

## ABSTRAKT

Betain homocystein *S*-methyltransferasa (BHMT) a betain homocystein *S*-methyltransferasa 2 (BHMT-2) jsou dva savčí cytozolické metaloenzymy. Oba tyto enzymy se účastní metabolismu homocysteinu (Hcy), konkrétně jeho remethylace, především v jaterních a také ledvinných buňkách. BHMT přenáší methylovou skupinu z betainu na L-Hcy za vzniku L-methioninu a dimethylglycinu (DMG). BHMT-2 přenáší methylovou skupinu z *S*-methylmethioninu (SMM) také na L-Hcy za vzniku dvou molekul L-methioninu. Poruchy v metabolismu Hcy mohou vést k tzv. hyperhomocysteinemii nebo homocystinurii, které mohou mít souvislost s řadou patologických stavů. BHMT je již relativně dobře prozkoumaným enzymem. Je známa její krystalová struktura, reakční mechanismus, připravena byla řada inhibitorů tohoto enzymu, které umožnily také *in vivo* studie, a nedávno se po dlouhé době podařilo vyvinout *Bhmt*<sup>-/-</sup> myší model. Výzkum BHMT-2 je oproti tomu teprve v začátcích a fyziologické funkce BHMT-2 zůstávají stále neznámé. Důvodem je velká nestabilita BHMT-2 a také absence selektivních inhibitorů. BHMT a BHMT-2 jsou velmi podobné enzymy, které mají 73% identitu v primární sekvenci.

Výsledky této dizertační práce poskytují nové informace o vlastnostech a strukturních požadavcích aktivního centra BHMT. Tyto informace byly získány pomocí třiceti nově připravených nízkomolekulárních látek, u kterých byla testována síla jejich inhibice na rekombinantní BHMT. Dále se nám podařilo optimalizovat purifikaci a stabilizovat BHMT-2, a to ko-purifikací s příbuzným enzymem BHMT. Tyto výsledky naznačují specifickou interakci obou enzymů, která byla potvrzena nativní elektroforézou. Vyvinuli jsme dosud jediný silný a zároveň selektivní inhibitor BHMT-2, který může být důležitým nástrojem pro další *in vivo* studie tohoto enzymu. Testováním vlivu inhibice BHMT a simulované hyperhomocysteinemie na buněčnou linii HepG2, <sup>BHMT</sup>HepG2 a lidské hepatocyty pomocí 2-DE, MS a LC-MS/MS jsme objasnili odezvu a schopnost jaterních buněk vypořádat se s narušeným metabolismem Hcy. Důležitým výsledkem této dizertační práce je také objev katalytické aktivace BHMT a zároveň ovlivnění její substrátové specifity způsobené draselnými ionty. Pomocí molekulového modelování, připravených mutantních forem BHMT a krystalografie jsme také popsali vazbu draselných iontů v blízkosti aktivního místa BHMT.

Celkově můžeme konstatovat, že tato práce poskytla řadu nových a cenných poznatků o fyzikálně-chemických a biochemických vlastnostech enzymů BHMT a BHMT-2. Poskytla nové inhibitory obou enzymů a přinesla nové poznatky o funkci BHMT v jaterních buňkách.