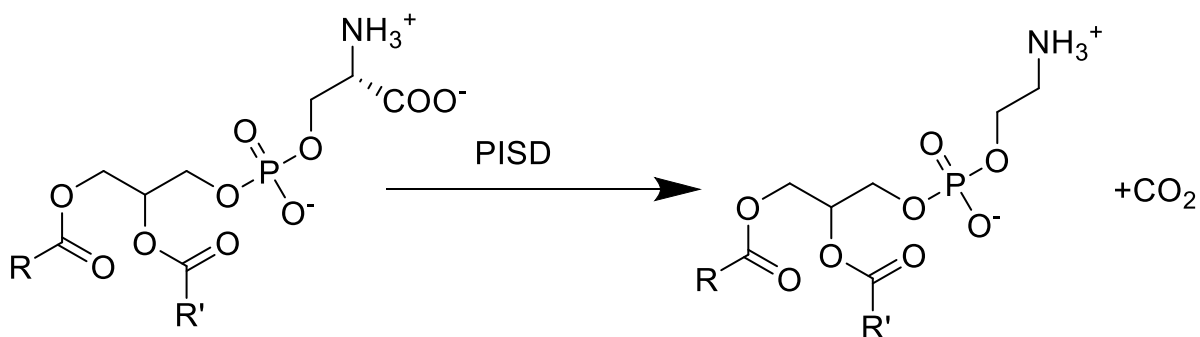
#### 5.4.1 Vztah mezi LACTB a fosfatidylserin-dekarboxylasou (PISD)

LACTB tedy ovlivňuje množství LPE a PE v membránách mitochondrie. Je tedy pravděpodobné, že LACTB reguluje aktivitu nějakého mitochondriálního proteinu zapojeného

v metabolismu LPE, PE a další fosfolipidů. Konkrétně byl objeven vztah mezi LACTB a fosfatidylserin-dekarboxylasou (PISD) [51].

PE jsou syntetizovány pomocí dvou na sobě nezávislých drah, které mají v buňkách přesně určená umístění. Cytidinfosfát-ethanolaminová dráha se nachází v endoplazmatickém retikulu a fosfatidylserin (PS) dekarboxylasová dráha v mitochondrii [73]. Ve většině tkání převládá vždy jedna z drah, zatím není jasné, proč tomu takto je. Například u křečků bylo změřeno, že většina PE v srdci pocházela z cytidinfosfát-ethanolaminové dráhy [74], zatímco PE ve vaječnicích [75] a ledvinách [76] z PS dekarboxylasové dráhy.

PS dekarboxylasová dráha se nachází na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány [77]. PE v ní syntetizované nejsou použity jen pro mitochondriální membrány, ale jsou dopravovány i na stavbu dalších buněčných membrán [73]. Hlavním enzymem této dráhy je PISD. Patří do malé skupiny dekarboxylas, které obsahují pyruvátovou prostetickou skupinu [78, 79] a přeměňuje PS na PE (obr. 8). Bylo zjištěno, že PS dekarboxylasová dráha je nesmírně důležitá pro vývoj savčího zárodka a že myši, kterým byla zničena PISD, umírají již devátý den embryonálního stádia. U fibroblastů těchto embryí byly také pozorovány fragmentované mitochondrie nestandardního tvaru [73].



Obr. 8: Přeměna fosfatidylserinu na fosfatidylethanolamin (PE) probíhající pomocí fosfatidylserin-dekarboxylasy. Jedná se o jednu z možných cest vzniku PE v mitochondrii. Druhou variantou je acylace lysofosfatidylethanolaminu [73].

Zvýšená exprese LACTB v nádorových buňkách zapříčiňuje snížení množství PISD v mitochondrii mezi 60-90%. Děje se tak po 24 hodinách od indukce exprese LACTB a jedná se o post-translační proces, jelikož množství mRNA pro PISD zůstalo v buňkách stále stejné [51].

Už dříve bylo publikováno, že i samotná inhibice PISD vede k signifikantnímu snížení rychlosti proliferace buněk [72], tedy podobnému efektu, jaký pozorujeme zvýšením exprese LACTB. Je ale velmi pravděpodobné, že LACTB ovlivňuje i další mitochondriální proteiny, nejenom PISD a jeho účinek je tedy komplexnější. Bohužel, žádné jiné takové proteiny zatím známé nejsou.

#### **5.4.2 Vliv mutace R469K na funkci LACTB**

Mutace argininu na pozici 469 na lysin byla nalezena u dvou různých linií buněk karcinomu prsu. Pokud byly buňky transfekovány vektorem obsahujícím gen *LACTB* s touto mutací, nebyl tumor supresorový efekt LACTB pozorován. Množství PISD se také nezměnilo a tedy zůstala stejná i množství PE a LPE [51]. Je ovšem zajímavé, že mutantní protein LACTB R469K štěpil klasicky fluorogenní substrát LACTB, Ac-YVAD-(7-amino-4-methylkumarin) [80], stejně dobře jako přirozená forma LACTB [51]. Mutace se totiž v sekvenci nachází jinde než aktivní místo v motivu SISK (AK 164-168). Vzhledem k tomu, že není zatím známá jak struktura LACTB, tak jeho přirozený substrát, je nemožné odhadnout, co přesně mutace R469K způsobuje. Každopádně může tento mutant snadno posloužit jako negativní kontrola při dalších biologických studiích mechanismu působení LACTB [51].

Mutace R469K byla také spojena s alergií na penicilin. Alergie se projevuje kopřivkou, zvracením, otokem a problémy s dechem po podání dávky penicilinu. Studie se zabývala genotypizací pacientů s touto alergií a LACTB byl vybrán jako pravděpodobná součást penicilinového metabolismu v lidském těle [81]. Bohužel pozdější pokusy ukázaly, že LACTB beta-laktamový kruh neštěpí [82]. Zda ovšem alespoň penicilin neváže, není zatím známo.

Další biologicky neaktivní forma LACTB vznikne, pokud odstraníme signální sekvenci na N-konci a protein se nedostane do mitochondrie. Jeho lokalizace v mezimembránovém mitochondriálním prostoru je pro tumor supresorovou funkci důležitá – pokud se protein nachází pouze v cytoplazmě, buněčná proliferace se nezmění a buňky stále zůstanou nádorovými [51].

## **6 Závěr**

Tumor supresorové geny jsou pro naše tělo nesmírně důležité, patří k základním mechanismům ochrany před vznikem nádorového onemocnění. Gen kódující LACTB je jedním z nich. Příběh jeho objevu je velmi zajímavý a přináší nový pohled do této problematiky. Studium toho, proč se některé tkáně jeví odolnější proti vzniku nádorového onemocnění místo hledání příčin vzniku například častého karcinomu prsu, může přinést i další nové tumor

supresorové geny a poznatky o dráhách a mechanismech chránících lidský organismus. To vše pak může pomoci ke komplexnějšímu pochopení nádorových onemocnění a k vývoji lepší, cílenější a účinnější léčby.

Dalším důležitým tématem studia je samotný protein LACTB. Tento homolog bakteriálních beta-laktamas, který se v lidských buňkách nachází v mezimembránovém prostoru mitochondrií, způsobuje snížení proliferace nádorových buněk a jejich diferenciaci. Skrz protein PISD ovlivňuje množství fosfolipidů LPE a PE, které jsou důležitými stavebními kameny membrán [51]. Souvislost mezi LPE a diferenciací buněk byla zmíněna i v několika dalších pracích. Například v souvislosti s výzkumem přeměny buněk teratokarcinomu označovaných jako P19 na srdeční myocyty [83].

Kolem LACTB stále ale zůstává mnoho nezodpovězených otázek. Je třeba rozklíčovat strukturu proteinu a nalézt jeho přirozený substrát, zjistit jak přesně vypadají filamenta LACTB a objasnit, co je jejich skutečnou úlohou – zda se opravdu jedná o strukturu, která má udržovat tvar mitochondrie, jak navrhuji finští vědci ve své práci z roku 2009 [19].

Dalším tématem je mutace v LACTB R469K. Podle databáze jednonukleotidových polymorfismů (SNP – z anglického single nucleotide polymorphism) je její četnost v populaci 43,2% [84]. Další databáze, projekt 1000 genomes ukazuje četnosti častých mutací u jednotlivých lidských populací. Mutace R469K je také zatoupená (lze ji nalézt pod identifikátorem rs2729835). Je zajímavé, že u Asiatů je její četnost signifikantně vyšší, u Japonců a Číňanů se dokonce blíží 100% [85]. Je tedy možné, že tito lidé mají nějaký jiný mechanismus, který u nich zastupuje funkci LACTB.

Také je se třeba dále zabývat studiem dráhy LACTB-PISD-PE/LPE [51] a nalézt její další komponenty. Stále není jasné, jak LACTB ovlivňuje diferenciaci buněk a například jaké signální dráhy jsou v tomto případě používány. Cílem této práce bylo pouze shrnout již známé poznatky o LACTB – dalšímu výzkumu tohoto zajímavého proteinu bude věnována práce diplomová.

## 7 Seznam literatury

- [1] “Statistika příčin smrti – Statistics Explained.” [Online]. Available: [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes\\_of\\_death\\_statistics/cs](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes_of_death_statistics/cs). [Accessed: 10-May-2017].
- [2] J. T. Sharp, “The cell wall of bacterial L forms and pleuropneumonia-like organisms,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 79, no. 10, pp. 344–355, Jan. 1960.
- [3] D. J. Nevins, P. D. English, and P. Albersheim, “The specific nature of plant cell wall polysaccharides,” *Plant Physiol.*, vol. 42, no. 7, pp. 900–6, Jul. 1967.
- [4] F. Blank, “The chemical composition of the cell walls of dermatophytes,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 10, no. 1, pp. 110–3, Jan. 1953.
- [5] D. H. Northcote, K. J. Goulding, and R. W. Horne, “The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*,” *Biochem. J.*, vol. 70, no. 3, pp. 391–7, Nov. 1958.
- [6] A. L. Koch, “Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 16, no. 4, pp. 673–87, Oct. 2003.
- [7] P. Demchick and A. L. Koch, “The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*,” *J. Bacteriol.*, vol. 178, no. 3, pp. 768–73, Feb. 1996.
- [8] W. Vollmer, D. Blanot, and M. A. De Pedro, “Peptidoglycan structure and architecture,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 32, no. 2, pp. 149–167, Mar. 2008.
- [9] L. Brown, J. M. Wolf, R. Prados-Rosales, and A. Casadevall, “Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, no. 10, pp. 620–630, Sep. 2015.
- [10] E. Sauvage, F. Kerff, M. Terrak, J. A. Ayala, and P. Charlier, “The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 32, no. 2, pp. 234–258, Mar. 2008.
- [11] M. G. Pinho, M. Kjos, and J.-W. Veening, “How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 11, no. 9, pp. 601–614, Aug. 2013.
- [12] J. M. Ghuysen, “Serine Beta-Lactamases and Penicillin-Binding Proteins,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 45, no. 1, pp. 37–67, Oct. 1991.
- [13] C. Goffin and J. M. Ghuysen, “Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, no. 4, pp. 1079–93, Dec. 1998.
- [14] J. R. Knowles, “Penicillin resistance: the chemistry of beta-lactamase inhibition,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 18, no. 4, pp. 97–104, Apr. 1985.
- [15] K. Bush, “Proliferation and significance of clinically relevant  $\beta$ -lactamases,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1277, no. 1, pp. 84–90, Jan. 2013.

- [16] I. Massova and S. Mobashery, “Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, no. 1, pp. 1–17, Jan. 1998.
- [17] M. Toth *et al.*, “Class D  $\beta$ -lactamases do exist in Gram-positive bacteria,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 9–14, Jan. 2016.
- [18] T. S. Smith, C. Southan, K. Ellington, D. Campbell, D. G. Tew, and C. Debouck, “Identification, Genomic Organization, and mRNA Expression of LACTB, Encoding a Serine  $\beta$ -Lactamase-like Protein with an Amino-terminal Transmembrane Domain,” 2001.
- [19] Z. Polianskyte *et al.*, “LACTB is a filament-forming protein localized in mitochondria,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 45, pp. 18960–5, 2009.
- [20] T. M. Embley and W. Martin, “Eukaryotic evolution, changes and challenges,” *Nature*, vol. 440, no. 7084, pp. 623–630, Mar. 2006.
- [21] P. Macheboeuf, C. Contreras-Martel, V. Job, O. Dideberg, and A. Dessen, “Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 30, no. 5, pp. 673–691, Sep. 2006.
- [22] E. C. Koc *et al.*, “The Large Subunit of the Mammalian Mitochondrial Ribosome: ANALYSIS OF THE COMPLEMENT OF RIBOSOMAL PROTEINS PRESENT,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 47, pp. 43958–43969, Nov. 2001.
- [23] S. W. Taylor *et al.*, “Characterization of the human heart mitochondrial proteome,” *J. Proteome Res.*, vol. 21, no. 3, pp. 281–286, Mar. 2003.
- [24] D. J. Pagliarini *et al.*, “A Mitochondrial Protein Compendium Elucidates Complex I Disease Biology,” *Cell*, vol. 134, no. 1, pp. 112–123, Jul. 2008.
- [25] H. F. Clark *et al.*, “The secreted protein discovery initiative (SPDI), a large-scale effort to identify novel human secreted and transmembrane proteins: a bioinformatics assessment,” *Genome Res.*, vol. 13, no. 10, pp. 2265–70, Oct. 2003.
- [26] J. Zhang *et al.*, “Systematic characterization of the murine mitochondrial proteome using functionally validated cardiac mitochondria,” *Proteomics*, vol. 8, no. 8, pp. 1564–1575, Apr. 2008.
- [27] H. Otera, S. Ohsakaya, Z.-I. Nagaura, N. Ishihara, and K. Mihara, “Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space,” *EMBO J.*, vol. 24, no. 7, pp. 1375–1386, Apr. 2005.
- [28] A. M. Verhagen, T. K. Kratina, C. J. Hawkins, J. Silke, P. G. Ekert, and D. L. Vaux, “Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs,” *Cell Death Differ.*, vol. 14, no. 2, pp. 348–357, Feb. 2007.
- [29] A. Chacinska, C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow, and N. Pfanner, “Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms,” *Cell*, vol. 138, no. 4, pp. 628–644, Aug.

- 2009.
- [30] M. Ng *et al.*, “Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013,” *Lancet*, vol. 384, no. 9945, pp. 766–781, 2014.
- [31] M. Kanazawa, N. Yoshiike, T. Osaka, Y. Numba, P. Zimmet, and S. Inoue, “Criteria and Classification of Obesity in Japan and Asia-Oceania,” in *Nutrition and Fitness: Obesity, the Metabolic Syndrome, Cardiovascular Disease, and Cancer*, Basel: KARGER, 2005, pp. 1–12.
- [32] D. C. W. Lau *et al.*, “2006 Canadian clinical practice guidelines on the management and prevention of obesity in adults and children [summary].,” *CMAJ*, vol. 176, no. 8, pp. S1-13, Apr. 2007.
- [33] S. N. Bleich, D. Cutler, C. Murray, and A. Adams, “Why Is the Developed World Obese?,” *Annu. Rev. Public Health*, vol. 29, no. 1, pp. 273–295, Apr. 2008.
- [34] M. Nestle and M. F. Jacobson, “Halting the obesity epidemic: a public health policy approach.,” *Public Health Rep.*, vol. 115, no. 1, pp. 12–24, 2000.
- [35] H. H. Maes, M. C. Neale, and L. J. Eaves, “Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity.,” *Behav. Genet.*, vol. 27, no. 4, pp. 325–51, Jul. 1997.
- [36] M. Feinleib *et al.*, “The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary of results.,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 106, no. 4, pp. 284–5, Oct. 1977.
- [37] P. K. E. Magnusson and F. Rasmussen, “Familial resemblance of body mass index and familial risk of high and low body mass index. A study of young men in Sweden,” *Int. J. Obes.*, vol. 26, no. 9, pp. 1225–1231, Aug. 2002.
- [38] A. A. Mamun, M. O’Callaghan, L. Callaway, G. Williams, J. Najman, and D. A. Lawlor, “Associations of Gestational Weight Gain With Offspring Body Mass Index and Blood Pressure at 21 Years of Age: Evidence From a Birth Cohort Study,” *Circulation*, vol. 119, no. 13, pp. 1720–1727, Apr. 2009.
- [39] K. Silventoinen, B. Rokholm, J. Kaprio, and T. I. A. Sørensen, “The genetic and environmental influences on childhood obesity: a systematic review of twin and adoption studies,” *Int. J. Obes.*, vol. 34, no. 1, pp. 29–40, Jan. 2010.
- [40] D. Albuquerque, E. Stice, R. Rodríguez-López, L. Manco, and C. Nóbrega, “Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective,” *Mol. Genet. Genomics*, vol. 290, no. 4, pp. 1191–1221, Aug. 2015.
- [41] Y. Chen *et al.*, “Variations in DNA elucidate molecular networks that cause disease.,” *Nature*, vol. 452, no. 7186, pp. 429–35, 2008.
- [42] A. P. Stout, “Rhabdomyosarcoma of the Skeletal Muscles.,” *Ann. Surg.*, vol. 123, no. 3, pp. 447–

- 72, Mar. 1946.
- [43] C. A. S. Arndt and W. M. Crist, "Common Musculoskeletal Tumors of Childhood and Adolescence," *N. Engl. J. Med.*, vol. 341, no. 5, pp. 342–352, Jul. 1999.
- [44] S. Ognjanovic, A. M. Linabery, B. Charbonneau, and J. A. Ross, "Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005.," *Cancer*, vol. 115, no. 18, pp. 4218–26, Sep. 2009.
- [45] P. Yang *et al.*, "Association of childhood rhabdomyosarcoma with neurofibromatosis type i and birth defects," *Genet. Epidemiol.*, vol. 12, no. 5, pp. 467–474, 1995.
- [46] A. C. Smith *et al.*, "Association of Alveolar Rhabdomyosarcoma with the Beckwith-Wiedemann Syndrome," *Pediatr. Dev. Pathol.*, vol. 4, no. 6, pp. 550–558, Nov. 2001.
- [47] D. Malkin *et al.*, "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms," *Science (80-. )*, vol. 250, no. 4985, 1990.
- [48] K. W. Gripp *et al.*, "Five additional Costello syndrome patients with rhabdomyosarcoma: Proposal for a tumor screening protocol," *Am. J. Med. Genet.*, vol. 108, no. 1, pp. 80–87, Feb. 2002.
- [49] S. Grufferman, A. G. Schwartz, F. B. Ruymann, and H. M. Maurer, "Parents' use of cocaine and marijuana and increased risk of rhabdomyosarcoma in their children.," *Cancer Causes Control*, vol. 4, no. 3, pp. 217–24, May 1993.
- [50] S. M. Hiniker and S. S. Donaldson, "Recent advances in understanding and managing rhabdomyosarcoma.," *F1000Prime Rep.*, vol. 7, p. 59, 2015.
- [51] Z. Keckesova *et al.*, "LACTB is a tumour suppressor that modulates lipid metabolism and cell state," *Nature*, vol. 543, no. 7647, pp. 681–686, Mar. 2017.
- [52] K. Walsh and H. Perlman, "Cell cycle exit upon myogenic differentiation.," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 7, no. 5, pp. 597–602, Oct. 1997.
- [53] C. J. Sherr *et al.*, "Principles of tumor suppression.," *Cell*, vol. 116, no. 2, pp. 235–46, Jan. 2004.
- [54] A. G. Knudson and Jr., "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 68, no. 4, pp. 820–3, Apr. 1971.
- [55] A. Murphree and W. Benedict, "Retinoblastoma: clues to human oncogenesis," *Science (80-. )*, vol. 223, no. 4640, 1984.
- [56] M. A. Ziemer, A. Mason, and D. M. Carlson, "Cell-free translations of proline-rich protein mRNAs.," *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 18, pp. 11176–80, Sep. 1982.
- [57] J.-C. Bourdon, S. Surget, and M. P. Khoury, "Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective," *Onco. Targets. Ther.*, vol. 7, p. 57, Dec. 2013.
- [58] G. Matlashewski, P. Lamb, D. Pim, J. Peacock, L. Crawford, and S. Benchimol, "Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene.," *EMBO J.*, vol.

- 3, no. 13, pp. 3257–62, Dec. 1984.
- [59] C. A. Schmitt *et al.*, “Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo.,” *Cancer Cell*, vol. 1, no. 3, pp. 289–98, Apr. 2002.
- [60] J. M. Varley, “Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome,” *Hum. Mutat.*, vol. 21, no. 3, pp. 313–320, Mar. 2003.
- [61] M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. Harris, “p53 mutations in human cancers,” *Science (80-. )*, vol. 253, no. 5015, 1991.
- [62] I. Ben-Skowronek and S. Kozaczuk, “Von Hippel-Lindau Syndrome.,” *Horm. Res. Paediatr.*, vol. 84, no. 3, pp. 145–52, 2015.
- [63] L. Chen *et al.*, “CD95 promotes tumour growth.,” *Nature*, vol. 465, no. 7297, pp. 492–6, May 2010.
- [64] M. L. Nelson and S. B. Levy, “The history of the tetracyclines,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1241, no. 1, pp. 17–32, Dec. 2011.
- [65] M. Gossen, S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen, and H. Bujard, “Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells,” *Science (80-. )*, vol. 268, no. 5218, 1995.
- [66] P. A. Kenny *et al.*, “The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression.,” *Mol. Oncol.*, vol. 1, no. 1, pp. 84–96, Jun. 2007.
- [67] T. M. Rose and G. D. Prestwich, “Synthesis and evaluation of fluorogenic substrates for phospholipase D and phospholipase C.,” *Org. Lett.*, vol. 8, no. 12, pp. 2575–8, Jun. 2006.
- [68] A. K. Cowan, “Plant growth promotion by 18:0-lyso-phosphatidylethanolamine involves senescence delay.,” *Plant Signal. Behav.*, vol. 4, no. 4, pp. 324–7, Apr. 2009.
- [69] J. E. Vance and G. Tasseva, “Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine Vance, J.E. & Tasseva, G., 2013. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell*,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1831, no. 3, pp. 543–554, 2013.
- [70] K. Emoto *et al.*, “Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 23, pp. 12867–72, Nov. 1996.
- [71] R. Majumder, X. Liang, M. A. Quinn-Allen, W. H. Kane, and B. R. Lentz, “Modulation of prothrombinase assembly and activity by phosphatidylethanolamine.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 41, pp. 35535–42, Oct. 2011.
- [72] G. Tasseva, H. D. Bai, M. Davidescu, A. Haromy, E. Michelakis, and J. E. Vance, “Phosphatidylethanolamine Deficiency in Mammalian Mitochondria Impairs Oxidative

- Phosphorylation and Alters Mitochondrial Morphology,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 6, pp. 4158–4173, Feb. 2013.
- [73] R. Steenbergen, T. S. Nanowski, A. Beigneux, A. Kulinski, S. G. Young, and J. E. Vance, “Disruption of the phosphatidylserine decarboxylase gene in mice causes embryonic lethality and mitochondrial defects,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 48, pp. 40032–40, Dec. 2005.
- [74] T. A. Zelinski and P. C. Choy, “Phosphatidylethanolamine biosynthesis in isolated hamster heart,” *Can. J. Biochem.*, vol. 60, no. 8, pp. 817–23, Aug. 1982.
- [75] M. A. Miller and C. Kent, “Characterization of the pathways for phosphatidylethanolamine biosynthesis in Chinese hamster ovary mutant and parental cell lines,” *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 21, pp. 9753–61, Jul. 1986.
- [76] D. R. Voelker, “Phosphatidylserine functions as the major precursor of phosphatidylethanolamine in cultured BHK-21 cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 81, no. 9, pp. 2669–73, May 1984.
- [77] A. K. Percy, J. F. Moore, M. A. Carson, and C. J. Waechter, “Characterization of brain phosphatidylserine decarboxylase: localization in the mitochondrial inner membrane,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 223, no. 2, pp. 484–94, Jun. 1983.
- [78] Q. X. Li and W. Dowhan, “Structural characterization of Escherichia coli phosphatidylserine decarboxylase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 23, pp. 11516–22, Aug. 1988.
- [79] D. R. Voelker, “Phosphatidylserine decarboxylase,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1348, no. 1–2, pp. 236–44, Sep. 1997.
- [80] D. A. Bachovchin *et al.*, “A high-throughput, multiplexed assay for superfamily-wide profiling of enzyme activity,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 10, no. 8, pp. 656–663, 2014.
- [81] A. J. Apter, H. Schelleman, A. Walker, K. Addya, and T. Rebbeck, “Clinical and genetic risk factors of self-reported penicillin allergy,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 122, no. 1, pp. 152–158, 2008.
- [82] N. Peitsaro *et al.*, “Evolution of a family of metazoan active-site-serine enzymes from penicillin-binding proteins: a novel facet of the bacterial legacy,” *BMC Evol. Biol.*, vol. 8, p. 26, Jan. 2008.
- [83] J. Fotheringham, F. Y. Xu, M. Nemer, E. Kardami, P. C. Choy, and G. M. Hatch, “Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase activity is elevated during cardiac cell differentiation,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1485, no. 1, pp. 1–10, May 2000.
- [84] “SNP linked to Gene (geneID:114294) Gene LACTB.” [Online]. Available: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=114294](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?locusId=114294). [Accessed: 10-May-2017].
- [85] “1000 Genomes Browser - LACTB.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>. [Accessed: 10-May-2017].

