Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Kristýna Kellovská

Methionin syntáza jako potenciální terapeutický cíl

Methionine synthase as a potential therapeutic target

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Ondřej Baszczyński, Ph.D.

Konzultant: Ing. Rafael Navrátil, Ph.D.

Praha, 2023

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, 28. 4. 2023

Kristýna Kellovská

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Ing. Ondřeji Baszczyňskému, Ph.D. za cenné rady a veškerý čas, který mi věnoval. Poděkování patří také Ing. Rafaelu Navrátilovi, Ph.D. za velkou trpělivost a ochotu vždy pomoci. Dále děkuji také všem kolegům z laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě patří mé díky mojí rodině, která mě vždy podporovala v následování mých cílů a snů.

Abstrakt

Tato práce se zabývá methionin syntázou (MS), tedy enzymem, který katalyzuje methylaci homocysteinu za vzniku methioninu. Rozlišujeme dvě základní rodiny methionin syntáz – kobalamin-dependentní a kobalamin-independentní. Enzymy těchto dvou rodin nejsou sekvenčně homologní, využívají odlišný katalytický mechanismus a vyžadují některé jiné substráty a kofaktory. Kobalamin-dependentní MS nalézáme například u lidí, kobalamin-independentí MS zase u rostlin a hub. V lidském metabolismu je methionin syntáza zapojena do folátového cyklu a cyklu methioninu, tedy do metabolických drah, které mají přímý vliv například na dostupnost prekurzorů syntézy DNA nebo biologické methylace s využitím *S*-adenosylmethioninu jako donoru methylové skupiny. V posledních letech je o tomto enzymu také uvažováno jako o potenciálním cíli chemoterapeutik a antifungálních látek, jelikož jeho inhibice má zásadní vliv na schopnost proliferace rakovinných buněk i životaschopnost a virulenci patogenních druhů hub.

Klíčová slova: Methionin syntáza, methionin, homocystein, one-carbon metabolismus, inhibitor.

Abstract

This thesis focuses on the enzyme methionine synthase (MS), which catalyzes methylation of homocysteine to produce methionine. Two main families of these enzymes are recognized in nature – cobalamin-dependent and cobalamin-independent. These two enzymes share no sequence homology, and they also use different catalytic mechanisms, substrates and cofactors. Cobalamin-dependent MS is found in humans, whereas cobalamin-independent MS is typical for plants and fungi. In humans, the enzyme provides a connection between folate and methionine cycle – two metabolic pathways which are crucial for example for DNA synthesis and *S*-adenosylmethionine-dependent biological methylations. Recently, the enzyme has been recognized as a potentially promising target for the development of chemotherapeutics and antifungal drugs, mainly based on its essentiality for the proliferation of cancer cells and both viability and virulence of pathogenic fungal species.

Keywords: Methionine synthase, methionine, homocysteine, one-carbon metabolism, inhibitor.

Seznam použitých zkratek

AdoCbl	Adenosylkobalamin
AdoHcy	*S*-adenosylhomocystein
AdoMet	*S*-adenosylmethionin
AICARFT	Aminoimidazol carboxamid formyl transferáza
ATP	Adenosintrifosfát
Cbl	Kobalamin, vitamín B_{12}
$CHOO^-$	Formiát
CHO-THF	10-formyltetrahydrofolát
CH^+-THF	5,10-methenyltetrahydrofolát
CH_2-THF	5,10-methylentetrahydrofolát
CH_3-THF	5-methyltetrahydrofolát
CNCbl	Kyanokobalamin
CNS	Centrální nervová soustava
Co(I)Cbl	Kob(I)alamin
Co(II)Cbl	Kob(II)alamin
DMB	Dimethylbenzoimidazol
DHF	Dihydrofolát
DHFR	Dihydrofolát reduktáza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dTMP	Deoxythymidin monofosfát
dUMP	Deoxyuridin monofosfát
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FNR	Ferredoxin (flavodoxin)-$NADP^+$ oxidoreduktáza
GARFT	Glycinamid ribonukleotid formyl transferáza
HC	Haptokorin
Hcy	L-homocystein
HIV	Human imunodeficiency syndrom
hMS	Lidská methionin syntáza
HOCbl	Hydroxykobalamin
IC_{50}	Střední inhibiční koncentrace
IF	Vnitřní faktor, z angl. intrinsic factor
MeCbl	Methylkobalamin
MeCo(III)Cbl	Methylkob(III)alamin
Met	L-methionin

MetE	Kobalamin-independentní methionin synáza u *E. coli*
MetH	Kobalamin-dependentní methionin syntáza u *E. coli*
MET6	Gen pro fungální methionin syntázu
Met6p	Fungální methionin syntáza
MMACHC	Methylmalonic aciduria type C and homocystinuria
MMADHC	Methylmalonic aciduria type D and homocystinuria
MS	Methionin syntáza
MSR	Methionin syntáza reduktáza
MT	Methyl transferáza
MTHFR	Methylen tetrahydrofolát reduktáza
MTR	Gen pro methionin syntázu
MTX	Methotrexát
MTX-Glu_3	Methotrexát triglutamát
MUT	Mitochondriální methylmalonyl-CoA mutáza
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid
PABA	Paraaminobenzoová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
SHMT2	Serin hydroxymethyltransferáza 2
S_N2	Substituce nukleofilní bimolekulární
TC	Transkobalamin
THF	Tetrahydrofolát
TYMS	Thymidylát syntáza
WHO	Světová zdravotnická organizace, z angl. World Health Organization
WT	Wild-type

Obsah

1 Úvod ... 1
2 Methionin syntáza ... 2
2.1 Kobalamin-independentní MS (EC 2.1.1.14) ... 2
2.1.1 Struktura enzymu ... 2
2.1.2 Katalytický mechanismus ... 3
2.2 Kobalamin-dependentní MS (EC 2.1.1.13) ... 4
2.2.1 Kobalaminový kofaktor ... 4
2.2.2 Struktura enzymu ... 5
2.2.3 Katalytický a reaktivační mechanismus ... 6
3 Methionin syntáza v lidském metabolismu ... 7
3.1 Reaktivační cyklus ... 8
3.2 Metabolismus kobalaminu (vitamínu B_{12}) ... 9
3.3 Folátový cyklus a syntéza nukleotidů ... 10
3.4 Produkce 5-methyl-THF a cyklus methioninu ... 11
4 Methionin syntáza v medicíně ... 12
4.1 Methyl-folátová past ... 12
4.2 Deficit methionin syntázy ... 12
4.3 Methionin syntáza jako chemoterapeutický cíl ... 13
4.3.1 *In vitro* a *in vivo* testování ... 14
4.3.2 Inhibitory kobalamin-dependentní MS ... 15
4.4 Methionin syntáza jako antifungální cíl ... 16
4.4.1 Vliv MET6 na životaschopnost a virulenci patogenních hub ... 18
4.4.2 Struktura Met6p a design potenciálních inhibitorů ... 20
5 Závěr ... 24
6 Seznam literatury ... 25

1 Úvod

Methionin je nezbytnou aminokyselinou pro všechny typy organismů – od bakterií, přes houby až po savce a lidi.[1] Jde o jednu z dvaceti proteinogenních aminokyselin, a i přes jeho nízké zastoupení v proteinech má v proteosyntéze důležitou roli, protože slouží jako iniciační aminokyselina při translaci. Dále je základním stavebním kamenem *S*-adenosylmethioninu, který je nejčastějším donorem methylové skupiny v živých systémech. Pro lidi je methionin esenciální aminokyselinou a musí jej tedy v dostatečném množství přijímat v potravě, naopak většina bakterií, rostliny a houby jsou schopny jej syntetizovat.[2]

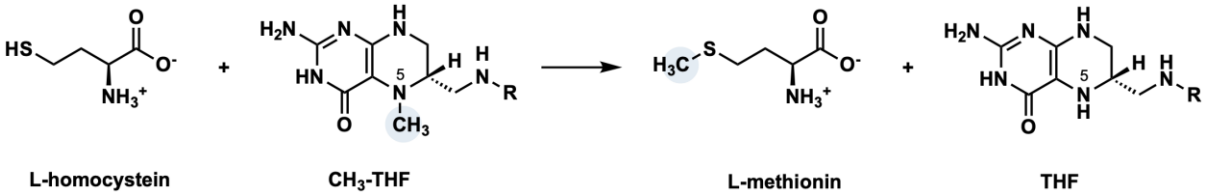
Methionin syntáza (MS) je enzym, který katalyzuje reakci produkující methionin opětovnou methylací homocysteinu. U organismů, které syntetizují methionin *de novo*, je zmíněná reakce posledním krokem v jeho biosyntéze v tzv. aspartátové dráze. U lidí je tato reakce klíčová pro odbourání toxického homocysteinu, syntézu *S*-adenosylmethioninu (nutného pro biologické methylace) a produkci tetrahydrofolátu (klíčového pro syntézu nukleotidů). Tento enzym je významný také z medicínského pohledu. Porucha jeho funkce, ať už způsobená genetickými nebo i jinými faktory, způsobuje u lidí závažné patologie. V posledních letech se také ukazuje, že cílená blokace tohoto enzymu by mohla mít vliv na schopnost proliferace rakovinných buněk a také růst mikroorganismů, především některých druhů patogenních hub.

V této práci si kladu za cíl poskytnout přehled současných poznatků týkajících se enzymu methionin syntáza, popsat jeho roli v lidském metabolismu i patogenezi a ukázat na jeho možný význam pro terapii rakovinných onemocnění a fungálních infekcí. V neposlední řadě bych ráda poukázala na dosavadní výsledky ohledně designu inhibitorů lidského i fungálního enzymu a v této oblasti také nastínila možnosti budoucí práce.

2 Methionin syntáza

Methionin syntáza (MS) zahrnuje dvě nepříbuzné rodiny enzymů: kobalamin-dependentní MS (EC 2.1.1.13) a kobalamin-independentní MS (EC 2.1.1.14, 5-methyltetrahydropteroyltriglutamát-homocystein transmethylasu).[3]

Oba enzymy katalyzují stejnou celkovou reakci (Obrázek 1), tedy přenos methylové skupiny z N^5-metyltetrahydrofolátu (5-methyl-THF) na thiol L-homocysteinu (Hcy) za vzniku L-methioninu (Met) a tetrahydrofolátu (THF).[4] Kobalamin-independentní MS přenáší methylovou skupinu z 5-methyl-THF přímo na Hcy, zatímco kobalamin-dependentní enzymy ji nejprve přenáší na vázaný kobalamin (vitamín B_{12}).[5,6]



Obrázek 1. Reakce katalyzovaná methionin syntázou[7], R = Paraaminobenzoát-Glu_n ($n \geq 1$)

Využití dvou různých reakcí pro syntézu methioninu methylací homocysteinu poprvé popsal Foster *et al.*[8] V této práci bylo prokázáno, že *Escherichia coli* využívá dva různé enzymy, z nichž jeden obsahuje kobalamin (dnes popsán jako MetH) a druhý nikoli (dnes MetE). Mezi MetE a MetH z *E. coli* nebyla nalezena sekvenční podobnost, předpokládá se tedy, že proteiny nejsou evolučně příbuzné a vznikly konvergentní evolucí.[4] Homology genů pro MetH jsou popsány i u dalších bakterií a u savců, homology MetE například u rostlin, hmyzu a hub.[9]

2.1 Kobalamin-independentní MS (EC 2.1.1.14)

Na kobalaminu nezávislá MS je metalloenzym obsahující jeden ekvivalent katalytického zinku, ale žádný organický kofaktor.[10] Pro katalýzu vyžaduje fosforečnanové anionty a aktivita je stimulována přítomností dvouvazných kationtů, například Mg^{2+} a Mn^{2+}.[4] Jako donor methylové skupiny je akceptován pouze 5-methyltetrahydrofolát polyglutamát.[8]

2.1.1 Struktura enzymu

Krystalová struktura kobalamin-independentní MS byla vyřešena u *Arabidopsis thaliana*,[11] *Streptococcus mutans*,[12] *Thermotoga maritima*,[3] *Candida albicans*[13–15] a *Neurospora crassa*.[16]

Z obecného pohledu se jedná o přibližně 90 kDa enzym[15], který se skládá ze dvou face-to-face orientovaných $(\beta\alpha)_8$ barelů spojených linkerem o délce 35 aminokyselin.[3] Výrazná podobnost v sekvenci C- a N-koncové domény ukazuje, že enzym pravděpodobně vznikl genovou duplikací genu pro asi 340 aminokyselin dlouhý protein.[4] Na rozhraní mezi oběma doménami se nachází aktivní místo se zinkem a vazebnými místy pro 5-methyltetrahydrofolát polyglutamát a homocystein.[14] Bylo

zjištěno, že enzym zaujímá dvě odlišné konformace. Katalyticky neaktivní otevřená forma přechází po vazbě substrátů do uzavřené formy, která umožňuje průběh reakce.[15]

Vazebné místo pro 5-methyl-THF je situováno ve žlábku mezi dvěma $(\beta\alpha)_8$ barely.[3] Vazbu a orientaci pterinového kruhu zajišťují patrové interakce a vodíkové můstky s postranními řetězci konzervovaných aminokyselin.[13] V rámci binárního komplexu interaguje enzym pouze s prvním glutamátem folátu,[3] po přechodu do uzavřené konformace je již specificky vázán také druhý glutamát.[15] Tyto interakce vysvětlují požadavek enzymu na folát s minimálně dvěma glutamáty.[6] Případné další glutamátové zbytky s enzymem pravděpodobně specificky neinteragují.[15]

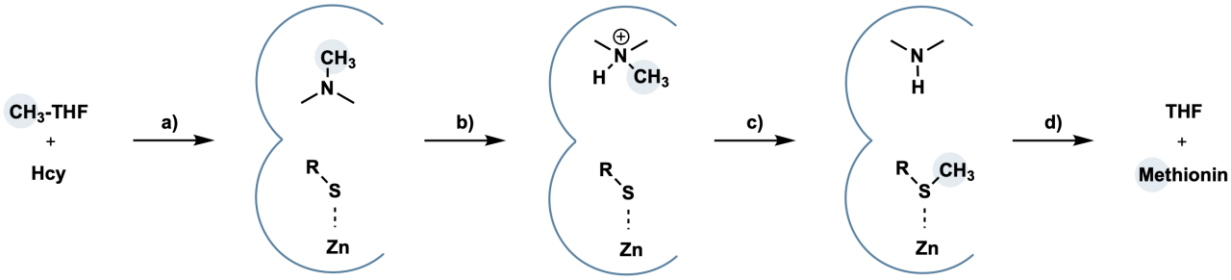
Enzym dále obsahuje jeden ekvivalent katalytického zinku ve formě Zn^{2+},[6,10] který je vázán v jeho C-terminální doméně.[3] Zinek je v klidovém stavu koordinován čtyřmi ligandy, které zaujímají tetrahedrální geometrii.[17] Jeden His a oba Cys ligandy jsou konzervovány napříč organismy.[13] Čtvrtý ligand, který je při vazbě Hcy nahrazován thiolem homocysteinu, je pravděpodobně variabilní. Tímto ligandem může být Glu, jako v případě *T. maritima*[3] nebo voda ve struktuře enzymu *A. thaliana*.[11]

2.1.2 Katalytický mechanismus

Reakce katalyzovaná tímto enzymem je ve své podstatě S_N2 methylační reakce, jejíž katalýza je z mechanistického pohledu problematická.[9] Jde totiž o přenos špatně odstupující skupiny, tedy methylu 5-methyl-THF, na poměrně slabý nukleofil, kterým je SH skupina homocysteinu.[3] Tomu odpovídá také číslo obratu, které je pro MetE z *E. coli* pouze 22,6 min^{-1}.[6]

Během katalýzy (Obrázek 2) se nejprve do aktivního místa enzymu váží oba substráty.[18] Pořadí jejich vazby pravděpodobně není určující pro zdárné vytvoření aktivního ternárního komplexu, ale vazba jednoho ze substrátů zvyšuje afinitu pro ten druhý přibližně třicetkrát. Po vazbě 5-methyl-THF vzniká binární komplex Enzym·5-methyl-THF, v jehož struktuře je N^5-methyl orientován směrem od vazebného místa pro Hcy ve vzdálenosti asi 11 Å, což znemožňuje reakci. Umístění methylu do správné pozice zajišťuje rotace kolem vazby N^{10}–$C^{4'}$ a přiblížení substrátů změnou konformace enzymových domén.[3,13] V dalším kroku jsou oba substráty aktivovány. 5-Methyl-THF je aktivován protonací na N^5, která jej přeměňuje na lépe odstupující skupinu, a která je zajištěna postranním řetězcem histidinu přes molekulu vody.[15] K této protonaci, která je klíčová pro průběh katalyzované reakce, dochází pouze ve struktuře ternárního komplexu Enzym·5-methyl-THF·Hcy. Aktivaci homocysteinu zajišťuje koordinace jeho SH skupiny k zinku, která vede ke snížení p*K*a a tím ke zvýšení koncentrace aktivního thiolátu. Síra homocysteinu nahrazuje při vazbě k zinku původní kyslíkový ligand, což způsobuje inverzi klidové tetrahedrální geometrie na zinku, a také změny v sekundární struktuře enzymu.[17] Nukleofilní atak thiolátu homocysteinu na N^5-methyl folátu vede ke vzniku methioninu a THF. Aby mohlo dojít k nukleofilnímu ataku na methyl, musí být nejprve oslabena vazba thiolátu k zinku.[15] To je pravděpodobně zajištěno vznikem přechodného stavu

s trigonální pyramidální geometrií, který prodlužuje Zn–S vazbu a zvyšuje nukleofilní charakter thiolátu.[17]

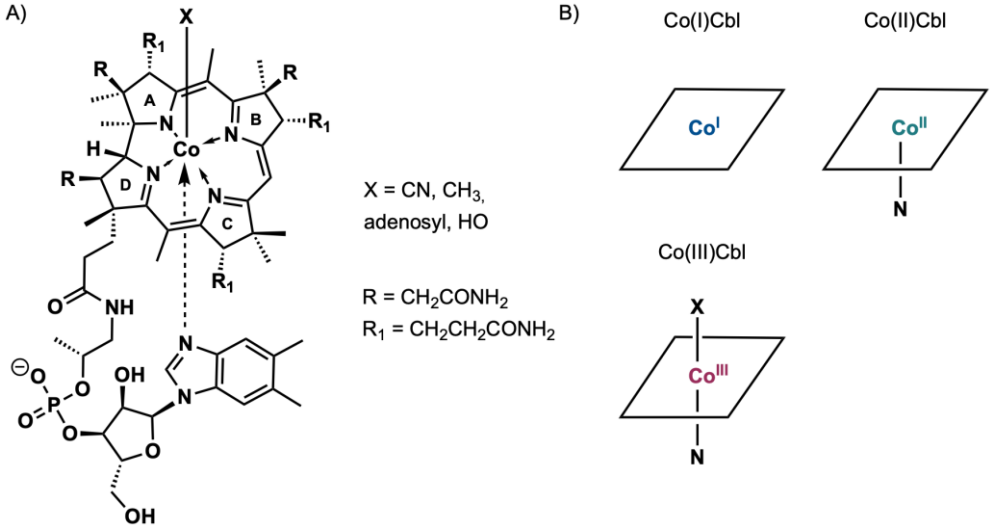


Obrázek 2. Schéma katalytického mechanismu kobalamin-independentí MS; a) vazba substrátů do aktivních míst, b) aktivace 5-methyl-THF, c) přenos methylu, d) uvolnění produktů.[19]

2.2 Kobalamin-dependentní MS (EC 2.1.1.13)

Kobalamin-dependentní MS ve své struktuře obsahuje, stejně jako kobalamin-independentní MS, jeden ekvivalent katalytického zinku, a navíc také kobalaminový kofaktor.[10] Jako donor methylové skupiny může sloužit jak 5-methyl-THF monoglutamát, tak polyglutamát. Protože kobalaminový kofaktor je náchylný k oxidaci, která blokuje jeho aktivitu, je pro fungování enzymu nezbytný ještě redukční systém a *S*-adenosylmethionin (AdoMet).[20]

2.2.1 Kobalaminový kofaktor



Obrázek 3. A) Struktura kobalaminu s DMB ve spodní axiální pozici („base-on“ stav), po vazbě na enzym je DMB nahrazen His („base-off/His-on“ stav).[21] B) Schematicky znázorněné oxidační stavy kobalaminu a koordinované ligandy, X = horní axiální ligand, N = dusík DMB nebo His, korinový kruh je zakreslen jako čtverec.[22]

Kobalamin neboli vitamín B_{12}, jehož struktura (Obrázek 3A) byla publikována v roce 1956, je největším a nejkomplexnějším vitamínem.[23] Jeho centrálním atomem je kobalt, který je ekvatoriálně koordinován čtyřmi dusíky pyrrolů korinového kruhu.[24] Dále má kobalt jednu koordinační pozici nad a druhou pod rovinou tohoto kruhu. Spodní (α) axiální pozice je obsazena buď dusíkem dimethylbenzimidazolu (DMB) („base-on“ stav), volná („base-off“ stav) nebo obsazena His („base-

off/His-on“ stav).[24,25] V horní (β) axiální pozici může být navázáno několik druhů ligandů, například kyano- (CNCbl, kyanokobalamin), methyl- (MeCbl, methylkobalamin), adenosyl- (AdoCbl, adenosylkobalamin), hydroxyl- (HOCbl, hydroxykobalamin). Obsazení α a β pozic závisí na oxidačním stavu kobaltu, který může nabývat hodnot +1, +2 nebo +3 (Obrázek 3B). Co(I) je ve stavu „base-off“ a v β pozici neváže ligand. Co(II) má pět koordinačních pozic, váže tedy ligand buď v α nebo β pozici. Co(III) je ve stavu „base-on“ a zároveň váže horní axiální ligand.

2.2.2 Struktura enzymu

Krystalová struktura kobalamin-dependentní MS, případně jejího fragmentu byla publikována u *T. maritima*,[17,26] *E. coli,*[22,27–31] *Thermus thermopilus*,[32] a *Homo sapiens*.[33]

Kobalamin-dependentní MS je přibližně 140 kDa protein skládající se ze čtyř lineárně uspořádaných domén, přičemž jedna z nich váže kobalaminový kofaktor a zbylé tři vždy jeden ze substrátů – homocystein, 5-methyl-THF a *S*-adenosylmethionin.[20,26] N-konec polypeptidu vytváří Hcy a 5-methyl-THF-vazebné domény, C-konec zase domény vázající AdoMet a Cbl.[34]

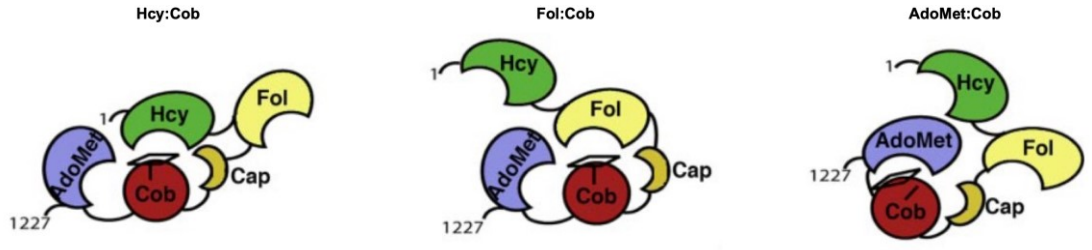
Domény vázající Hcy a 5-methyl-THF jsou pevně asociované $(\beta\alpha)_8$ barely propojené interdoménovým linkerem.[26] Aktivní místa jsou od sebe vzdálena přibližně 50 Å a jejich lokalizace na povrchu enzymu umožňuje interakce s kobalamin-vazebnou doménou během katalýzy. V Hcy-vazebné doméně je zinek bez navázaného substrátu tetrahedrálně koordinován čtyřmi ligandy, konkrétně třemi Cys a jedním Asn, který je při vazbě homocysteinu nahrazován. Ve folát-vazebné doméně (Fol) je 5-methyl-THF vázán v nezvykle natažené konformaci. Konzervované aminokyseliny enzymu vytváří vodíkové můstky s atomy pterinového kruhu, karbonylem *p*-aminobenzoové kyseliny (PABA) a patrovými interakcemi interagují s jejím aromatickým kruhem.[17]

AdoMet vazebná doména má tvar písmene C s vazebným místem lokalizovaným v konkávní části této struktury.[30] Žlábek vázající AdoMet je exponovaný na povrchu domény,[27] což umožňuje interakce AdoMet s korinovým kruhem kobalaminu během reaktivačního cyklu enzymu.[28] Na stabilizaci a vazbě *S*-adenosylmethioninu se podílí jak intramolekulární interakce mezi karboxylovými a sulfoniovými ionty AdoMet, tak interakce s konzervovanými aminokyselinami enzymu.[27] Významné jsou především vodíkové můstky mezi AdoMet a karboxyláty dvou konzervovaných Glu zprostředkované molekulami vody.[27,30] Tyto interakce zajišťují také vyšší afinitu k vazbě substrátu (AdoMet) v porovnání s vazbou produktu (*S*-adenosylhomocysteinu, AdoHcy).[27]

Kobalaminový kofaktor je vázán mezi dvěma doménami.[31] Se spodní (α) stranou kobalaminu permanentně interaguje Cob doména, se svrchní (β) stranou Cap doména, případně některá z domén vázající substráty.[34]

2.2.3 Katalytický a reaktivační mechanismus

Kobalamin-dependentní MS je velmi dynamický enzym, který katalyzuje tři různé reakce přenášející methylovou skupinu mezi kobalaminovým kofaktorem a jedním ze tří substrátů.[29] Během těchto reakcí dochází k výrazným změnám v konformaci enzymu (Obrázek 4), protože jednotlivé domény s navázanými substráty (Hcy, Fol a AdoMet doména) jsou postupně přibližovány ke Cbl-vazebné doméně.[28]



Obrázek 4. Schématické znázornění možných konformací kobalamin-dependentní MS u *E. coli*; korinový kruh je zobrazen jako čtverec a α-axiální His-ligand jako čára; v Hcy:Cob a Fol:Cob je kobalamin v „His-on“ konformaci, v AdoMet:Cob v „His-off“. Převzato z reference 28.

Na začátku katalytického cyklu (Obrázek 5) se na volný enzym s MeCo(III)Cbl váže Hcy a 5-methyl-THF.[35] Následně dochází k přenosu methylové skupiny na homocystein za vzniku Co(I)Cbl a methioninu, tedy prvního produktu reakce.[22,28] Aktivaci Hcy zajišťuje koordinace jeho síry k zinku, přičemž vazba síry nahrazuje Asn ligand a vede k inverzi tetrahedrální geometrie na zinku.[17] Co(I)Cbl je následně s využitím 5-methyl-THF jako methylového donoru opětovně methylován, čímž je produkován MeCo(III)Cbl a jako druhý produkt reakce THF.[22,28] Vznikající MeCo(III)Cbl je připraven pro použití v dalším katalytickém cyklu – tzv. volný enzym, na který se na začátku cyklu váží substráty, tedy již obsahuje aktivovanou methylovou skupinu z předchozího cyklu.[35] Během katalýzy se následně enzym pohybuje mezi konformacemi Hcy:Cob a Fol:Cob (Obrázek 4), čímž je vždy zajištěno přiblížení odpovídajícího substrátu.[28]

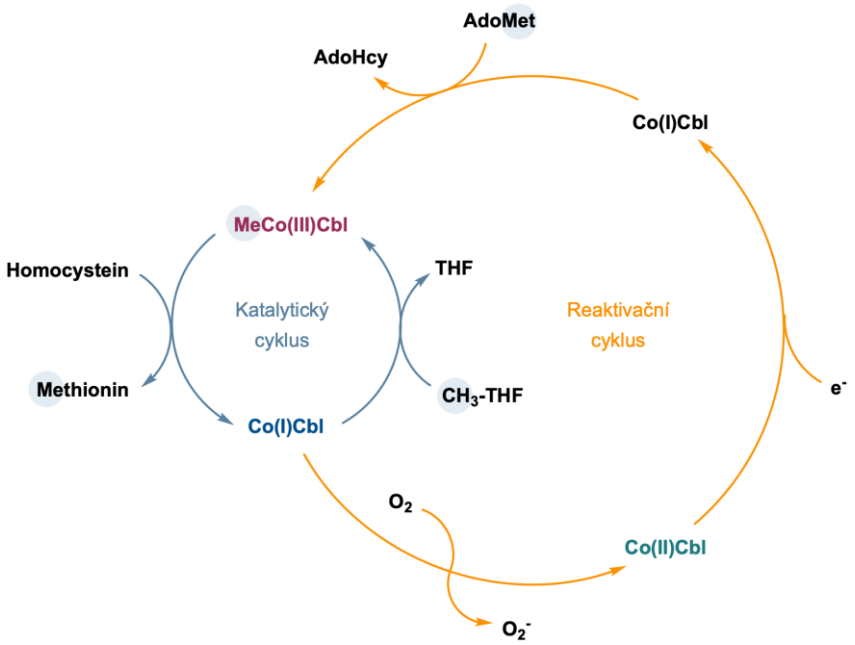
Kromě oxidačních čísel +1 [Co(I)Cbl] a +3 [MeCo(III)Cbl] v rámci katalytického cyklu může centrální atom kobalaminového kofaktoru zaujímat také oxidační číslo +2 [Co(II)Cbl].[34] Tato forma kofaktoru vzniká oxidací Co(I)Cbl v aerobním prostředí přibližně každých 2000 katalytických cyklů a je katalyticky neaktivní.[25,34] Aby nedocházelo při oxidaci k permanentní deaktivaci enzymu, mají jak prokaryotické, tak eukaryotické organismy mechanismy, které kofaktor reduktivně reaktivují a tím navrací enzym zpět do katalytického cyklu.[30] Jak shrnuje například Bandarain *et al.*,[29] pro průběh reaktivačního cyklu je nutný AdoMet jako zdroj methylové skupiny a flavodoxin nebo flavodoxin-like doména jako zdroj redukčních ekvivalentů. Z obecného pohledu spočívá reaktivace enzymu v reduktivní methylaci Co(II)Cbl za vzniku katalyticky aktivního MeCo(III)Cbl (Obrázek 5).[34]

Reaktivační cyklus u enzymu z *E. coli* začíná přenosem elektronu z NADPH na FAD, který je vázaný ve ferredoxin (flavodoxin)-$NADP^+$ oxidoreduktáze (FNR). FNR následně redukuje FMN

(flavinmononukleotid) vázaný ve flavodoxinu, který je schopný interakce s aktivační doménou MetH a přenosu elektronu na kobalaminový kofaktor.[36–38] Po vazbě flavodoxinu a přenosu elektronu dochází k přechodu do konformace AdoMet:Cob (Obrázek 4), ve které je možný přenos methylové skupiny z AdoMet za vzniku aktivního MeCo(III)Cbl.[28,39] Následně se enzym navrací do katalytického cyklu.

Pro efektivní fungování enzymu je nutné oddělení katalytického a reaktivačního cyklu, především z hlediska odlišení dvou různých methylových donorů (5-methyl-THF a AdoMet) v každém z cyklů.[40] To je zajištěno právě konformačními změnami enzymu, které jsou indukovány změnou ligandů kobalaminového kofaktoru v reakci na vazbu flavodoxinu.[40,41]

V předchozím textu byl uvažován především enzym MetH z *E. coli*, je ale nutné poznamenat, že u některých jiných organismů jsou určité prvky především reaktivačního cyklu odlišné. Prvním z rozdílů je, že zatímco u *E. coli* je AdoMet do reaktivačního cyklu dodáván jednou z domén MetH,[41] u *T. maritima* zastává tuto roli samostatný polypeptid, se kterým methionin syntáza během reaktivačního cyklu interaguje.[26] Další rozdíly nalézáme mezi lidským a bakteriálními enzymy, které se liší v tom, jaké proteiny poskytují redukční ekvivalenty (více v Kapitole 3).[38,42]



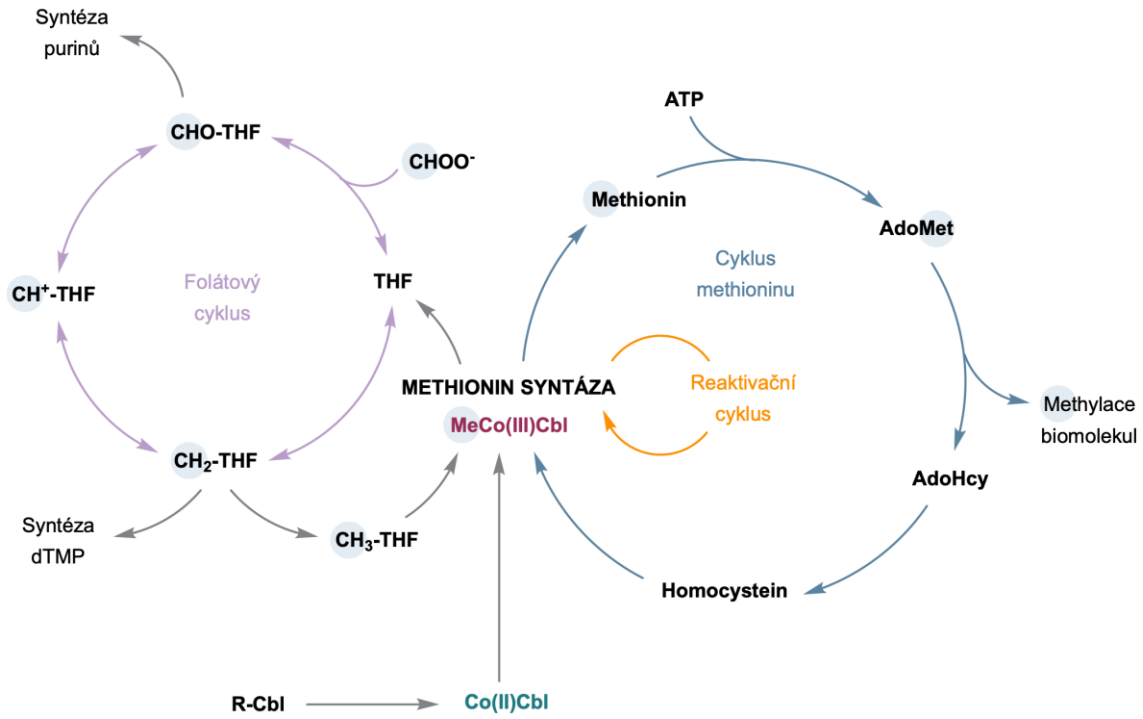
Obrázek 5. Katalytický a reaktivační cyklus kobalamin-dependentní MS. **AdoMet**, *S*-adenosylmethionin; **AdoHcy**, *S*-adenosylhomocystein **Co(I)Cbl**, kob(I)amin; **Co(II)Cbl**, kob(II)alamin; **MeCo(III)Cbl**, methylkobalamin; **THF**, tetrahydrofolát; **CH_3-THF**, 5-methyltetrahydrofolát; **e^-**, elektron pocházející z flavodoxinu nebo flavodoxin-like domény.[22]

3 Methionin syntáza v lidském metabolismu

Lidská methionin syntáza (hMS, EC 2.1.1.13) je kobalamin-dependentní enzym s molekulovou hmotností 140,3 kDa.[43] Identita proteinové sekvence hMS s MetH enzymem z *E. coli* je 53 %, v porovnání s enzymem z *C. elegans* 63 %. Krystalová struktura je známá pouze pro C-koncovou aktivační doménu (PDB ID: 2O2K)[33], ale na základě sekvenční podobnosti s MetH z *E. coli* lze

předpokládat, že struktura celého enzymu odpovídá obecné struktuře kobalamin-dependentních MS (viz Kapitola 2.2).[44] N-konec tedy vytváří dva $(\beta\alpha)_8$ barely vázající Hcy a 5-methyl-THF, poté následuje centrální část vázající Cbl a C-koncová aktivační doména, která váže AdoMet. Co se týče zastoupení enzymu v lidských tkáních, tak nejvyšší míra exprese mRNA pro hMS byla u dospělých jedinců prokázána v pankreatu, kosterní svalovině a srdci, naopak nízká hladina byla detekována v játrech.[43] V buňce je hMS lokalizována v cytoplazmě.[45]

Zásadní role hMS v metabolismu spočívá především v propojení dvou metabolických drah – cyklu methioninu a folátového cyklu (Obrázek 6).[33,46] Obě tyto dráhy jsou spolu s transsulfurační dráhou součástí 1C (one-carbon) metabolismu, jehož hlavní úlohou je aktivace 1C skupiny pro řadu důležitých buněčných procesů.[47] Mezi tyto procesy patří například proteosyntéza, syntéza AdoMet a s ním spojené methylace biomolekul nebo syntéza purinů a pyrimidinů. Dále je hMS nezbytná pro přeměnu 5-methyl-THF, tedy nejčastější formy folátu v lidském těle, na THF, který je klíčovým intermediátem v syntéze purinových nukleotidů.[33] Protože hMS je jediný enzym, který je schopen katalýzy této reakce, má porušení jeho funkce výrazné klinické důsledky (viz Kapitola 4).[46]



Obrázek 6. Folátový cyklus, cyklus methioninu a reaktivační cyklus. **ATP**, adenosin trifosfát; **AdoMet**, S-adenosylmethionin; **AdoHcy**, S-adenosylhomocystein; **THF**, tetrahydrofolát; **CHOO⁻**, formiát; **CHO-THF**, 10-formyltetrahydrofolát; **CH^+-THF**, 5,10-methenyltetrahydrofolát; **CH_2-THF**, 5,10-methylentetrahydrofolát; **CH_3-THF**, 5-methyltetrahydrofolát; **R-Cbl**, kobalamin s horním axiálním ligandem (např. CN); **Co(II)Cbl**, kob(II)alamin; **MeCo(III)Cbl**, methylkobalamin.[46]

3.1 Reaktivační cyklus

Jak již bylo uvedeno, kobalaminový kofaktor MS je v aerobních podmínkách náchylný k oxidaci, která blokuje aktivitu enzymu. V rámci reduktivní reaktivace bakteriální methionin syntázy jsou

redukční ekvivalenty poskytovány a přenášeny ferredoxin (flavodoxin)-$NADP^+$ reduktázou (FNR) a flavodoxinem.[38,42] Tyto dva proteiny se ale v lidských buňkách nevyskytují a reduktivní reaktivaci hMS tak zajišťuje jediný enzym – methionin syntáza reduktáza (MSR, EC 1.16.1.8). MSR je multidoménový protein z rodiny tzv. diflavin reduktáz, který ve své struktuře obsahuje domény homologní s bakteriální FNR (NADPH- a FAD-vazebné domény) i s flavodoxinem (FMN-vazebná doména).[38] Tyto domény, které jsou klíčové pro zajištění reaktivace hMS, vykazují strukturní homologii také s dalšími proteiny této rodiny, například s cytochrom P450 oxidoreduktázou nebo NO syntázou.[48,49]

V reaktivačním cyklu dochází nejprve k oxidaci NADPH a přenosu takto získaného elektronu přes FAD (flavinadenindinukleotid) a FMN (flavinmononukleotid) na Co(II)Cbl.[48] NADPH, FAD a FMN jsou během katalýzy vázány v odpovídajících doménách MSR. Důležitou roli v reaktivaci hraje FMN-vazebná doména, která je díky své pohyblivosti schopna zprostředkovat přenos redukčních ekvivalentů mezi FAD-vazebnou doménou MSR a enzymem hMS. Reaktivační cyklus je dokončen přenosem methylové skupiny za vzniku MeCo(III)Cbl, kterou poskytuje AdoMet vázaný v aktivační doméně hMS.[33]

Yamada *et al.*[38] dále ukázal, že činnost MSR není omezena pouze na reaktivaci methionin syntázy. Enzym vystupuje také jako molekulový chaperon, který stabilizuje apoenzym MS (apoMS) a napomáhá tvorbě holoenzymu MS (holoMS). Díky stabilizaci apoMS *in vivo* je pravděpodobně zajištěno, že protein není degradován ještě před zabudováním kobalaminu, jehož koncentrace v tkáních jsou velmi nízké. Dále se MSR nejspíše podílí také na inkorporaci volného Co(II)Cbl do apoMS za vzniku holoMS s vázaným MeCo(III)Cbl.

3.2 Metabolismus kobalaminu (vitamínu B_{12})

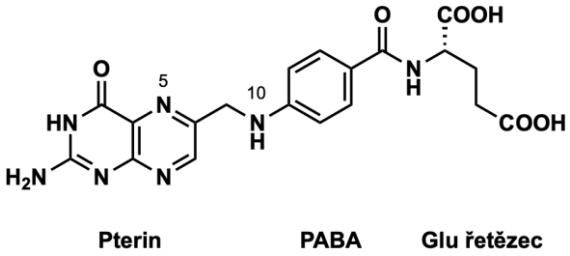
Biosyntéza kobalaminu *de novo* je popsána u některých bakterií a *Archea.*[50] Naproti tomu zvířata a lidé neumí vitamín B_{12} syntetizovat, a musí ho proto získávat z vnějších zdrojů. U lidí je kobalamin nutný pro fungování dvou enzymů: kobalamin-dependentní MS a mitochondriální methylmalonyl-CoA mutázy (MUT, EC 5.4.99.2).[45]

Na transportu kobalaminu získaného z potravy do lidských buněk se podílí tři proteiny: haptokorin (HC), vnitřní faktor (intrinsic factor, IF) a transkobalamin (TC).[51] Haptokorin váže Cbl v žaludku, už v duodenu je však degradován pankreatickými proteázami a uvolněný Cbl tvoří nový komplex s IF.[52] Tento komplex je poté transportován ze střeva do krve, kde se Cbl váže na TC nebo HC za vzniku holoTC, respektive holoHC. Přestože holoHC je v krevní plazmě převažující formou, do většiny buněk vstupuje přednostně holoTC, a to receptorem zprostředkovanou endocytózou.[46] V kyselém prostředí lysozomu je Cbl uvolněn z vazby na TC a poté je transportován do cytosolu. V cytosolu katalyzuje MMACHC („methylmalonic aciduria type C and homocystinuria“) reduktivní eliminaci kyanoskupiny v horní axiální pozici vitamínu B_{12} za vzniku ‘‘base-off’’ Co(II)Cbl.[53] Ten je klíčovým

meziproduktem v další tvorbě aktivních kofaktorů, tedy MeCbl pro enzym hMS a AdoCbl pro enzym MUT. Podle Bassila *et al.*[54] vzniká za účelem dodání Cbl do MS multiproteinový komplex, tzv. MS interaktom složený z hMS, MSR, MMACHC a MMADHC („methylmalonic aciduria type D and homocystinuria“).

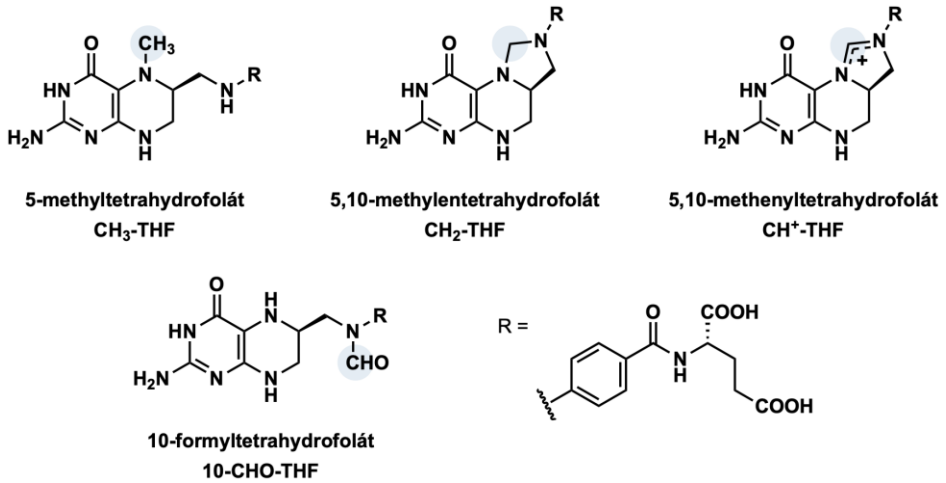
3.3 Folátový cyklus a syntéza nukleotidů

Foláty jsou obecně látky, které ve své struktuře obsahují heterocyklický pterinový kruh, který může být redukován nebo oxidován, PABA linker, a glutamátový řetězec o různé délce (Obrázek 7).[47] Délka glutamátového zbytku je jedním z faktorů určujících lokalizaci folátů v buněčných kompartmentech.



Obrázek 7. Struktura kyseliny listové obsahující pterinový kruh, PABA linker a glutamátový řetězec, který může tvořit až 10 glutamátů; na N^5 a/nebo N^{10} se váží 1C zbytky.[46]

Lidé a zvířata neumí folát syntetizovat *de novo*.[47] Z přírodních zdrojů je folát většinou získáván jako polyglutamát, který musí být před absorpcí hydrolyzován na monoglutamátovou formu.[55] Zdrojem folátů je také časté potravinářské aditivum kyselina listová (Obrázek 7).[46] Jde o oxidovanou monoglutamátovou formu, která je na fyziologicky aktivní THF převedena dvojnásobnou redukcí katalyzovanou dihydrofolát reduktázou (DHFR). THF může poté na N^5 a/nebo N^{10} vázat jednouhlíkaté molekuly, jako methyl ($–CH_3$), methylen ($–CH_2–$), methenyl ($=CH–$ nebo $–CH^+–$) nebo formyl ($–CHO$) (Obrázek 8).[55]



Obrázek 8. Struktury vybraných folátů s navázanými jednouhlíkatými molekulami.

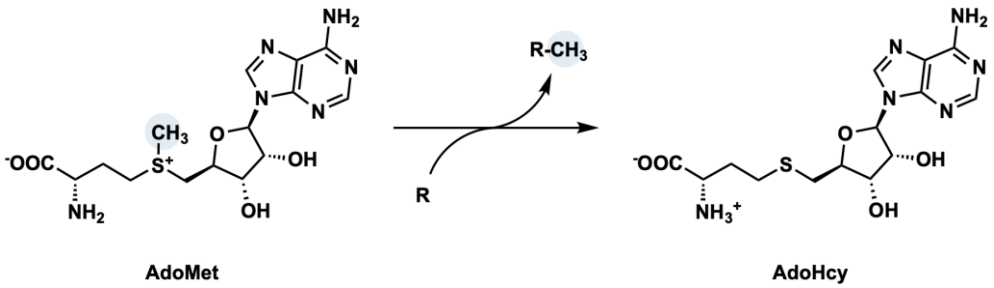
V lidském metabolismu je hlavním zdrojem 1C jednotek serin, který je v mitochondriích v přítomnosti THF demethylován za vzniku glycinu a 5,10-methylen-THF.[46] V dalším pokračování

cyklu v mitochondriích je 5,10-methylen-THF oxidován nejprve na 5,10-methenyl-THF, a poté na 10-formyl-THF. Protože 10-formyl-THF nemůže přecházet přes mitochondriální membránu, je přeměněn na volný THF a formiát, který je transportován do cytosolu. Tam je formiát vázán na THF za opětovného vzniku 10-formyl-THF, který je následně zdrojem 1C jednotek v *de novo* syntéze purinových nukleotidů adeninu a guaninu. Alternativně dochází při pokračování folátového cyklu k redukci 10-formyl-THF až na 5,10-methylen-THF, který má v buňce několik využití:

i. Opětovná methylace glycinu za vzniku serinu a THF, čímž je dokončen folátový cyklus.
ii. Zapojení do syntézy purinových nukleotidů činností thymidylát syntázy (TYMS).[47] Tento enzym katalyzuje přeměnu deoxyuridin monofosfátu (dUMP) a 5,10-methylen-THF na deoxythymidin monofosfát (dTMP) a dihydrofolát (DHF). Následná regenerace THF z DHF je zajištěna DHFR.
iii. Další redukce na 5-methyl-THF a vstup do cyklu methioninu (viz dále).

3.4 Produkce 5-methyl-THF a cyklus methioninu

Redukce 5,10-methylen-THF na 5-methyl-THF je katalyzována NADPH-dependentní aktivitou cytosolické methylen tetrahydrofolát reduktázy (MTHFR).[46,47] Tato reakce je nevratná a určuje zapojení redukované molekuly do cyklu methioninu. 5-methyl-THF je poté v reakci katalyzované hMS využit jako zdroj methylu pro opětovnou methylaci homocysteinu za vzniku methioninu a THF. V pokračování cyklu je z methioninu a ATP produkován AdoMet, který je hlavním zdrojem methylu v organismu[46] a po ATP druhým nejčastějším enzymovým kofaktorem.[47] Prostřednictvím enzymů methyltransferáz (MT) je tato methylová skupina přenášena na metabolity, DNA, RNA a proteiny včetně histonů.[56] Přenos methylu na substrát přeměňuje AdoMet na AdoHcy (Obrázek 9), který funguje jako inhibitor většiny známých MT.[57] Z tohoto důvodu musí být AdoHcy odbouráván na adenosin a Hcy, který poté vstupem do reakce, ve které je opětovně methylován, dokončuje cyklus.



Obrázek 9. Schéma methylační reakce s využitím AdoMet za vzniku AdoHcy, „R“ označuje methylovanou biomolekulu.

Alternativní využití má methionin, ať už získaný z potravy nebo opětovnou methylací homocysteinu, v proteosyntéze.[46] Kodon AUG kódující tuto aminokyselinu má funkci start-kodonu, takže methionin je zařazován jako první aminokyselina do všech nascentních polypeptidů.

4 Methionin syntáza v medicíně

4.1 Methyl-folátová past

Hypotéza methyl-folátové pasti, která je dnes všeobecně přijímána, byla formulována již v 70. letech 20. století jako vysvětlení patologií spojených s deficiencí vitamínu B_{12}.[58] Mezi tyto patologie patří především megaloblastická anémie a rozvoj některých specifických neuropatií.[59]

Na buněčné úrovni způsobuje deficience B_{12} poruchu funkce methionin syntázy, což primárně vede k depleci buněčných hladin methioninu a akumulaci 5-methyl-THF.[59–61] Hlavním důsledkem nedostatku methioninu v buňce je snížení množství AdoMet a míry methylace biomolekul. Klinicky významné je především omezení methylace myelinu v CNS, které vede ke vzniku specifického typu neuropatie známého jako subakutní kombinovaná degenerace. Hromadění 5-methyl-THF je způsobené především tím, že syntéza 5-methyl-THF katalyzovaná MTHFR je nevratná, a že MS jediným enzymem, který umí tuto formu folátu využívat. Pokud je tedy MS v důsledku deficience vitamínu B_{12} neaktivní, je 5-methyl-THF v buňce metabolicky imobilizován a zároveň dochází k vyčerpání zásob THF, který je nutný pro syntézu nukleotidů. To vede k porušení syntézy DNA, což negativně ovlivňuje především rychle se dělící buňky v kostní dřeni a vede k rozvoji megaloblastické anémie.[46]

4.2 Deficit methionin syntázy

Deficit methionin syntázy neboli cblG defekt je vzácné autosomálně recesivní onemocnění, při kterém dochází ke snížení nebo ztrátě funkce hMS.[46,62,63] Nemoc je způsobena mutacemi v genu kódujícím hMS (*MTR)*, který je lokalizován v chromozomovém regionu 1q42.3-43.[43] Klinickými projevy cblG defektu je hyperhomocysteinemie, megaloblastická anémie, oftalmologické a neurologické poruchy jako záchvaty, ataxie, letargie, opožděný vývoj a demyelinizace v CNS.[64] Příznaky onemocnění se obyčejně objevují do dvou let věku, byla nicméně zaznamenána také jeho pozdější manifestace.[65]

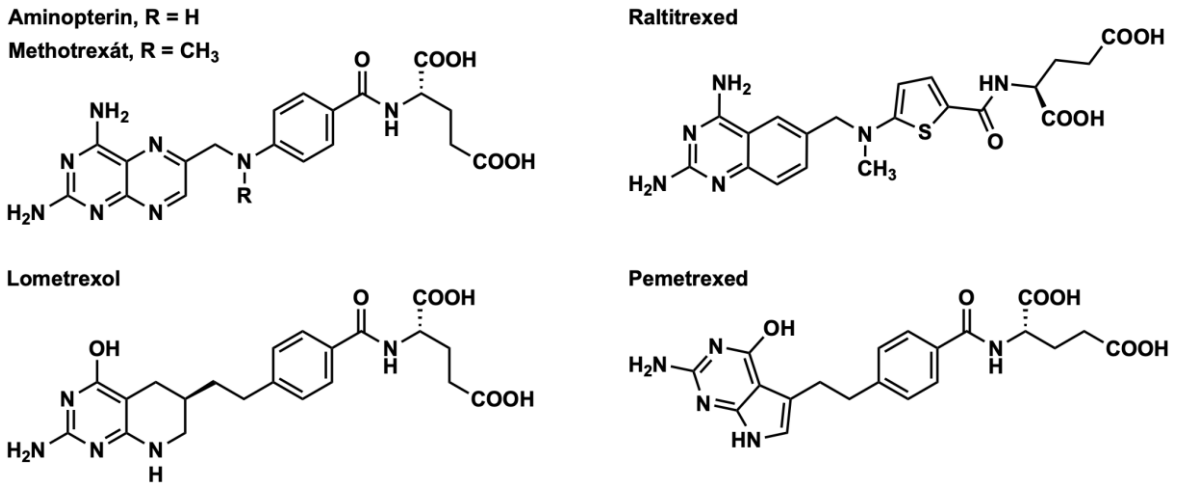
Z biochemického hlediska je pro cblG defekt typická akumulace homocysteinu a 5-methyl-THF a také nízká hladina methioninu.[64] Zvýšená hladina homocysteinu v krevní plazmě je pravděpodobným rizikovým faktorem pro vznik onemocnění koronárních tepen, defektů nervové trubice a Downova syndromu, jak shrnuje například Wolthers *et al*.[66] Akumulace THF vede k narušení folátového cyklu a syntézy nukleotidů.[62] Pokles intracelulární hladiny methioninu způsobuje deficienci AdoMet a snižuje míru methylace DNA, RNA, histonů, transkripčních faktorů a RNA-vazebných proteinů, čímž dochází k poruchám regulace genové exprese. Nejvíce je ovlivněna exprese genů spojených s vývojovými, neurologickými, kardiovaskulárními a oftalmologickými vadami. Pravděpodobně dochází také k rozvoji alternativního splicingu, který má za následek významné změny v mechanismech odpovědi na stres, organizaci cytoskeletu, methylacích biomolekul a vazbě RNA.

Současná terapie cblG defektu zahrnuje suplementaci vitamínu B_9 (ve formě kyseliny listové nebo folinové – leukovorinu), betainu, methioninu a prekurzorů kobalaminu (hydroxy-, kyano-, methylkobalamin).[64,67] Terapie cílí především na úpravu hematologických a biochemických parametrů a zajištění normálního neurologického vývoje.[64] K vylepšení hematologických a biochemických hodnot většinou dochází poměrně rychle, neurologické parametry reagují většinou pomaleji nebo také vůbec.[67–69]

Data ohledně úspěšnosti léčby se různí, což je pravděpodobně způsobeno především malým počtem diagnostikovaných pacientů a nejednotným způsobem terapie. Například podle Krippse *et al.*[69] došlo po začátku terapie u pěti pacientů s diagnostikovaným cblG defektem k výraznému zlepšení klinických parametrů. Naopak Huemer *et al.*[68] popisuje, že u osmi ze třinácti diagnostikovaných pacientů se v reakci na terapii klinické parametry nezlepšily a u zbylých pěti pacientů bylo zlepšení pouze mírné. Pravděpodobné ale je, že i pokud léčba nevede ke zlepšení stavu pacienta, dochází alespoň k zastavení dalšího progresu nemoci.[64]

4.3 Methionin syntáza jako chemoterapeutický cíl

Folátový cyklus se stal cílem chemoterapeutické léčby již ve 40. letech 20. století, kdy byl poprvé použit folátový analog 4-aminopterin (Obrázek 10), pro léčbu akutní leukémie u dětí.[70] Slibné výsledky této terapie podnítily vývoj nových a méně toxických léčiv tzv. antifolátů – analogů kyseliny listové, který již přinesl řadu úspěchů, a který stále probíhá (Obrázek 10).[71] Princip léčby rakoviny s využitím antifolátů spočívá v inhibici folát-dependentních enzymů, což vede k blokaci syntézy nukleotidů a k zastavení proliferace buněk. Pravděpodobně nejznámějším antifolátem je methotrexát (MTX), inhibitor DHFR, který je využíván pro léčbu akutní lymfoblastické leukémie a lymfomů centrální nervové soustavy.[72] Dalšími v současnosti využívanými antifoláty jsou například raltitrexed (inhibitor TYMS), lometrexol (inhibitor GARFT – glycinamid ribonukleotid formyl transferázy a AICARFT – aminoimidazol carboxamid formyl transferázy) nebo pemetrexed (inhibitor DHFR, TYMS, GARFT, AICARFT) (Obrázek 10).[71,73]



Obrázek 10. Chemické struktury vybraných antifolátů.[71,73]

Stejně jako u většiny jiných léčiv, má i terapie antifoláty své problémy.[74] Jedním z nich je rezistence vznikající z důvodu blokace transportu antifolátů do buněk, snížená afinita k cílovému enzymu, nebo zvýšený export z buněk. Další komplikací v léčbě antifoláty je toxicita vůči zdravým buňkám pacienta. Uvedené, i další problémy, podněcují snahy o nalezení nových terapeutických cílů a vývoj nových léčiv. Mezi mnoha enzymy, u kterých byl v posledních letech potenciál v léčbě rakoviny popsán, jsou i další enzymy folátového cyklu, konkrétně serin hydroxymethyltransferáza 2 (SHMT2), methylentetrahydrofolátreduktáza 2 (MTHFR2)[75] a také methionin syntáza.[76,77]

4.3.1 *In vitro* a *in vivo* testování

Možné využití methionin syntázy v chemoterapii popíšu podrobněji v následujícím textu, přičemž bych se ráda zaměřila na dvě teprve nedávno publikované studie,[76,77] které ukazují na důležitost tohoto enzymu pro růst a dělení rakovinných buněk při fyziologických hladinách folátu.

Nejprve byla zkoumána schopnost proliferace rakovinných buněk s deletovaným genem pro methionin syntázu (ΔMTR) *in vitro* na médiu s různými zdroji folátů. Ghergurovich *et al.*[76] studoval buňky tří rakovinných linií: HCT116 (kolorektální karcinom), 8988T (karcinom pankreatu), HepG2 (hepatocelulární karcinom). Podle očekávání nebyl růst těchto ΔMTR linií v médiu s obsahem kyseliny listové výrazně ovlivněn a zároveň ani kontrolní ani ΔMTR buňky nerostly na médiu úplně bez folátů. Na médiu, ve kterém byl jediným zdrojem folátů 5-methyl-THF (nejčastější forma folátu v lidské plazmě), rostly pouze kontrolní linie, ale ΔMTR linie vůbec. K obnovení růstu ΔMTR linie došlo při suplementaci 5-formyl-THF, což lze vysvětlit tím, že jeho vstup do cyklu folátu je nezávislý na MS. Sullivan *et al.*[77] studoval A549 linii (adenokarcinom plic) a TT buňky (karcinom štítné žlázy). Také u těchto linií byla MS esenciální pro proliferaci, pokud byl jediným zdrojem folátů v médiu 5-methyl-THF, a navíc byla ukázána neschopnost proliferace v médiu s fyziologickým poměrem 5-methyl-THF : kyselina listová (96 : 4).

Následně byly provedeny testy *in vivo*. Při implantaci HCT116 ΔMTR buněk do myší, byl zaznamenán pomalejší růst nádoru, což bylo ještě umocněno, když byla myš krmena potravou s malým množstvím folátů.[76] Růst nádoru byl obnoven po orální suplementaci 5-formyl-THF. Podobně také podle druhé studie byla exprese MTR nutná pro vznik nádoru z A549 buněk implantovaných do myši krmené dietou s obsahem kyseliny listové, který odpovídal obsahu v běžné lidské stravě.[77] Suplementace kyselinou listovou vedla k obnově schopnosti proliferace těchto buněk.

Sullivan *et al.*[77] i Ghergurovich *et al.*[76] zkoumali také vliv delece MTR na metabolismus purinových a pyrimidinových nukleotidů. Metabolomická analýza HCT116 ΔMTR buněk kultivovaných na médiu s kyselinou listovou a především s 5-methyl-THF ukázala zvýšené množství intermediátů syntézy purinů, a zároveň pokles hladin z nich odvozených nukleotidů.[76] *In vivo* nebyla deplece nukleotidů tak výrazná, buňky jsou tedy při poškození *de novo* syntézy nejspíše schopné nukleotidy suplementovat. Zároveň bylo zaznamenáno, že delece MTR měla výraznější dopad na

syntézu purinů než thymidinu. Sullivan *et al.*[77] popsal u ΔMTR rakovinných buněk kultivovaných na médiu s 5-methyl-THF pomalejší proliferaci. Také v tomto případě došlo k nárůstu množství prekurzorů purinů, a naopak k úbytku dTMP a purinových nukleotidů. Schopnost proliferace MTR knockoutů na 5-methyl-THF médiu byla obnovena přidáním prekurzorů purinů a pyrimidinů, což ukazuje, že právě jejich vyčerpání je hlavním důvodem zastavení růstu a dělení buněk.

Ani jedna z prací neprokázala, že by exprese MTR byla nezbytná pro homeostázu methioninu v rakovinných buňkách.[76,77] Blokace MS sice vede ke krátkodobému snížení množství methioninu a AdoMet u myší, buňky však mají nejspíše k dispozici alternativní metabolické dráhy, které to umí kompenzovat.[78] Pomocí izotopového značení bylo navíc zjištěno, že většina methioninu v nádorových buňkách není generována opětovnou methylací homocysteinu, ale je získávána importem.[76]

Z obou studií vyplývá, že proliferující nádorové buňky potřebují činnost MS především pro tvorbu THF, který je klíčovým intermediátem syntézy nukleotidů.[76,77] Při experimentech *in vitro* se ukázalo, že buňky mohou tuto závislost na činnosti MS překonat suplementací kyseliny listové nebo 5-formyl-THF z média. Pozitivní bylo zjištění, že v případě, kdy složení média odpovídalo zastoupením folátů lidské plazmě a u *in vivo* experimentů, nebyly ΔMTR buňky schopné proliferace. Z toho plyne, že látky inhibující MS by mohly mít v léčbě rakoviny určitý potenciál.

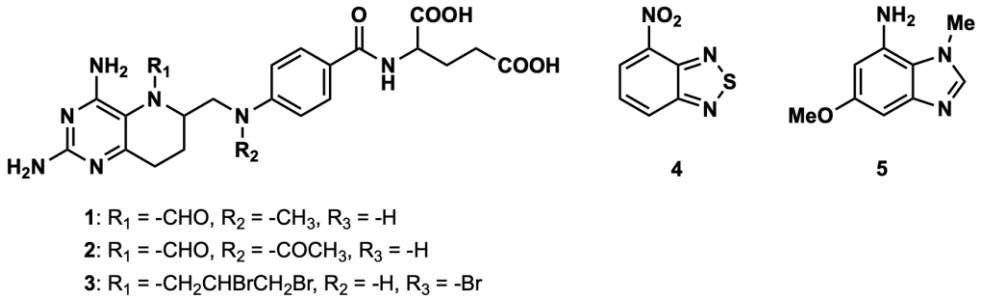
4.3.2 Inhibitory kobalamin-dependentní MS

V předcházejícím textu byla demonstrována nezbytnost MS v metabolismu, na kterou ukazuje, že porucha její funkce má zásadní klinické důsledky (viz methyl-folátová past a cblG defekt) i potenciál v ovlivnění proliferace rakovinných buněk. I přes pozitivní výsledky *in vivo* a *in vitro* testování a fakt, že možnost využití MS jako potenciálního chemoterapeutického cíle byl v literatuře zdůrazněn již před lety[79], není zatím známo mnoho inhibitorů tohoto enzymu.

Již v roce 1998 navrhla Matthews *et al.*[79] tři potenciální strategie pro design inhibitorů kobalamin dependentní MS v souvislosti s léčbou rakoviny. První z popsaných možností je příprava analogů folátu, které by kompetovaly o vazebné místo s 5-methyl-THF. Dále je možné cílení na AdoMet vazebné místo, což by vedlo k blokaci reaktivace enzymu. Posledním typem inhibitorů by mohly být látky, které se strukturně podobají homocysteinu a byly by schopné blokovat jeho koordinaci k zinku.

Zhang *et al.*[80] a Banks *et al.*[81] publikovali jedny z mála prací, které se zabývají designem a přípravou inhibitorů lidské MS. Zhang *et al.*[80] připravil sérii 8-deazatetrahydrofolátových analogů s elektrofilním substituentem na pozici N^5 (Obrázek 11, látky **1** až **3**). Dále testoval míru inhibice enzymu, přičemž u nejaktivnějších látek byly hodnoty IC_{50} 8,11 μM (**1**), 1,73 μM (**2**) a 1,43 μM (**3**). Pouze nejaktivnější z těchto tří látek ale následně vykazovala aktivitu vůči rakovinným buněčným liniím. Banks *et al.*[81] ve své práci při přípravě inhibitorů vychází z benzimidazolů a benzthiadiazolů (Obrázek 11, látky **4** a **5**). Nejvyšší míru inhibice vykazoval 5-nitrobenzothiadiazol **4** s IC_{50} 80 μM, nejaktivnějším benzimidazolem byla látka **5** s IC_{50} 95 μM. Na základě měření kinetiky inhibice bylo

zjištěno, že benzimidazoly jsou spíše kompetitivními inhibitory, které se váží do folát-vazebného místa, zatímco benzthiadiazoly vykazují převážně smíšenou a akompetitivní inhibici. Podle autorů může být mechanismus inhibice benzthiadiazoly způsoben vytěsňováním DMB ligandu kobalaminu, vazbou do AdoMet-vazebného místa nebo tvorbou disulfidických můstků s cysteiny v Hcy-vazebném místě.



Obrázek 11. Chemické struktury vybraných inhibitorů MS. Struktury 1 až 3,[80] struktury 4 a 5.[81]

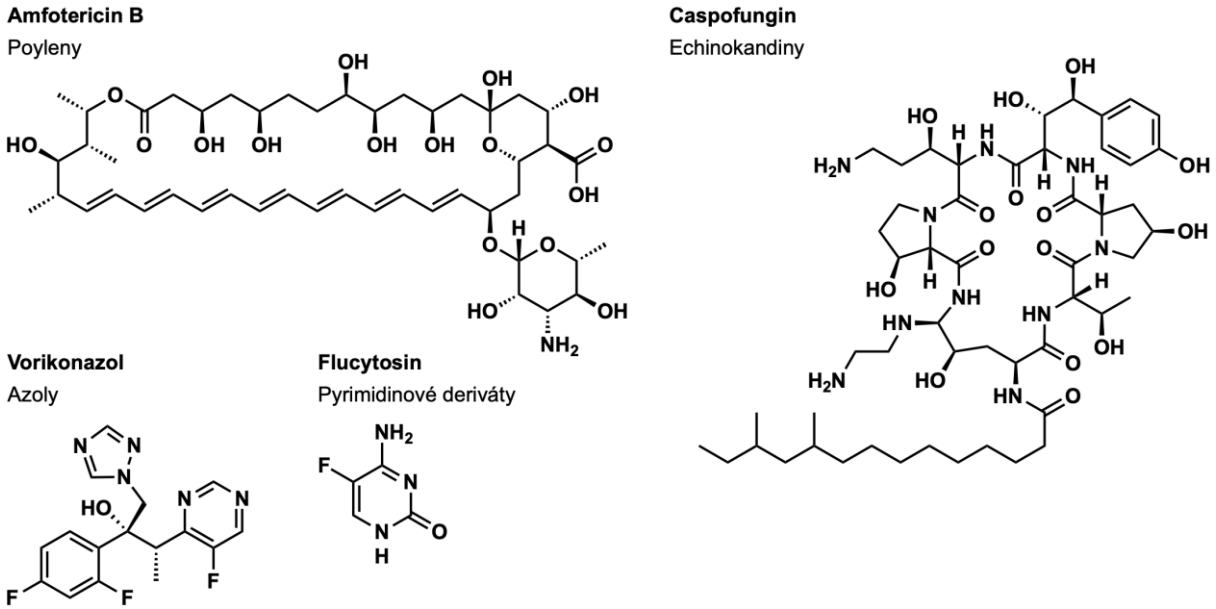
V souvislosti s potenciálními inhibitory MS je nicméně nutné uvést také některé problémy, které mohou tyto látky způsobovat, především jejich možnou toxicitu vůči zdravým buňkám. Například Matthews *et al.*[79] popisuje, že pro snížení toxicity může být výhodné cílení na Hcy-vazebné místo, protože narozdíl od folátů a AdoMet je homocystein substrátem pouze dvou dalších lidských enzymů, které navíc nemají zásadní metabolickou roli. Při cílení na AdoMet-vazebné místo může, vzhledem k velkému počtu enzymů využívajících AdoMet, poměrně snadno docházet k nežádoucímu ovlivňování aktivity i těchto enzymů. Tento jev, i když z opačného pohledu, popisuje například Fick *et al.*,[27] který studoval vazbu analogu AdoMet sinefunginu do reaktivační domény MetH z *E. coli*. Sinefungin je používán jako inhibitor methyltransferáz a vykazuje poměrně velkou míru nefrotoxicity, což autoři vysvětlují tím, že zároveň zabraňuje reaktivaci MS a narušuje cyklus methioninu a folátový cyklus. Nežádoucí inhibice dalších enzymů je problémem také u dnes běžně používaných antifolátů. V současné terapii je tento problém částečně kompenzován především podávání leukovorinu (kyseliny folinové), což by mohlo být řešením i v případě inhibitorů MS.[76] Toxicita inhibitorů by dále mohla být omezena v případě, že by byla MS exprimována v rakovinných buňkách ve větší míře.[77] Toto by mohlo platit, především vzhledem k vyšším nárokům některých nádorových typů na syntézu nukleotidů, jejíž intermediáty tento enzym produkuje.

4.4 Methionin syntáza jako antifungální cíl

Nemocím, které jsou způsobené patogenními houbami, se v posledních letech zaslouženě dostává stále větší pozornosti. Nejčastěji jsou tyto infekce pouze povrchové, takže způsobují sice nepříjemná, ale ne život ohrožující onemocnění.[82,83] Problémem ale je možná penetrace do krve nebo plic a rozvoj takzvané invazivní mykotické infekce. K tomu dochází především u pacientů s oslabenou imunitou například při onemocnění virem HIV, po transplantaci orgánů, po chemoterapii nebo i v důsledku běžnějších virových infekcí. Přestože invazivní mykotické infekce jsou oproti těm povrchovým méně časté, představují mnohonásobně větší zdravotní riziko: úmrtnost přesahuje 50 % a každý rok zabijí

více než 1,5 milionu lidí.[84] Přes 90 % z těchto úmrtí je způsobeno patogeny z rodů *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* a *Pneumocystis*. Ohrožení, které fungální infekce představují, popisuje také dokument, který byl v roce 2022 vydán WHO pod názvem „Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action“.[85]

V terapii fungálních infekcí se medicína momentálně spoléhá především na čtyři hlavní skupiny léčiv (Obrázek 12).[86,87] **Polyeny** jsou přírodní látky složené z nenasyceného makrocyklického laktonu a aminosacharidu mykosaminu.[88] Mezi polyeny patří například amfotericin B, který způsobuje smrt buněk patogenu tím, že interaguje s ergosterolem v plazmatické membráně a vytváří póry, přes které z buňky unikají ionty.[86,89] Nevýhodou polyenů je, že vzhledem ke strukturní podobnosti ergosterolu s cholesterolem v membránách savčích buněk vykazují vysokou míru toxicity.[88] **Echinokandiny**, například caspofungin, jsou látky tvořené hexapeptidovým cyklem s lipidovým řetězcem o různé délce.[88] Léčiva této skupiny fungují jako nekompetitivní inhibitor 1,3-β-D-glukan syntázy, která je nezbytná pro syntézu buněčné stěny hub.[87] Vzhledem k nepřítomnosti buněčné stěny u savčích buněk, jsou echinokandiny málo toxické a nalézají časté využití v léčbě candidóz. **Azoly**, mezi které patří například vorikonazol, jsou nejvíce využívanou skupinou antifungálních léčiv, především díky nízké toxicitě a možnosti intravenózní i orální administrace.[87] Ve struktuře obsahují pětičlenný dusíkatý heterocyklus, který vazbou k hemovému železu lanosterol-14-α-demethylázy blokuje syntézu lanosterolu, klíčového prekurzoru biosyntézy ergosterolu. Problémem léčiv tohoto typu je, že mají většinou pouze fungistatický efekt, což vede k častému vzniku rezistence. Pyrimidinový derivát **flucytosin** (5-fluorocytosin) je v buňce nejprve fungální cytosin deaminázou konvertován na toxický 5-fluorouracil, který následně interferuje se syntézou RNA a DNA. Flucytosin je standardně využíván v kombinaci s dalšími antifungálními léčivy, protože při monoterapii dochází k rychlému rozvoji rezistence.



Obrázek 12. Chemické struktury některých v současnosti používaných antifungálních látek.

Jak již bylo naznačeno, současná terapie mykotických infekcí má své limitace. Jednou z nich je omezený počet selektivních terapeutických cílů, což je dáno tím, že houby i lidé jsou eukaryotní organismy, takže využívají velmi podobný metabolický aparát.[87] Proto je cílem většiny používaných léků biosyntéza ergosterolu nebo 1,3-β-D-glukanu, které jsou obsažené výhradně v plazmatické membráně, respektive buněčné stěně hub. Při takto nízkém počtu cílů může ale poměrně snadno docházet ke vzniku cross-rezistence, tedy rezistence na více léčiv současně. V posledních letech se také stále více setkáváme se vznikem nových rezistentních druhů, jako je například multirezistentní *Candida auris*.[90,91] V neposlední řadě je třeba upozornit na toxicitu některých používaných léků, jako je například akutní i chronická nefrotoxicita amfotericinu B[92] nebo toxicita některých dalších antifungálních látek vznikající interakcemi s jinými léčivy, která jsou pacientovi podávána.[86]

Výše uvedené problémy vedou ke snaze o vylepšení aktuálně dostupných terapeutik i o vývoj nových léčiv s alternativním mechanismem fungování.[86,92] Přehled potenciálních nových terapeutických cílů ve svých publikacích popsal například Perfect *et al.*,[86] Van Daele *et al.*[92] nebo Gintjee *et al.*,[93] přičemž jednou z uvedených možností je cílení na metabolismus aminokyselin, které jsou pro lidi esenciální. Patogenní houby mají, na rozdíl od lidí, metabolický aparát nutný pro syntézu těchto aminokyselin *de novo*, a právě díky specifitě enzymatického aparátu by mohly být látky cílící na tyto enzymy výhodné.[2,94] Zvláště vhodná je dráha biosyntézy methioninu a tryptofanu, protože koncentrace těchto aminokyselin v lidském séru je velmi nízká, takže se snižuje možnost jejich suplementace *in vivo*.[2] Methionin je v buňkách hub produkován tzv. aspartátovou dráhou, ve které je nejprve aspartát několika reakcemi přeměněn na homoserin. Ten je následně *O*-acetylován za vzniku *O*-acetyl-homoserinu, přímého prekurzoru homocysteinu. Posledním krokem této metabolické dráhy je methylace homocysteinu za vzniku methioninu, tedy reakce katalyzována právě methionin syntázou. U hub je tento protein označen jako Met6p a jde o enzym nezávislý na kobalaminu, který je kódován genem *MET6*.[95]

4.4.1 Vliv *MET6* na životaschopnost a virulenci patogenních hub

Za účelem posouzení vhodnosti Met6p jako antifungálního cíle byl tento enzym dosud studován hned u několika druhů patogenních hub.[94] Vybrané výsledky jsou diskutovány v nadcházejícím textu.

Suliman *et al.*[95] připravil a studoval linie diploidní kvasinky *Candida albicans* mutované v jedné nebo obou kopiích genu *MET6*. Zatímco heterozygotní *MET6*/*met6* knockout linie rostly bez závislosti na methioninu stejně jako wild-type (WT) linie, životaschopné linie s homozygotním genotypem *met6*/*met6* se autorům nepodařilo připravit. Kolonie s genotypem *met6/met6* nepřežily ani na médiu s přídavkem methioninu. Byl tedy připraven podmíněně mutantní kmen, u kterého byla jedna alela deletována a druhá vložena pod kontrolu regulovatelného promotoru. Když byl promotor aktivní, byla životaschopnost těchto mutantů srovnatelná s WT kmenem. Překvapivé bylo zjištění, že v případě reprimujících podmínek s přídavkem methioninu, byl narozdíl od *met6/met6* mutantů podmíněně

mutantní kmen životaschopný. K vysvětlení tohoto výsledku přispěla Western blot analýza, pomocí které bylo u podmíněných mutantů detekováno malé množství Met6p i v reprimujících podmínkách, pravděpodobně kvůli nedokonalé kontrole promotoru. Z toho plyne, že pro přežití buněk *C. albicans* je nutná minimální míra exprese *MET6* a také suplementace methioninu. Závislost na exogenním methioninu ukazuje, že takto malé množství Met6p nejspíše nezajišťuje v dostatečné míře jeho syntézu, může nicméně umožňovat růst mutantních buněk díky odbourávání toxického homocysteinu. Právě akumulace homocysteinu má totiž podle autorů největší podíl na neživotaschopnosti *met6/met6* mutantů.

Také Amich *et al*.[96] popisuje neúspěšné pokusy o přípravu *met6* mutantů, tentokrát u haploidního druhu *Aspergillus fumigatus*. Byl tedy znovu připraven kmen s podmíněně deletovaným genem *MET6* – AfS180. V případě aktivního promotoru nebyl růst tohoto kmene závislý na exogenním methioninu, naproti tomu v reprimujících podmínkách nepřežil kmen AfS180 ani na methioninovém médiu. Životaschopnost AfS180 v reprimujících podmínkách byla na úroveň srovnatelnou s WT kmenem obnovena pouze za velmi specifických podmínek, tedy po přídavku kyselin casamino (směsi aminokyselin získané kyselou hydrolýzou kaseinu) a nadbytku methioninu do média. Dále byla studována virulence kmene AfS180 *in vivo*. Když byl infikovaným myším podáván doxycyklin, který stimuloval expresi *MET6*, byla virulence srovnatelná s WT kmenem. Naproti tomu za reprimujících podmínek byla virulence výrazně nižší, což ukazuje že exprese *MET6* je pro virulenci tohoto patogenu důležitá. Neméně důležité jsou výsledky ukazující, že porušení exprese *MET6* během již rozvinuté infekce u larev modelového organismu *Galleria mallonela* mělo pozitivní efekt na její průběh a přežívání nakažených larev.[97] Tento efekt byl podle autorů kvantitativně srovnatelný s efektem porušení exprese jiného enzymu, který je častým cílem používaných antifungálních léčiv azolového typu.

V navazující studii byly studovány metabolické důsledky delece *MET6* u *A. fumigatus* s cílem najít konkrétní důvod esenciality enzymu pro přežití buněk.[97] Autoři studie postupně vyloučili, že by důvodem bylo porušení transsulfurační dráhy, blokace 1C metabolismu, akumulace homocysteinu nebo vyčerpání zásob THF. Jako hlavní důvod esenciality *MET6* tedy studie uvádí porušení buněčné energetické rovnováhy, což je podpořeno tím, že růst buněk s deletovaným genem *MET6* byl plně obnoven, pokud bylo do média přidáno ATP a methionin. Autoři toto pozorování vysvětlují také na metabolické úrovni. Blokace aktivity Met6p vede ke snížení syntézy purinů, což buňka interpretuje jako nedostatek nukleotidů a snaží se to kompenzovat zastavením glykolýzy a Krebsova cyklu a aktivací pentózofosfátové dráhy. Tato dráha spotřebovává ATP a produkuje ribózu-5-fosfát, jednu ze stavebních složek nukleotidů. To ale, vzhledem k blokované Met6p a syntéze purinů, vede pouze k vyčerpání energetických zásob.

Pascon *et al*.[98] studoval druh *Cryptococcus neoformans*. Narozdíl od předchozích případů byl *met6* mutant životaschopný, jeho růst byl ale pomalejší a byl závislý na exogenním methioninu. Důvodem

pro pomalejší růst tohoto kmene je podle autorů akumulace toxického homocysteinu, a ne pouze nedostatek methioninu. Ovlivněna byla také virulence tohoto mutantního kmene. Při jejím testování na myším inhalačním modelu přežili myši infikované WT kmenem průměrně 21 dní (100 % mortalita do 25. dne po infekci), zatímco všechny myši infikované *met6* kmenem přežili až do 70. dne, kdy byly utraceny. Dále byla u *met6* kmene zaznamenána vyšší citlivost k inhibitoru biosyntézy ergosterolu fluconazolu a kalcineurinovým inhibitorům FK506[99] a Cyklosporinu A,[100] a to pravděpodobně kvůli synergistickému efektu těchto látek a toxicity homocysteinu na blokaci biosyntézy ergosterolu.[87] Zaznamenáno bylo také zvýšení rezistence proti amfotericinu B, pravděpodobně protože akumulace homocysteinu snižuje množství ergosterolu, cíle amfotericinu B, v membráně.

4.4.2 Struktura Met6p a design potenciálních inhibitorů

Na základě výsledků *in vitro* a *in vivo* experimentů lze Met6p považovat za slibný antifungální cíl. Další kroky směrem k přípravě potenciálních inhibitorů tohoto enzymu byly podniknuty především u *C. albicans*, kde byl enzym purifikován,[101] studován pomocí steady-state kinetiky[101] i site-directed mutageneze[102] a bylo publikováno několik krystalových struktur.[13–15]

Základy pro využití CaMet6p jako antifungálního cíle položil Suliman *et al.*,[101] který popsal purifikaci enzymu a také provedl kinetickou analýzu pro určení substrátové specifity. Byly stanovena Michaelisovy konstanty pro 5-methyl-THF-Glu_2 (113 μM), 5-methyl-THF-Glu_3 (129 μM), 5-methyl-THF-Glu_4 (120 μM) a L-homocystein (14 μM). Bylo také ukázáno, že enzym jako substrát neakceptuje 5-methyl-THF-Glu_1.

S cílem definovat aminokyseliny klíčové pro katalýzu a pro vazbu substrátů provedl Prasannan *et al.*[102] site-directed mutagenezi a kinetickou analýzu mutantních enzymů. V době publikování studie nebyla ještě známá krystalová struktura enzymu, proto byl jeho trojdimensionální model vytvořen na základě porovnání genové sekvence *MET6* se sekvencí pro homologní enzym *A. thaliana*. Bylo mutováno celkem 8 aminokyselin, u kterých autoři podle vysoké konzervovanosti předpokládali, že mají úlohu ve vazbě substrátů. Mutované enzymy byly exprimovány v SDYα kmeni s deletovaným genem *MET6*, což je methioninový auxotrof bez aktivní methionin syntázy. Druhý a čtvrtý sloupec v Tabulce 1 ukazuje, jestli došlo po expresi mutovaného enzymu ke zvrácení této auxotrofie, a tedy jestli byl mutovaný enzym dostatečně aktivní pro zajištění životaschopnosti buněk i na médiu bez methioninu. Enzymy byly dále purifikovány a byla testována jejich aktivita vzhledem k WT enzymu (viz Tabulka 1, sloupce 3 a 6). V obecném trendu se ukázalo, že pokud mutace vedla ke snížení aktivity pod 30 % v porovnání s WT enzymem, nebyl mutant na médiu bez exogenního methioninu životaschopný. Největší pokles v aktivitě byl zaznamenán při mutacích Asp504, který se podílí na vazbě folátu, a Asp614, což je aminokyselina vázající homocystein. U aminokyselin, jejichž mutacemi nebyla aktivita enzymu zásadně ovlivněna, lze předpokládat menší význam pro katalýzu.

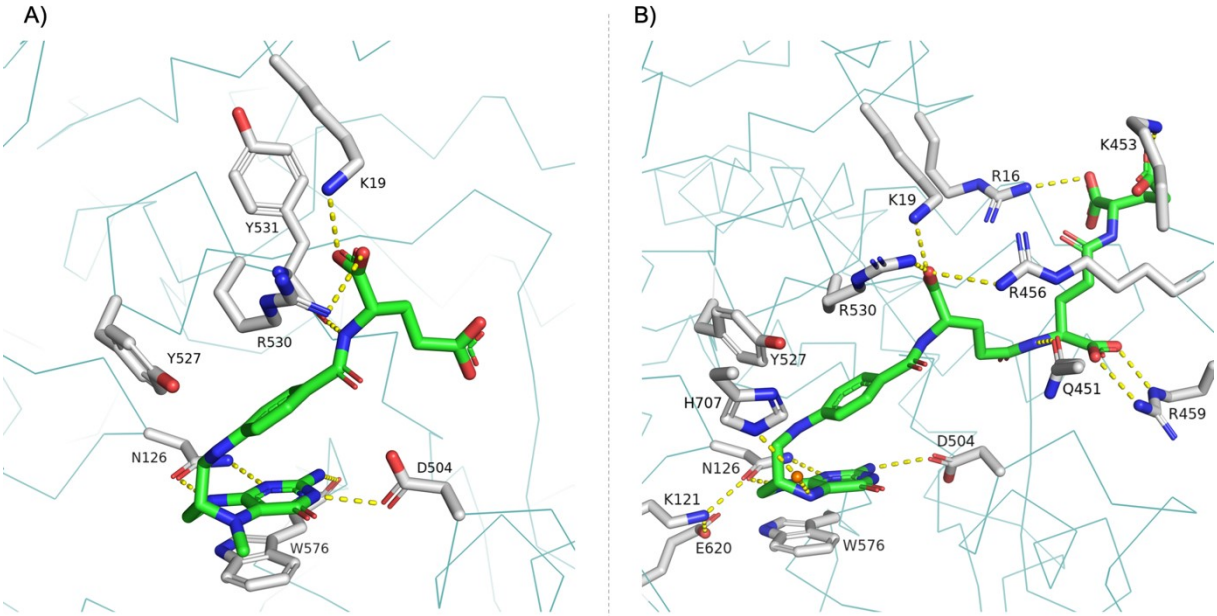
Tabulka 1. Vliv bodových mutací na schopnost růstu na médiu bez přídavku methioninu a aktivitu enzymu v porovnání s WT enzymem.[102]

1	2	3	4	5	6
Mutace	**Růst na Met⁻ médiu**	**Aktivita [%]**	**Mutace**	**Růst na Met⁻ médiu**	**Aktivita [%]**
S448A	Ano	67	D614S	Ne	11
E620Q	Ano	100	D614A	Ne	<2
E620S	Ano	100	D614N	Ne	<2
D504A	Ne	4	W576F	Ano	30
D504N	Ne	11	W576Y	Ne	12
D504S	Ne	7	R530A	Ano	33
H128N	Ne	19	Y527F	Ne	67

V letech 2014 a 2015 byly publikovány krystalové struktury enzymu i se substráty, a to jak v otevřené,[14] tak v uzavřené konformaci.[15] Tyto struktury umožňují přesně definovat interakce mezi enzymem a ligandem, což je důležité především pro racionální design inhibitorů. V nadcházejícím textu je uvažováno pouze folát-vazebné místo, nicméně z výsledků v Tabulce 1 je zřejmé, že také mutageneze aminokyselin vázajících Hcy, konkrétně Asp614, měla zásadní vliv na aktivitu enzymu.[102] I na toto vazebné místo lze tedy ve vývoji inhibitorů cílit.

Obrázek 13A zobrazuje interakce mezi enzymem a 5-methyl-THF-Glu_3 v rámci ternárního komplexu, kde je pozorována elektronová hustota pouze pro první glutamátový zbytek.[14] Pterinový kruh folátu interaguje vodíkovými vazbami s Asn126, Asp504 a také patrovými interakcemi s Trp576. Právě vodíkové můstky s Asn126 a Asp504 jsou považovány za zásadní pro zajištění katalýzy: mutace N126A snížila aktivitu enzymu na 13 %[14] a mutace Asp504 na 4–11 %[102] (Tabulka 1). Dále vznikají hydrofobní interakce mezi PABA linkerem folátu a postranním řetězcem Tyr527. α-Karboxylová skupina prvního glutamátu interaguje s postranními řetězci Lys19 a Arg530 a jeho α-amino skupina tvoří vodíkový můstek s karbonylem hlavního řetězce Tyr531.

Po vazbě substrátů přechází enzym do uzavřené konformace, která je nezbytná pro průběh katalyzované reakce. Oproti otevřené konformaci je u této struktury pozorována elektronová hustota pro všechny tři glutamáty folátu a vznikají nové interakce mezi enzymem a substrátem.[15] Na Obrázku 13B jsou pro přehlednost zobrazeny především tyto nově vytvořené interakce. Klíčové jsou pravděpodobně iontové vazby vznikající mezi α-karboxylovou skupinou prvního a druhého glutamátu a postranními řetězci konzervovaných Arg456 a Arg459. Další důležitou interakcí je vazba mezi konzervovaným Gln451 a α-amino skupinou druhého glutamátu. Mutace těchto aminokyselin snižují aktivitu enzymu na méně než 5 % v případě mutace Gln451 a Arg459, respektive na 38 % v případě Arg456. Třetí glutamát interaguje svým γ-karboxylem s Lys453 a α-karboxylem s Arg16. Při mutaci K121A byla aktivita enzymu v porovnání s WT menší než 5 %, což ukazuje na důležitost této interakce. V uzavřené konformaci dále dochází k protonotaci N^5 THF z His707 přes molekulu vody. Tato protonace pravděpodobně umožňuje odstoupení methylové skupiny během katalyzované reakce a její význam demonstruje to, že mutace H707A také snížila aktivitu enzymu na méně než 5 %.



Obrázek 13. Detail folát-vazebného místa enzymu CaMet6p; 5-methyl-THF-Glu$_3$ se zelenými vazbami, vybrané aminokyseliny enzymu účastnící se interakcí s bílými, interakce (vodíkové a iontové vazby) mezi enzymem a substrátem žlutě; obrázek byl vytvořen pomocí programu PyMol; A) enzym v otevřené konformaci, elektronová hustota zaznamenána pouze pro první glutamát 5-methyl-THF-Glu$_3$ (PDB ID: 4L65); B) enzym v uzavřené konformaci, elektronová hustota zaznamenána pro všechny tři glutamáty 5-methyl-THF-Glu$_3$ (PDB ID: 4QQU).

Scott *et al.*[97] dále zkoumali „druggabilitu“ enzymu s ohledem na podobnost s hMS (PDB ID: 4CCZ) a přítomnost ligand-vazebných míst. Autoři využili enzym z *A. fumigatus* (AfMet6p), který ale nemá známou krystalovou strukturu, a proto zvolili jako modelový systém orthologní protein z *C. albicans* (CaMet6p, PDB ID: 4L65), se kterým sdílí vysokou míru homologie a jehož krystalová struktura je známa. Fungální enzymy a hMS jsou velmi odlišné co se týče celkové struktury, konformace substrátů po vazbě na enzym i lokalizace aktivních míst. Ca/AfMet6p váží 5-methyl-THF-Glu$_3$ v ohnuté konformaci o délce asi 20 Å, naproti tomu ve struktuře hMS je THF-Glu natažený a má délku asi 30 Å. S využitím structure-based virtuálního screeningu byly u obou enzymů nalezeny klastry pro vazbu ligandů: u fungálních enzymů čtyři a u hMS dva. Dva z klastrů u Ca/AfMet6 jsou umístěny velmi blízko sebe a odpovídají aktivním místům, která váží folát a homocystein. Blízkost těchto dvou aktivních míst nabízí možnost designu inhibitorů, které by se vázaly do obou míst současně. Takové inhibitory by mohly být selektivní pouze pro fungální enzym, protože u hMS jsou ligand-vazebné klastry umístěné v mnohem větší vzdálenosti.

Jednou z mála látek, které byly dosud testovány jako potenciální inhibitory Met6p enzymu, je methotrexát. Ukázalo se však, že není příliš vhodným inhibitorem Met6p ani antifungálním léčivem obecně, protože vykazoval nízkou míru inhibice (IC_{50} je 4 ± 1,4 mM), a zároveň je známá jeho toxicita vůči lidským buňkám (IC_{50} pro DHFR je 0,3 μM).[97] Vysoká hodnota IC_{50} pro Met6p je v souladu s heterogenitou vazby MTX-Glu$_3$, kterou na základě připravené krystalové struktury (PDB ID: 4L6H) popisuje Ubhi e*t al.*[14] Z této struktury je zřejmé, že MTX-Glu$_3$ zaujímá při vazbě dvě různé

konformace a navíc dochází k porušení některých interakcí s aminokyselinami enzymu, především s Asn126 a Asp504. Vysoká hodnota IC_{50} spojená s porušením vodíkových vazeb mezi pterinovým kruhem a Asn126 a Asp504 je v souladu s předchozími výsledky, které ukazovali na nezbytnost těchto dvou aminokyselin pro aktivitu enzymu. V budoucím designu inhibitorů enzymu Met6p by tedy mohlo zachování těchto interakcí napomoci k zajištění lepší vazby do aktivního místa.

5 Závěr

V první části této práce jsem se věnovala shrnutí dosavadních poznatků ohledně struktury a katalytického mechanismu dvou hlavních rodin methionin syntáz. Také jsem se zabývala rolí tohoto enzymu v lidském metabolismu, ve kterém zajišťuje propojení mezi cyklem methioninu a cyklem folátu. Tyto dvě metabolické dráhy mají význam především pro produkci prekurzorů purinových a pyrimidinových nukleotidů a také *S*-adenosylmethioninu. Důležitost tohoto enzymu v metabolismu demonstrují poměrně závažné patologie vznikající při porušení jeho funkce, tedy neurologické a hematologické poruchy typické jak pro cblG defekt, tak pro deficienci vitamínu B_{12}. Neurologická onemocnění vznikají z důvodu akumulace homocysteinu a snížení methylace myelinu, hematologické problémy pramení primárně z poruchy buněčného dělení, především v buňkách kostní dřeně. Je nicméně vhodné také poznamenat, že život ohrožující deficience vitamínu B_{12}, a především cblG defekt jsou velmi vzácné patologie.

Dále jsem se soustředila na možnost využití methionin syntázy v terapii rakovinných onemocnění. Enzymy folátového cyklu jsou jako cíl chemoterapeutik úspěšně využívány již od poloviny minulého století, kdy začaly být analogy folátu používány pro léčbu leukémie. Potenciál methionin syntázy jako nového cíle chemoterapie je v literatuře popisován již delší dobu, nedávné studie navíc ukázaly na nezbytnost tohoto enzymu pro proliferaci rakovinných buněk při fyziologických hladinách folátů. Stejně jako u jiných léčiv je ale možným problémem při inhibici MS negativní efekt na zdravé buňky. To by mohl být překonáno například v případě vyšší exprese MTR v rakovinných buňkách, kompenzací vedlejších efektů pomocí leukovorinu nebo přípravou takových inhibitorů, které budou cílit na homocystein vazebné místo. Pro budoucí racionální design inhibitorů by byla přínosná znalost celkové struktury lidského enzymu a identifikace aminokyselin, které se podílí na vazbě substrátů.

V neposlední řadě byly popsány současné možnosti terapie fungálních infekcí a nastíněna její omezení, která podněcují snahu o nalezení nových terapeutických cílů. Experimenty *in vitro* a *in vivo* provedené s několika druhy patogenních hub ukázaly, že Met6p je esenciální pro jejich přežití a virulenci. Potenciální inhibitory Met6p mohou být designovány jako analogy folátu, homocysteinu, nebo tak, aby se vázaly do obou aktivních míst současně. Vzhledem k výrazným strukturním rozdílům mezi lidským a fungálním enzymem lze u třetího uvedeného typu inhibitorů očekávat vysokou specifitu pro fungální enzym. Především díky publikacím, ve kterých jsou popsány důsledky site-directed mutageneze a vyřešeným krystalovým strukturám enzymu se substráty a inhibitory jsme navíc schopni definovat klíčové interakce mezi enzymem a substrátem, které by měly být při přípravě inhibitorů brány v potaz.

6 Seznam literatury

Reviews jsou označena hvězdičkou (*)

(1) Ferla, M. P.; Patrick, W. M. Bacterial Methionine Biosynthesis. *Microbiology* **2014**, *160* (8), 1571–1584. *

(2) Kuplińska, A.; Rząd, K. Molecular Targets for Antifungals in Amino Acid and Protein Biosynthetic Pathways. *Amino Acids* **2021**, *53* (7), 961–991. *

(3) Pejchal, R.; Ludwig, M. L. Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE): A Face-to-Face Double Barrel That Evolved by Gene Duplication. *PloS Biol* **2005**, *3* (2), e31.

(4) González, J. C.; Banerjee, R. V.; Huang, S.; Sumner, J. S.; Matthews, R. G. Comparison of Cobalamin-Independent and Cobalamin-Dependent Methionine Synthases from *Escherichia Coli*: Two Solutions to the Same Chemical Problem. *Biochemistry* **1992**, *31* (26), 6045–6056.

(5) Ludwig, M. L.; Matthews, R. G. Structure-Based Perspectives on B_{12}-Dependent Enzymes. *Annu Rev Biochem* **1997**, *66* (1), 269–313.

(6) González, J. C.; Peariso, K.; Penner-Hahn, J. E.; Matthews, R. G. Cobalamin-Independent Methionine Synthase from *Escherichia Coli*: A Zinc Metalloenzyme. *Biochemistry* **1996**, *35* (38), 12228–12234.

(7) Matthews, R. G.; Goulding, C. W. Enzyme-Catalyzed Methyl Transfers to Thiols: The Role of Zinc. *Curr Opin Chem Biol* **1997**, *1* (3), 332–339.

(8) Foster, M.; Tejerina, G.; Guest, J.; Woods, D. Two Enzymic Mechanisms for the Methylation of Homocysteine by Extracts of *Escherichia Coli*. *Biochem J* **1964**, *92* (3), 476–488.

(9) Matthews, R. G.; Smith, A. E.; Zhou, Z. S.; Taurog, R. E.; Bandarian, V.; Evans, J. C.; Ludwig, M. Cobalamin-Dependent and Cobalamin-Independent Methionine Synthases: Are There Two Solutions to the Same Chemical Problem? *Helv Chim Acta* **2003**, *86* (12), 3939–3954.

(10) Goulding, C. W.; Matthews, R. G. Cobalamin-Dependent Methionine Synthase from *Escherichia Coli*: Involvement of Zinc in Homocysteine Activation. *Biochemistry* **1997**, *36* (50), 15749–15757.

(11) Ferrer, J.-L.; Ravanel, S.; Robert, M.; Dumas, R. Crystal Structures of Cobalamin-Independent Methionine Synthase Complexed with Zinc, Homocysteine, and Methyltetrahydrofolate. *J Biol Chem* **2004**, *279* (43), 44235–44238.

(12) Fu, T.-M.; Almqvist, J.; Liang, Y.-H.; Li, L.; Huang, Y.; Su, X.-D. Crystal Structures of Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE) from *Streptococcus Mutans*: A Dynamic Zinc-Inversion Model. *J Mol Biol* **2011**, *412* (4), 688–697.

(13) Ubhi, D.; Kavanagh, K. L.; Monzingo, A. F.; Robertus, J. D. Structure of *Candida Albicans* Methionine Synthase Determined by Employing Surface Residue Mutagenesis. *Arch Biochem Biophys* **2011**, *513* (1), 19–26.

(14) Ubhi, D.; Kago, G.; Monzingo, A. F.; Robertus, J. D. Structural Analysis of a Fungal Methionine Synthase with Substrates and Inhibitors. *J Mol Biol* **2014**, *426* (8), 1839–1847.

(15) Ubhi, D. K.; Robertus, J. D. The Cobalamin-Independent Methionine Synthase Enzyme Captured in a Substrate-Induced Closed Conformation. *J Mol Biol* **2015**, *427* (4), 901–909.

(16) Wheatley, R. W.; Ng, K. K. S.; Kapoor, M. Fungal Cobalamin-Independent Methionine Synthase: Insights from the Model Organism, *Neurospora Crassa*. *Arch Biochem Biophys* **2016**, *590*, 125–137.

(17) Koutmos, M.; Pejchal, R.; Bomer, T. M.; Matthews, R. G.; Smith, J. L.; Ludwig, M. L. Metal Active Site Elasticity Linked to Activation of Homocysteine in Methionine Synthases. *Proc National Acad Sci* **2008**, *105* (9), 3286–3291.

(18) Taurog, R. E.; Jakubowski, H.; Matthews, R. G. Synergistic, Random Sequential Binding of Substrates in Cobalamin-Independent Methionine Synthase. *Biochemistry* **2006**, *45* (16), 5083–5091.

(19) Taurog, R. E.; Matthews, R. G. Activation of Methyltetrahydrofolate by Cobalamin-Independent Methionine Synthase. *Biochemistry* **2006**, *45* (16), 5092–5102.

(20) Goulding, C. W.; Postigo, D.; Matthews, R. G. Cobalamin-Dependent Methionine Synthase Is a Modular Protein with Distinct Regions for Binding Homocysteine, Methyltetrahydrofolate, Cobalamin, and Adenosylmethionine. *Biochemistry* **1997**, *36* (26), 8082–8091.

(21) Banerjee, R. V.; Matthews, R. G. Cobalamin-Dependent Methionine Synthase. *Faseb J* **1990**, *4* (5), 1450–1459.

(22) Koutmos, M.; Datta, S.; Pattridge, K. A.; Smith, J. L.; Matthews, R. G. Insights into the Reactivation of Cobalamin-Dependent Methionine Synthase. *Proc National Acad Sci* **2009**, *106* (44), 18527–18532.

(23) Hodgkin, D. C.; Kamper, J.; Mackay, M.; Pickworth, J.; Trueblood, K. N.; White, J. G. Structure of Vitamin B_{12}. *Nature* **1956**, *178*, 64–66.

(24) Deme, J. C.; Hancock, M. A.; Xia, X.; Shintre, C. A.; Plesa, M.; Kim, J. C.; Carpenter, E. P.; Rosenblatt, D. S.; Coulton, J. W. Purification and Interaction Analyses of Two Human Lysosomal Vitamin B_{12} Transporters: LMBD1 and ABCD4. *Mol Membr Biol* **2014**, *31* (7–8), 250–261.

(25) Randaccio, L.; Geremia, S.; Demitri, N.; Wuerges, J. Vitamin B_{12}: Unique Metalorganic Compounds and the Most Complex Vitamins. *Molecules* **2010**, *15* (5), 3228–3259.

(26) Evans, J. C.; Huddler, D. P.; Hilgers, M. T.; Romanchuk, G.; Matthews, R. G.; Ludwig, M. L. Structures of the N-Terminal Modules Imply Large Domain Motions during Catalysis by Methionine Synthase. *Proc National Acad Sci* **2004**, *101* (11), 3729–3736.

(27) Fick, R. J.; Clay, M. C.; Lee, L. V.; Scheiner, S.; Al-Hashimi, H.; Trievel, R. C. Water-Mediated Carbon–Oxygen Hydrogen Bonding Facilitates *S*-Adenosylmethionine Recognition in the Reactivation Domain of Cobalamin-Dependent Methionine Synthase. *Biochemistry* **2018**, *57* (26), 3733–3740.

(28) Datta, S.; Koutmos, M.; Pattridge, K. A.; Ludwig, M. L.; Matthews, R. G. A Disulfide-Stabilized Conformer of Methionine Synthase Reveals an Unexpected Role for the Histidine Ligand of the Cobalamin Cofactor. *Proc National Acad Sci* **2008**, *105* (11), 4115–4120.

(29) Bandarian, V.; Pattridge, K. A.; Lennon, B. W.; Huddler, D. P.; Matthews, R. G.; Ludwig, M. L. Domain Alternation Switches B_{12}-Dependent Methionine Synthase to the Activation Conformation. *Nat Struct Mol Biol* **2002**, *9* (1), 53–56.

(30) Dixon, M. M.; Huang, S.; Matthews, R. G.; Ludwig, M. The Structure of the C-Terminal Domain of Methionine Synthase: Presenting *S*-Adenosylmethionine for Reductive Methylation of B_{12}. *Structure* **1996**, *4* (11), 1263–1275.

(31) Drennan, C. L.; Huang, S.; Drummond, J. T.; Matthews, R. G.; Ludwig, M. L. How a Protein Binds B_{12}: A 3.0 Å X-Ray Structure of B_{12}-Binding Domains of Methionine Synthase. *Science* **1994**, *266* (5191), 1669–1674.

(32) Yamada, K.; Koutmos, M. The Folate-Binding Module of *Thermus Thermophilus* Cobalamin-Dependent Methionine Synthase Displays a Distinct Variation of the Classical TIM Barrel: A TIM Barrel with a 'twist'. *Acta Cryst* **2018**, *74* (1), 41–51.

(33) Wolthers, K. R.; Toogood, H. S.; Jowitt, T. A.; Marshall, K. R.; Leys, D.; Scrutton, N. S. Crystal Structure and Solution Characterization of the Activation Domain of Human Methionine Synthase. *Febs J* **2007**, *274* (3), 738–750.

(34) Bandarian, V.; Ludwig, M. L.; Matthews, R. G. Factors Modulating Conformational Equilibria in Large Modular Proteins: A Case Study with Cobalamin-Dependent Methionine Synthase. *Proc National Acad Sci* **2003**, *100* (14), 8156–8163.

(35) Banerjee, R. V.; Frasca, V.; Ballou, D. P.; Matthews, R. G. Participation of Cob(I)alamin in the Reaction Catalyzed by Methionine Synthase from *Escherichia Coli*: A Steady-State and Rapid Reaction Kinetic Analysis. *Biochemistry* **1990**, *29* (50), 11101–11109.

(36) Hall, D. A.; Kooi, C. W. V.; Stasik, C. N.; Stevens, S. Y.; Zuiderweg, E. R. P.; Matthews, R. G. Mapping the Interactions between Flavodoxin and Its Physiological Partners Flavodoxin Reductase and Cobalamin-Dependent Methionine Synthase. *Proc National Acad Sci* **2001**, *98* (17), 9521–9526.

(37) Fujii, K.; Galivan, J. H.; Huennekens, F. M. Activation of Methionine Synthase: Further Characterization of the Flavoprotein System. *Arch Biochem Biophys* **1977**, *178* (2), 662–670.

(38) Yamada, K.; Gravel, R. A.; Toraya, T.; Matthews, R. G. Human Methionine Synthase Reductase Is a Molecular Chaperone for Human Methionine Synthase. *Proc National Acad Sci* **2006**, *103* (25), 9476–9481.

(39) Fleischhacker, A. S.; Matthews, R. G. Ligand *Trans* Influence Governs Conformation in Cobalamin-Dependent Methionine Synthase. *Biochemistry* **2007**, *46* (43), 12382–12392.

(40) Jarrett, J. T.; Huang, S.; Matthews, R. G. Methionine Synthase Exists in Two Distinct Conformations That Differ in Reactivity toward Methyltetrahydrofolate, Adenosylmethionine, and Flavodoxin. *Biochemistry* **1998**, *37* (16), 5372–5382.

(41) Drummond, J. T.; Huang, S.; Blumenthal, R. M.; Matthews, R. G. Assignment of Enzymic Function to Specific Protein Regions of Cobalamin-Dependent Methionine Synthase from *Escherichia Coli*. *Biochemistry* **1993**, *32* (36), 9290–9295.

(42) Leclerc, D.; Wilson, A.; Dumas, R.; Gafuik, C.; Song, D.; Watkins, D.; Heng, H. H. Q.; Rommens, J. M.; Scherer, S. W.; Rosenblatt, D. S.; Gravel, R. A. Cloning and Mapping of a cDNA for Methionine Synthase Reductase, a Flavoprotein Defective in Patients with Homocystinuria. *Proc National Acad Sci* **1998**, *95* (6), 3059–3064.

(43) Chen, L. H.; Liu, M.-L.; Hwang, H.-Y.; Chen, L.-S.; Korenberg, J.; Shane, B. Human Methionine Synthase cDNA Cloning, Gene Localization, and Expression. *J Biol Chem* **1997**, *272* (6), 3628–3634.

(44) Wolthers, K. R.; Scrutton, N. S. Cobalamin Uptake and Reactivation Occurs through Specific Protein Interactions in the Methionine Synthase–Methionine Synthase Reductase Complex. *Febs J* **2009**, *276* (7), 1942–1951.

(45) Guéant, J.-L.; Guéant-Rodriguez, R.-M.; Kosgei, V. J.; Coelho, D. Causes and Consequences of Impaired Methionine Synthase Activity in Acquired and Inherited Disorders of Vitamin B_{12} Metabolism. *Crit Rev Biochem Mol* **2022**, *57* (2), 133–155.

(46) Froese, D. S.; Fowler, B.; Baumgartner, M. R. Vitamin B_{12}, Folate, and the Methionine Remethylation Cycle – Biochemistry, Pathways, and Regulation. *J Inherit Metab Dis* **2019**, *42* (4), 673–685.

(47) Ducker, G. S.; Rabinowitz, J. D. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab* **2017**, *25* (1), 27–42.

(48) Olteanu, H.; Munson, T.; Banerjee, R. Differences in the Efficiency of Reductive Activation of Methionine Synthase and Exogenous Electron Acceptors between the Common Polymorphic Variants of Human Methionine Synthase Reductase. *Biochemistry* **2002**, *41* (45), 13378–13385.

(49) Olteanu, H.; Banerjee, R. Human Methionine Synthase Reductase, a Soluble P-450 Reductase-like Dual Flavoprotein, Is Sufficient for NADPH-Dependent Methionine Synthase Activation. *J Biol Chem* **2001**, *276* (38), 35558–35563.

(50) Martens, J.-H.; Barg, H.; Warren, M.; Jahn, D. Microbial Production of Vitamin B_{12}. *Appl Microbiol Biotechnol* **2002**, *58* (3), 275–285.

(51) Mathews, F. S.; Gordon, M. M.; Chen, Z.; Rajashankar, K. R.; Ealick, S. E.; Alpers, D. H.; Sukumar, N. Crystal Structure of Human Intrinsic Factor: Cobalamin Complex at 2.6-Å Resolution. *Proc National Acad Sci* **2007**, *104* (44), 17311–17316.

(52) Mørkbak, A. L.; Hvas, A.-M.; Lloyd-Wright, Z.; Sanders, T. A.; Bleie, Ø.; Refsum, H.; Nygaard, O. K.; Nexø, E. Effect of Vitamin B_{12} Treatment on Haptocorrin. *Clin Chem* **2006**, *52* (6), 1104–1111.

(53) Kim, J.; Gherasim, C.; Banerjee, R. Decyanation of Vitamin B_{12} by a Trafficking Chaperone. *Proc National Acad Sci* **2008**, *105* (38), 14551–14554.

(54) Bassila, C.; Ghemrawi, R.; Flayac, J.; Froese, D. S.; Baumgartner, M. R.; Guéant, J.-L.; Coelho, D. Methionine Synthase and Methionine Synthase Reductase Interact with MMACHC and with MMADHC. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2017**, *1863* (1), 103–112.

(55) Ebara, S. Nutritional Role of Folate. *Congenit Anom* **2017**, *57* (5), 138–141.

(56) Mentch, S. J.; Locasale, J. W. One-carbon Metabolism and Epigenetics: Understanding the Specificity. *Ann Ny Acad Sci* **2016**, *1363* (1), 91–98.

(57) Finkelstein, J. D. Methionine Metabolism in Mammals. *J Nutritional Biochem* **1990**, *1* (5), 228–237.

(58) Herbert, V.; Zalusky, R. Interrelations of Vitamin B_{12} and Folic Acid Metabolism: Folic Acid Clearance Studies. *J Clin Invest* **1962**, *41* (6), 1263–1276.

(59) Smulders, Y. M.; Smith, D. E. C.; Kok, R. M.; Teerlink, T.; Swinkels, D. W.; Stehouwer, C. D. A.; Jakobs, C. Cellular Folate Vitamer Distribution during and after Correction of Vitamin B_{12} Deficiency: A Case for the Methylfolate Trap. *Brit J Haematol* **2006**, *132* (5), 623–629.

(60) Scott, J. M. Folate and Vitamin B_{12}. *Proc Nutr Soc* **1999**, *58* (2), 441–448.

(61) Scott, J. M.; Weir, D. G. The Methyl Folate Trap. *Lancet* **1981**, *318* (8242), 337–340.

(62) Rashka, C.; Hergalant, S.; Dreumont, N.; Oussalah, A.; Camadro, J.-M.; Marchand, V.; Hassan, Z.; Baumgartner, M. R.; Rosenblatt, D. S.; Feillet, F.; Guéant, J.-L.; Flayac, J.; Coelho, D. Analysis of Fibroblasts from Patients with *CblC* and *CblG* Genetic Defects of Cobalamin Metabolism Reveals Global Dysregulation of Alternative Splicing. *Hum Mol Genet* **2020**, *29* (12), 1969–1985.

(63) Watkin, D.; Rosenblatt, D. S. Functional Methionine Synthase Deficiency (CblE and CblG): Clinical and Biochemical Heterogeneity. *Am J Med Genet* **1989**, *34* (3), 427–434.

(64) Schiff, M.; Benoist, J.; Tilea, B.; Royer, N.; Giraudier, S.; Baulny, H. O. de. Isolated Remethylation Disorders: Do Our Treatments Benefit Patients? *J Inherit Metab Dis* **2011**, *34* (1), 137–145.

(65) Watkins, D.; Rosenblatt, D. S. Inborn Errors of Cobalamin Absorption and Metabolism. *Am J Medical Genetics Part C Seminars Medical Genetics* **2011**, *157* (1), 33–44.

(66) Wolthers, K. R.; Scrutton, N. S. Electron Transfer in Human Methionine Synthase Reductase Studied by Stopped-Flow Spectrophotometry. *Biochemistry* **2004**, *43* (2), 490–500.

(67) Huemer, M.; Bürer, C.; Ješina, P.; Kožich, V.; Landolt, M. A.; Suormala, T.; Fowler, B.; Savvopoulou, P. A.; Blair, E.; Brennerova, K.; Broomfield, A.; Meirleir, L. D.; Gökcay, G.; Hennermann, J.; Jardine, P.; Koch, J.; Lorenzl, S.; Lotz-Havla, A. S.; Noss, J.; Parini, R.; Peters, H.; Plecko, B.; Ramos, F. J.; Schlune, A.; Tsiakas, K.; Tansek, M. Z.; Baumgartner, M. R. Clinical Onset and Course, Response to Treatment and Outcome in 24 Patients with the CblE or CblG Remethylation Defect Complemented by Genetic and *in Vitro* Enzyme Study Data. *J Inherit Metab Dis* **2015**, *38* (5), 957–967.

(68) Huemer, M.; Diodato, D.; Martinelli, D.; Olivieri, G.; Blom, H.; Gleich, F.; Kölker, S.; Kožich, V.; Morris, A. A.; Seifert, B.; Froese, D. S.; Baumgartner, M. R.; Dionisi-Vici, C.; EHOD consortium; Martin, C. A.; Baethmann, M.; Ballhausen, D.; Blasco-Alonso, J.; Boy, N.; Bueno, M.; Peláez, R. B.; Cerone, R.; Chabrol, B.; Chapman, K. A.; Couce, M. L.; Crushell, E.; Serra, J. D.; Diogo, L.; Ficicioglu, C.; Jimenez, M. C. G.; Silva, M. T. G.; Gaspar, A. M.; Gautschi, M.; González-Lamuño, D.; Gouveia, S.; Grünewald, S.; Hendriksz, C.; Janssen, M. C. H.; Jesina, P.; Koch, J.; Konstantopoulou, V.; Lavigne, C.; Lund, A. M.; Martins, E. G.; Olivas, S. M.; Mention, K.; Mochel, F.; Mundy, H.; Murphy, E.; Paquay, S.; Pedrón-Giner, C.; Gómez, M. A. R.; Santra, S.; Schiff, M.; Schwartz, I. V.; Scholl-Bürgi, S.; Servais, A.; Skouma, A.; Tran, C.; Piñera, I. V.; Walter, J.; Weisfeld-Adams, J. Phenotype, Treatment Practice and Outcome in the Cobalamin-Dependent Remethylation Disorders and MTHFR Deficiency: Data from the E-HOD Registry. *J Inherit Metab Dis* **2019**, *42* (2), 333–352.

(69) Kripps, K. A.; Sremba, L.; Larson, A. A.; Hove, J. L. K. V.; Nguyen, H.; Wright, E. L.; Mirsky, D. M.; Watkins, D.; Rosenblatt, D. S.; Ketteridge, D.; Berry, S. A.; McCandless, S. E.; Baker, P. R. Methionine Synthase Deficiency: Variable Clinical Presentation and Benefit of Early Diagnosis and Treatment. *J Inherit Metab Dis* **2022**, *45* (2), 157–168.

(70) Farber, S.; Diamond, L. K.; Mercer, R. D.; Sylvester, R. F.; Wolff, J. A. Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *N Engl J Med* **1948**, *238* (23), 787–793.

(71) Walling, J. From Methotrexate to Pemetrexed and beyond. A Review of the Pharmacodynamic and Clinical Properties of Antifolates. *Invest New Drugs* **2006**, *24* (1), 37–77.

(72) Zarou, M. M.; Vazquez, A.; Helgason, G. V. Folate Metabolism: A Re-Emerging Therapeutic Target in Haematological Cancers. *Leukemia* **2021**, *35* (6), 1539–1551.

(73) Gonen, N.; Assaraf, Y. G. Antifolates in Cancer Therapy: Structure, Activity and Mechanisms of Drug Resistance. *Drug Resist Update* **2012**, *15* (4), 183–210.

(74) Yang, C.; Zhang, J.; Liao, M.; Yang, Y.; Wang, Y.; Yuan, Y.; Ouyang, L. Folate-Mediated One-Carbon Metabolism: A Targeting Strategy in Cancer Therapy. *Drug Discov Today* **2020**, *26* (3), 817–825.

(75) Nilsson, R.; Jain, M.; Madhusudhan, N.; Sheppard, N. G.; Strittmatter, L.; Kampf, C.; Huang, J.; Asplund, A.; Mootha, V. K. Metabolic Enzyme Expression Highlights a Key Role for MTHFD2 and the Mitochondrial Folate Pathway in Cancer. *Nat Commun* **2014**, *5* (1), 3128.

(76) Ghergurovich, J. M.; Xu, X.; Wang, J. Z.; Yang, L.; Ryseck, R.-P.; Wang, L.; Rabinowitz, J. D. Methionine Synthase Supports Tumour Tetrahydrofolate Pools. *Nat Metabolism* **2021**, *3* (11), 1512–1520.

(77) Sullivan, M. R.; Darnell, A. M.; Reilly, M. F.; Kunchok, T.; Joesch-Cohen, L.; Rosenberg, D.; Ali, A.; Rees, M. G.; Roth, J. A.; Lewis, C. A.; Heiden, M. G. V. Methionine Synthase Is Essential for Cancer Cell Proliferation in Physiological Folate Environments. *Nat Metabolism* **2021**, *3* (11), 1500–1511.

(78) Lumb, M.; Sharer, N.; Deacon, R.; Jennings, P.; Purkiss, P.; Perry, J.; Chanarin, I. Effects of Nitrous Oxide-Induced Inactivation of Cobalamin on Methionine and *S*-Adenosylmethionine Metabilism in the Rat. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1983**, *756* (3), 354–359.

(79) Matthews, R. G.; Drummond, J. T.; Webb, H. K. Cobalamin-Dependent Methionine Synthase and Serine Hydroxymethyltransferase: Targets for Chemotherapeutic Intervention? *Adv Enzyme Regul* **1998**, *38* (1), 377–392.

(80) Zhang, Z.; Tian, C.; Zhou, S.; Wang, W.; Guo, Y.; Xia, J.; Liu, Z.; Wang, B.; Wang, X.; Golding, B. T.; Griff, R. J.; Du, Y.; Liu, J. Mechanism-Based Design, Synthesis and Biological Studies of N^5-Substituted Tetrahydrofolate Analogs as Inhibitors of Cobalamin-Dependent Methionine Synthase and Potential Anticancer Agents. *Eur J Med Chem* **2012**, *58*, 228–236.

(81) Banks, E. C.; Doughty, S. W.; Toms, S. M.; Wheelhouse, R. T.; Nicolaou, A. Inhibition of Cobalamin-Dependent Methionine Synthase by Substituted Benzo-fused Heterocycles. *Febs J* **2007**, *274* (1), 287–299.

(82) Fisher, M. C.; Gurr, S. J.; Cuomo, C. A.; Blehert, D. S.; Jin, H.; Stukenbrock, E. H.; Stajich, J. E.; Kahmann, R.; Boone, C.; Denning, D. W.; Gow, N. A. R.; Klein, B. S.; Kronstad, J. W.; Sheppard, D. C.; Taylor, J. W.; Wright, G. D.; Heitman, J.; Casadevall, A.; Cowen, L. E. Threats Posed by the Fungal Kingdom to Humans, Wildlife, and Agriculture. *MBio* **2020**, *11* (3).

(83) McDermott, A. Drug-Resistant Fungi on the Rise. *Proc National Acad Sci* **2022**, *119* (48).

(84) Brown, G. D.; Denning, D. W.; Gow, N. A. R.; Levitz, S. M.; Netea, M. G.; White, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci Transl Med* **2012**, *4* (165), 165rv13.

(85) *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*. Who.int. https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241 (accessed 2023-04-10).

(86) Perfect, J. R. The Antifungal Pipeline: A Reality Check. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16* (9), 603–616.

(87) Robbins, N.; Wright, G. D.; Cowen, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. *Microbiol Spectr* **2016**, *4* (5).

(88) Howard, K. C.; Dennis, E. K.; Watt, D. S.; Garneau-Tsodikova, S. A Comprehensive Overview of the Medicinal Chemistry of Antifungal Drugs: Perspectives and Promise. *Chem Soc Rev* **2020**, *49* (8), 2426–2480.

(89) Houšť, J.; Spížek, J.; Havlíček, V. Antifungal Drugs. *Metabolites* **2020**, *10* (3), 106.

(90) Fisher, M. C.; Hawkins, N. J.; Sanglard, D.; Gurr, S. J. Worldwide Emergence of Resistance to Antifungal Drugs Challenges Human Health and Food Security. *Science* **2018**, *360* (6390), 739–742.

(91) Lockhart, S. R.; Etienne, K. A.; Vallabhaneni, S.; Farooqi, J.; Chowdhary, A.; Govender, N. P.; Colombo, A. L.; Calvo, B.; Cuomo, C. A.; Desjardins, C. A.; Berkow, E. L.; Castanheira, M.; Magobo, R. E.; Jabeen, K.; Asghar, R. J.; Meis, J. F.; Jackson, B.; Chiller, T.; Litvintseva, A. P. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida Auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis* **2017**, *64* (2), 134–140.

(92) Daele, R. V.; Spriet, I.; Wauters, J.; Maertens, J.; Mercier, T.; Hecke, S. V.; Brüggemann, R. Antifungal Drugs: What Brings the Future? *Med Mycol* **2019**, *57*, S328–S343.

(93) Gintjee, T. J.; Donnelley, M. A.; Thompson, G. R. Aspiring Antifungals: Review of Current Antifungal Pipeline Developments. *J Fungi* **2020**, *6* (1), 28.

(94) Jastrzębowska, K.; Gabriel, I. Inhibitors of Amino Acids Biosynthesis as Antifungal Agents. *Amino Acids* **2015**, *47* (2), 227–249.

(95) Suliman, H. S.; Appling, D. R.; Robertus, J. D. The Gene for Cobalamin-Independent Methionine Synthase Is Essential in *Candida Albicans*: A Potential Antifungal Target. *Arch Biochem Biophys* **2007**, *467* (2), 218–226.

(96) Amich, J.; Dümig, M.; O'Keeffe, G.; Binder, J.; Doyle, S.; Beilhack, A.; Krappmann, S. Exploration of Sulfur Assimilation of *Aspergillus Fumigatus* Reveals Biosynthesis of Sulfur-Containing Amino Acids as a Virulence Determinant. *Infect Immun* **2016**, *84* (4), 917–929.

(97) Scott, J.; Sueiro-Olivares, M.; Thornton, B. P.; Owens, R. A.; Muhamadali, H.; Fortune-Grant, R.; Thomson, D.; Thomas, R.; Hollywood, K.; Doyle, S.; Goodacre, R.; Tabernero, L.; Bignell, E.; Amich, J. Targeting Methionine Synthase in a Fungal Pathogen Causes a Metabolic Imbalance That Impacts Cell Energetics, Growth, and Virulence. *MBio* **2020**, *11* (5).

(98) Pascon, R. C.; Ganous, T. M.; Kingsbury, J. M.; Cox, G. M.; McCusker, J. H. *Cryptococcus Neoformans* Methionine Synthase: Expression Analysis and Requirement for Virulence. *Microbiology* **2004**, *150* (9), 3013–3023.

(99) Dumont, F. J. FK506, An Immunosuppressant Targeting Calcineurin Function. *Curr Med Chem* **2000**, *7* (7), 731–748.

(100) Laupacis, A.; Keown, P. A.; Ulan, R. A.; McKenzie, N.; Stiller, C. R. Cyclosporin A: A Powerful Immunosuppressant. *Can Med Assoc J* **1982**, *126* (9), 1041–1046.

(101) Suliman, H. S.; Sawyer, G. M.; Appling, D. R.; Robertus, J. D. Purification and Properties of Cobalamin-Independent Methionine Synthase from *Candida Albicans* and *Saccharomyces Cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **2005**, *441* (1), 56–63.

(102) Prasannan, P.; Suliman, H. S.; Robertus, J. D. Kinetic Analysis of Site-Directed Mutants of Methionine Synthase from *Candida Albicans*. *Biochem Bioph Res Commun* **2009**, *382* (4), 730–734.