

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Mgr. Jana Mládková

Studium fyziologických funkcí betain homocystein
S-methyltransferasy a betain homocystein S-methyltransferasy 2

Study of physiological functions of betaine homocysteine
S-methyltransferase a betaine homocysteine S-methyltransferase 2

Dizertační práce

Školitel: RNDr. Jiří Jiráček, CSc.

Praha, 2013

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

.....

Mgr. Jana Mládková

Prohlášení spoluautorů:

Prohlašuji, že Mgr. Jana Mládková rozhodujícím či důležitým způsobem přispěla ke vzniku všech šesti odborných publikací, které jsou přílohami této dizertační práce. Sama provedla svěřené experimenty a významně se podílela i na jejich plánování, na interpretaci výsledků a na sepsání publikací. Odhad procentuálního podílu uchazečky na každé ze šesti publikací (80-10%) je uvedený v seznamu publikací na straně 9 této práce.

V Praze

.....

RNDr. Jiří Jiráček CSc.

Poděkování:

Úvodem bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Jiráčkovi CSc. za odborné vedení, cenné připomínky, trpělivost a pochopení. Poděkování patří také celému vědeckému týmu RNDr. Jiřího Jiráčka CSc. na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. za vytvoření příjemného pracovního prostředí a podporu.

Děkuji Prof. T. A. Garrowovi z University of Illinois v Urbaně za možnost stáže v jeho laboratoři, za trpělivost, ochotu a předání cenných informací v průběhu celého mého doktorského studia.

Poděkování patří také Mgr. Janě Paterové z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. za molekulárně-dynamické studie, Mgr. Ireně Selicharové, Dr. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. za pomoc s proteomickou částí práce a Ing. Janu Píchovi, Ph.D. a Mgr. Vašku Vaňkovi, Ph.D. za navržení a syntézu nových inhibitorů.

Dále bych ráda vyjádřila své velké poděkování dalším milým kolegům a přátelům z jiných skupin na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. za ochotu pomoci a všestrannou podporu.

V neposlední řadě velmi děkuji svým blízkým, kteří mi byli obrovskou podporou za celou dobu mého studia a bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

Tato práce byla provedena v rámci grantu GA ČR P207/10/1277 a v rámci výzkumného záměru AV ČR (ÚOCHB AV ČR, v.v.i. RVO:61388963).

ABSTRAKT

Betain homocystein S-methyltransferasa (BHMT) a betain homocystein S-methyltransferasa 2 (BHMT-2) jsou 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^{1, 2}. BHMT je již relativně dobře prozkoumaným enzymem. Je známa její krystalová struktura³, reakční mechanismus^{4, 5}, připravena byla řada inhibitorů tohoto enzymu^{6, 7}, které umožnily také *in vivo* studie, a nedávno se po dlouhé době podařilo vyvinout *Bhmt*^{-/-} myší model⁸. 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 sekvenci¹.

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 vůči 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, ^{BHMT}HepG2 a lidské hepatocyty pomocí 2-DE, MS a LC-MS/MS jsme pomohli lépe objasnit 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 draselnými ionty. Pomocí molekulového modelování, připravených mutantních forem BHMT a krystalografie jsme také popsali vazbu a důležitou strukturní roli 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.

ABSTRACT

Betaine homocysteine S-methyltransferase (BHMT) and betaine homocysteine S-methyltransferase 2 (BHMT-2) are mammalian cytosolic metalloenzymes. They both participate in the metabolism of homocysteine (Hcy), specifically Hcy remethylation, mainly in liver and kidney cells. BHMT catalyzes the transfer of a methyl group from betaine to L-Hcy, yielding L-methionine and dimethylglycine (DMG). BHMT-2 catalyzes the transfer of a methyl group from S-methylmethionine (SMM) to L-Hcy as well, yielding two molecules of L-methionine. Disorders in Hcy metabolism could lead to the so called hyperhomocysteinemia and homocystinuria, which can be connected with several pathological conditions^{1, 2}. BHMT is already relatively well characterized enzyme. Its crystal structure³ and reaction mechanism^{4, 5} have been described and a series of BHMT inhibitors have been prepared^{6, 7}. The specific inhibitors enabled further *in vivo* studies and, recently, *Bhmt*^{-/-} mice model has been successfully developed⁸. In contrast, the research of BHMT-2 is still at the beginning and physiological functions of the enzyme are unknown so far. The reason is that BHMT-2 is a highly unstable enzyme and also there is a lack of selective BHMT-2 inhibitors. BHMT and BHMT-2 are very similar enzymes which have 73% amino acid identity¹.

This thesis provides new information about properties and structural requirements of the active site of BHMT. This information was obtained after testing the BHMT inhibition by 30 newly prepared low molecular weight compounds. We further optimized the purification of BHMT-2 and stabilized it by a co-purification with its related enzyme, BHMT. These results indicate specific interaction of these enzymes which was proved by native electrophoresis. We developed the first potent and selective inhibitor for BHMT-2. The compound can be an important tool for further *in vivo* studies on BHMT-2. Studies on an impact of BHMT inhibition and simulated hyperhomocysteinemia, which were tested on HepG2, ^{BHMT}HepG2 cell lines and human hepatocytes using 2-DE, MS and LC-MS/MS, shed light on a response and an ability of liver cells to cope with disturbed Hcy metabolism. An important result of this thesis is also the discovery of a catalytic activation of BHMT together with changes in its substrate specificity caused by potassium ions. Moreover, we described binding and important structural role of potassium ions close to the BHMT active site using theoretical calculations, newly prepared BHMT mutants and protein crystallography.

In conclusion, this work provides innovative and valuable findings about physico-chemical and biochemical properties of BHMT and BHMT-2. It provides new BHMT and BHMT-2 inhibitors and brings new knowledge about BHMT function in liver cells.

OBSAH

ABSTRAKT	1
ABSTRACT	2
OBSAH	3
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
1. ÚVOD	6
2. PŘEHLED PROBLEMATIKY Z LITERATURY	8
2.1 Metabolizmus homocysteinu	8
2.2 Regulace, funkce a poruchy metabolismu homocysteinu	11
2.2.1 Formy homocysteinu	12
2.2.2 Nemoci spojené s poruchami metabolismu homocysteinu	14
2.3 Zn ²⁺ -dependentní thiolové a selenové methyltransferasy	16
2.4 Betain-homocystein S-methyltransferasa	17
2.4.1 Gen betain-homocystein S-methyltransferasy	17
2.4.2 Distribuce betain-homocystein S-methyltransferasy	18
2.4.3 Známé <i>in vivo</i> funkce betain-homocystein S-methyltransferasy	18
2.4.4 Reakční mechanismus betain-homocystein S-methyltransferasy	20
2.4.5 Struktura betain-homocystein S-methyltransferasy	21
2.4.6 Kompetitivní inhibitory betain-homocystein S-methyltransferasy	23
2.5 Betain-homocystein S-methyltransferasa 2	24
2.5.1 Gen betain-homocystein S-methyltransferasy 2	25
2.5.2 Distribuce betain-homocystein S-methyltransferasy 2	26
2.5.3 Známé <i>in vivo</i> funkce betain-homocystein S-methyltransferasy 2	26
2.5.4 Reakční mechanismus betain-homocystein S-methyltransferasy 2	26
2.5.5 Struktura betain-homocystein S-methyltransferasy 2	27
3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	29
4. MATERIÁL A METODY	30
4.1 Exprese a purifikace proteinů	30
4.1.1 Betain homocystein S-methyltransferasa	30
4.1.2 Betain homocystein S-methyltransferasa 2	30
4.1.3 Mutantní formy enzymu betain-homocystein S-methyltransferasy	31

4.2 Metabolomické studie homocysteinového cyklu	31
4.2.1 Extrakce proteinů z buněčných linií.....	31
4.2.2 Extrakce proteinů z primárních kultur	31
4.2.3 Stanovení koncentrace metabolitů homocysteinového cyklu	32
4.3 Stanovení enzymových aktivit.....	32
4.3.1 Stanovení aktivity betain-homocystein S-methyltransferasy	32
4.3.2 Stanovení aktivity betain-homocystein S-methyltransferasy 2.....	32
4.4 Syntéza inhibitorů enzymů betain-homocystein S-methyltransferasy a betain-homocystein S-methyltransferasy 2	33
4.5 Proteomické studie.....	33
4.6 Molekulové modelování	34
4.7 Krystalografie	34
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	35
5.1 Regulace katalytické aktivity a změny substrátové specifity betain-homocystein S-methyltransferasy způsobené draselnými ionty – příloha č. 1	35
5.2. Strukturně-aktivitní studie nových inhibitorů betain-homocystein S-methyltransferasy – příloha č. 2.....	39
5.3 Vývoj nové skupiny inhibitorů betain-homocystein S-methyltransferasy – příloha č. 3	42
5.4 Kvantifikace metabolitů homocysteinového cyklu a role betain-homocystein S-methyltransferasy v buňkách HepG2 – příloha č. 4	44
5.5 Efekt hyperhomocysteinemie a inhibice betain-homocystein S-methyltransferasy na metabolity a proteom hepatocytů – příloha č. 5	46
5.6 Optimalizace purifikace rekombinantní betain-homocystein S-methyltransferasy 2 a její první inhibitory – příloha č. 6	49
6. ZÁVĚR.....	53
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54
SEZNAM PUBLIKACÍ	67
PŘÍLOHY.....	69

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2DE	dvourozměrná elektroforéza
Apo A1	apolipoprotein A1
BHMT	betain-homocystein <i>S</i> -methyltransferasa
BHMT-2	betain-homocystein <i>S</i> -methyltransferasa 2
^{BHMT} HepG2	buněčná linie HepG2 se zaklonovaným genem pro BHMT
CBHcy	<i>S</i> -(4-karboxybutyl)-DL-homocystein
CBS	cystathionin β synthasa
CGL	cystathionin γ lyasa
DMG	dimethylglycin
Fib- γ	fibrinogen gamma
GNMT	glycin <i>N</i> -methyltransferasa
GSH	glutathion (redukovaná forma)
GSSG	glutathion (oxidovaná forma)
Hcy	homocystein
HepG2	buněčná linie sloužící jako model lidských hepatocytů
HMT	homocystein methyltransferasa
MAT	methioninadenosyl transferasa
MS	methionin synthasa
MSR	methionin synthasa reduktasa
MTHFR	methylentetrahydrofolát reduktasa
OAT	ornithin aminotransferasa
PEPCK1	fosfoenolpyruvát karboxykinasa
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAH	<i>S</i> -adenosyl-homocystein
SAHH	<i>S</i> -adenosyl-homocystein hydrolasa
SAM	<i>S</i> -adenosyl-methionin
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SHMT	serin hydroxymethyltransferasa
SMM	<i>S</i> -methylmethionin
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
THF	tetrahydrofolát

1. ÚVOD

Předkládaná dizertační práce je zaměřena na základní studium dvou lidských enzymů: betain-homocystein S-methyltransferasy (BHMT) a betain-homocystein S-methyltransferasy 2 (BHMT-2). BHMT a BHMT-2 jsou dva ze tří enzymů schopných metabolizovat homocystein (Hcy) v buňkách savčích jater a ledvin. Tímto se podílí na metabolismu dalších důležitých látek jako např. glutathionu (GSH), S-adenosylmethioninu (SAM) nebo tetrahydrofolátu (THF). Regulace aktivity BHMT je spojována s řadou onemocnění, obzvláště pak s kardiovaskulárními chorobami či rakovinou. Studium BHMT-2 je teprve na samém počátku a fyziologické funkce tohoto enzymu jsou dosud neznámé.

Výzkum obou enzymů je součástí projektu skupiny RNDr. Jiřího Jiráčka CsC. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. Během řešení projektu byly publikovány články v odborných časopisech, z nichž některé se staly základem této dizertační práce a jsou tedy její součástí. Jejich plné znění je přiloženo jako přílohy č. 1-6. Následující seznam těchto publikací je uveden v pořadí, které odpovídá jejich řazení ve výsledcích (kapitola 5).

1. Mládková, J.; Paterová, J.; Diamond, C. E.; Tryon, K.; Jungwirth, P.; Koutmos, M.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. Structural Role of Potassium Ions in the Catalytic Activity of Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase. Manuskript připravený k odeslání do časopisu *Journal of Biological Chemistry*.

Podíl doktorandky asi 70%.

2. Vaněk, V.; Buděšínský, M.; Kabeleová, P.; Šanda, M.; Kožíšek, M.; Hančlová, I.; Mládková, J.; Brynda, J.; Rosenberg, I.; Koutmos, M.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. Structure-Activity Study of New Inhibitors of Human Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 3652-3665.

Podíl doktorandky asi 10%.

3. Pícha, J.; Vaněk, V.; Buděšínský, M.; Mládková, J.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. The Development of a New Class of Inhibitors for Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 65, 256-275.

Podíl doktorandky asi 30%.

4. Kořínek, M.; Šístek, V.; Mládková, J.; Mikeš, P.; Jiráček, J.; Selicharová, I. Quantification of Homocysteine-related Metabolites and the Role of Betaine-homocysteine S-methyltransferase in HepG2 Cells. *Biomedical Chromatography* **2013**, 27, 111-121.

Podíl doktorandky asi 30%.

5. Selicharová, I.; Kořínek, Demianova, Z.; Chrudinová, M.; Mládková, J.; Jiráček, J. Effect of Hyperhomocysteinemia and Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase Inhibition on Hepatocyte Metabolites and the Proteome. *BBA- Proteins and Proteomics* **2013**, 1834, 1596-1606.

Podíl doktorandky asi 10%.

6. Mládková, J.; Vaněk, V.; Buděšínský, M. G.; Elbert, T.; Demianová, Z.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. Double-Headed Sulfur-Linked Amino Acids As First Inhibitors for Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase 2. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 6822-6831.

Podíl doktorandky asi 80%.

2. PŘEHLED PROBLEMATIKY Z LITERATURY

2.1 *Metabolismus homocysteinu*

Homocystein (Hcy) je sirná neesenciální aminokyselina, která se nevyskytuje v primárních proteinových sekvencích. Metabolismus Hcy je mezičlánkem v metabolismu sirných aminokyselin, kde se propojuje methioninový a folátový cyklus (viz obrázek 1). Spolu s adenosinem je Hcy produktem reakce katalyzované S-adenosylhomocystein hydrolysou (SAHH) rozštěpením S-adenosylhomocysteinu (SAH), který vzniká demethylací S-adenosylmethioninu (SAM). Tato cesta vedoucí ke vzniku Hcy je reverzibilní a termodynamicky nakloněna k syntéze SAH - silného inhibitoru mnoha methylačních reakcí⁹. Hcy může být dále metabolizován několika enzymatickými reakcemi, které se liší hodnotami K_m . Buňka tedy podle svých potřeb může upřednostnit některou z možných cest a to a) transsulfurační cestu, b) remethylační cestu a nebo c) export Hcy z buňky do krevní plazmy.

K_m pro CBS k Hcy je ~5 mM, zatímco K_m pro MS i BHMT k Hcy jsou v mikromolárních koncentracích¹⁰⁻¹². Na druhou stranu je hodnota k_{cat} BHMT přibližně 1000krát menší než k_{cat} MS, které je ale v jaterních buňkách méně¹³. Přeměna Hcy na methionin nakonec probíhá vyrovnaně: ~50 % působením CBS transsulfurační cestou a ~50 % remethylační cestou, na které se BHMT a MS podílí přibližně stejně.

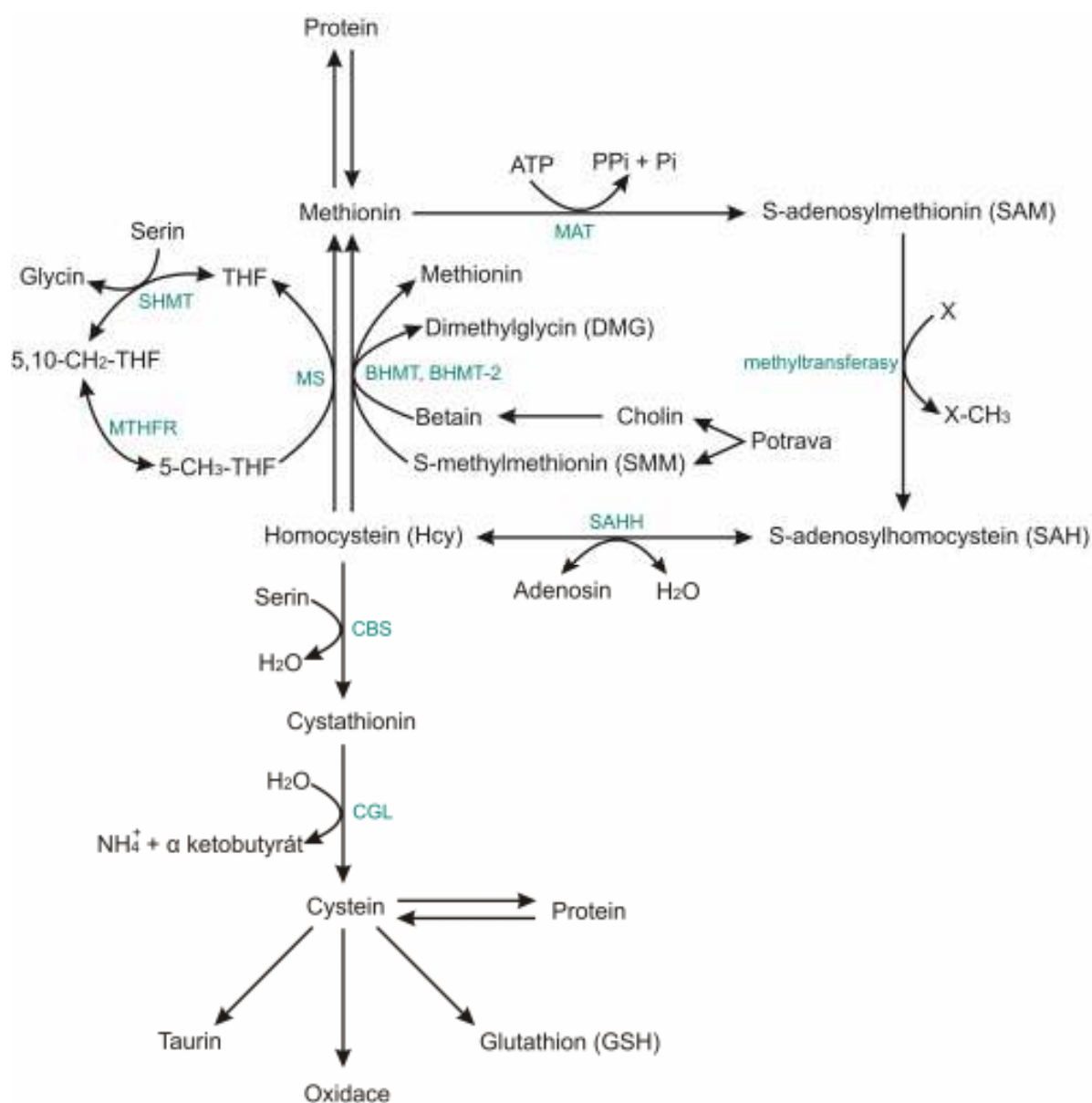
Transsulfurační cesta vede k syntéze cystathioninu a cysteinu. Kromě enzymů katalyzujících tyto reakce, cystathionin β synthasy (CBS) a cystathionin γ lyasy (CGL), požaduje transsulfurace přítomnost kofaktoru vitamínu B₆. Cystein je pak dále použit při syntéze proteinů či glutathionu (GSH). Bylo prokázáno, že ~50 % cysteinu obsaženého v GSH pochází z SAM následnou přeměnou Hcy transsulfurační cestou^{14, 15}. GSH může být v buňce oxidován (forma GSSG), poměr GSH/GSSG je považován za celkovou míru oxidačního stavu buňky¹⁶.

Remethylační cesta vede ke vzniku methioninu. Toto může probíhat katalýzou buď methionin synthasy (MS) za přítomnosti vitamínu B₁₂, betain-homocystein S-methyltransferasou (BHMT), nebo betain-homocystein S-methyltransferasou 2 (BHMT-2), kde každý enzym má jiný donor methylové skupiny. Tyto tři enzymy takto propojují metabolismus Hcy s folátovým a fosfatidylcholinovým⁹. Na rozdíl od MS, která je exprimována ve většině orgánech, je remethylace enzymy BHMT a BHMT-2 omezena jen na buňky jater a ledvin¹⁷. Enzymy BHMT a BHMT-2 jsou podrobně diskutovány dále. Vzniklý

methionin je pak opětovně přeměněn na SAM reakcí katalyzovanou methionin adenosyltransferasou (MAT). SAM je přeměněn na SAH a ten dále na Hcy a cyklus se může opakovat⁹ (viz obrázek 1).

Další dva enzymy, které se podílí na metabolismu Hcy jsou methyilentetrahydrofolát reduktasa (MTHFR) a methionin synthasa reduktasa (MSR). MTHFR redukuje 5,10-methyilentetrahydrofolát na 5-methyltetrahydrofolát, což je substrát MS. MSR je enzym, který obnovuje oxidovanou MS a uvádí ji tak zpět do aktivní formy¹⁸. Na konci padesátých let minulého století byla v krysích jaterních buňkách objevena ještě další homocysteinmethyltransferasa (HMT), a to SAM-HMT¹⁹.

Hcy je tvořen ve všech lidských orgánech. Nicméně játra zpracovávají 48 % člověkem přijatého methioninu^{9, 20}, a proto jsou považována za hlavní místo regulace Hcy²¹.



Obrázek 1: Schéma metabolismu homocysteinu. MAT, methioninadenosyl transferasa; SAHH, S-adenosyl-homocystein hydrolasa; BHMT, betain-homocystein S-methyltransferasa; BHMT-2, betain-homocystein S-methyltransferasa 2; MS, methionin synthasa; CBS, cystathionin β synthasa; CGL, cystathionin γ lyasa; MTHFR, methyletetrahydrofolát reduktasa; SHMT, serin hydroxymethyltransferasa; THF, tetrahydrofolát; DMG, dimethylglycin; SMM, S-methylmethionin; X, akceptor methylové skupiny. Převzato²² a upraveno.

2.2 Regulace, funkce a poruchy metabolismu homocysteinu

Remethylace Hcy je kritickým krokem syntézy **SAM** - donoru methylové skupiny pro všechny biologické methylační reakce²³. Většina methylových skupin získaných přeměnou SAM je dále použita pro biosyntézu fosfatidylcholinu či kreatinu²⁴. Vzhledem k tomu, že SAM je alosterickým aktivátorem CBS, která limituje rychlost syntézy cysteinu a následně GSH, může tak ovlivňovat transsulfurační cestu metabolismu Hcy²⁵. Za oxidačních podmínek je aktivita CBS zvýšená stejně tak jako přeměna Hcy na cystein a následně glutathion^{10, 14, 26}. Tato regulace metabolismu Hcy je důležitá při oxidačním stresu buňky, kdy je vyšší potřeba glutathionu¹⁰. Antioxidanty (např. katalasa, superoxid dismutasa a některé deriváty vit E) naopak snižují přeměnu Hcy transsulfurační cestou²⁶. SAM je zároveň inhibátorem MTHFR²⁷.

Metabolismus Hcy je vysoce závislý na zdrojích methylových skupin a kofaktorů získaných v potravě, a je proto stravou ovlivnitelný. Hlavními zdroji jsou methionin, methylfolát a cholin^{28, 29}.

Enzym BHMT remethylační cestou navrácí jednu ze tří methylových skupin, které byly spotřebovány na syntézu cholinu. Ten může být jak v jednotlivých tkáních syntetizován, tak získáván z potravy. **Cholin**, patřící do skupiny vitamínů B³⁰, vzniká z fosfatidylcholinu - jednoho z hlavních membránových fosfolipidů. Takto se vytvoří 95% celkového množství cholinu v savčích tkáních. Cholin je v buňce používán k biosyntéze buněčných membrán, molekul buněčné signalizace a dále jako osmolyt a prekurzor neurotransmiteru acetylcholinu^{31, 32}. V mitochondriích jaterních a ledvinných buněk může být cholin přeměněn zpět na fosfatidylcholin nebo ireverzibilně oxidován na betain^{30, 33}. Transport betainu z mitochondrií probíhá pravděpodobně pasivní difúzí, žádný proces značící aktivní transport nebyl dosud identifikován³⁴.

Betain má dvě klíčové fyziologické funkce: a) přírodní osmolyt buněk, který chrání buňku před osmotickým stresem³⁵⁻³⁷, vysokou teplotou či iontovou silou³⁴ a apoptosou^{38, 39} a b) donor methylové skupiny při remethylaci Hcy za vzniku methioninu⁴⁰. Tyto dvě funkce jsou na sobě závislé; exprese BHMT je s vyšší osmolalitou redukována, tudíž při nedostatku osmolytů je metabolismus betainu potlačen⁴⁰⁻⁴². Dosud není znám žádný jiný enzym kromě BHMT, který by metabolizoval betain. BHMT má tedy značný vliv na regulaci koncentrace betainu, a opačně⁴³. Betain obnovuje také správný poměr SAM:SAH (tzv. „methylační

index“), který udává pravděpodobnost methylace⁴⁴. Betain je zároveň i lipotropní látkou. Chrání tedy před akumulací tuků v játrech⁴⁵. Obecně chrání játra proti toxickým látkám, zlepšuje funkci jater a podstatně snižuje bilirubin v plazmě^{40, 46}. Buňky získávají betain buď potravou, nebo oxidací cholinu. Hlavním zdrojem betainu ve stravě jsou mořské plody, pšeničné klíčky, otruby a zelenina jako špenát nebo řepa⁴⁰.

Methionin je aminokyselina nutná pro vývoj a růst savčích buněk a pro většinu methylačních reakcí, kde slouží jako donor methylu. Nedostatek methioninu v lidských buňkách dramaticky zvyšuje aktivitu BHMT⁴⁷. **DMG** vzniká z betainu katalýzou BHMT, což je u savců dosud jediná známá cesta. Přítomnost DMG tak může být považována za důkaz, že Hcy je methylován pomocí BHMT³⁴.

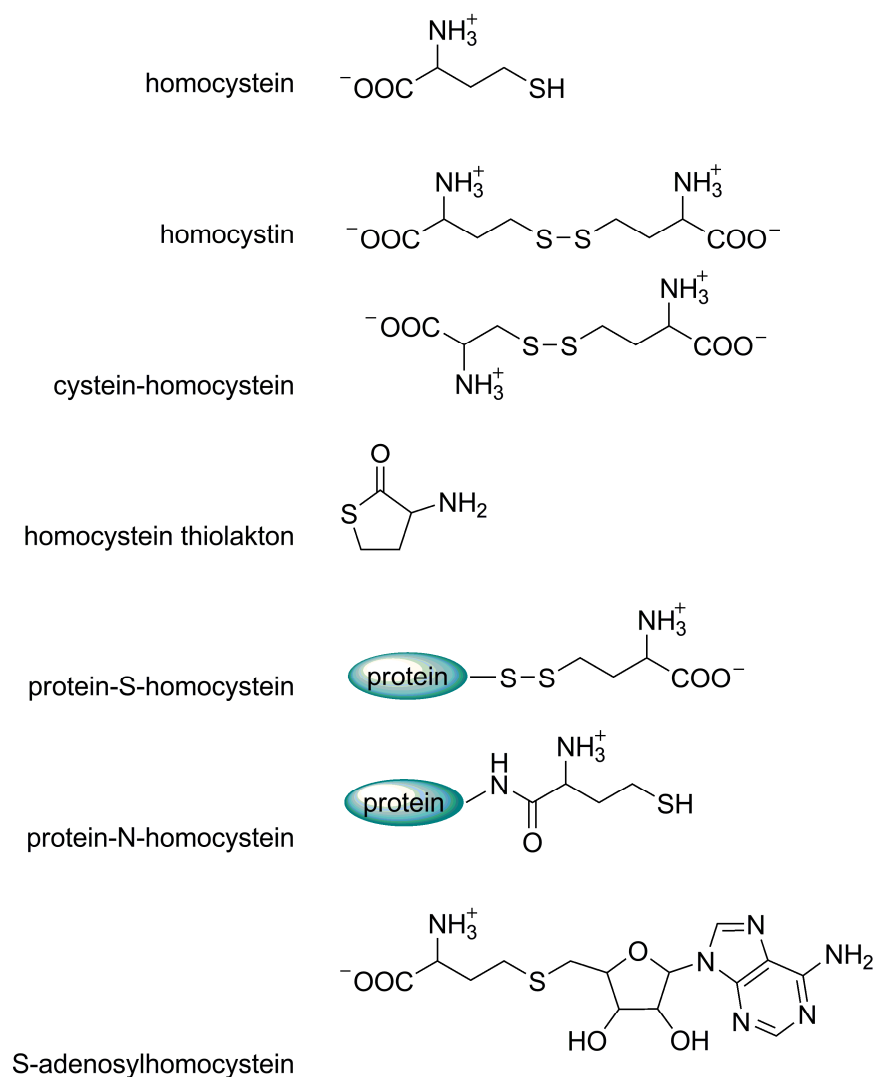
Hlavní biochemická role **folátu** (vit B₉) je přenos methylové skupiny, proto je folát důležitým faktorem při syntéze a opravách DNA a také při methylačních reakcích. Folát je nutný k mnoha dalším biochemickým cestám, které zahrnují např. metabolismus aminokyselin (Gly, Ser, Thr, Tyr, His a Met)⁴⁸.

SMM, taktéž nazýván vitamín U, se nachází ve vysokých koncentracích pouze v rostlinné potravě jako je zelí, brokolice, chřest, česnek, pšenice, sója, zelený čaj a oříšky^{49, 50}. Schopnost lidských buněk syntetizovat SMM dosud nebyla pozorována.

2.2.1 Formy homocysteinu

Při biosyntéze proteinů může Hcy představovat komplikaci vzhledem ke své podobnosti s methioninem, leucinem a isoleucinem⁵¹. Při záměně s aminokyselinami dochází v prvním kroku k aktivaci Hcy za vzniku Hcy-AMP. Tato forma ale již není přenesena na tRNA, a nevstupuje tedy do genetického kódu. Hcy-AMP je následně odbourán^{52, 53}.

Hcy je pravděpodobně nejreaktivnější aminokyselina v biologickém systému⁵¹. Thiolová skupina Hcy je při fyziologickém pH reaktivnější než u cysteinu⁵⁴. V plazmě je oxidována, což je doprovázeno vznikem reaktivních forem kyslíku (ROS). Vzniká tak homocystin a smíšené disulfidy, které představují většinovou formu této aminokyseliny v krevním oběhu¹⁸. Kromě přeměny Hcy remethylační či transsulfurační cestou může být tedy Hcy přeměňován na další metabolity, jako např. Hcy thiolakton, homocystin nebo S-nitrosohomocystein atd⁵¹. Možné formy plazmatického Hcy jsou na obrázku 2.



Obrázek 2: Možné formy Hcy v plazmě.

Za fyziologických podmínek je **Hcy thiolakton** neutrální molekulou a volně difunduje buněčnou membránou⁵⁵⁻⁵⁷. Thioesterová vazba Hcy thiolaktonu snadno reaguje s nukleofilními skupinami, obzvláště s volnými *N*^ε-aminoskupinami lysinů obsaženými v proteinech⁵⁸. Takto modifikované proteiny podléhají rychleji oxidaci, což vede ke změně jejich struktury a funkce⁵⁸, a to může vést k vážným zdravotním komplikacím. Například inaktivace lysinoxidasy způsobená Hcy thiolaktonem může hrát roli při abnormalitách vývoje kostí, které jsou také patrné u dětí trpících hyperhomocysteinemií⁵¹. Hcy thiolakton je také velmi reaktivní vůči aldehydům (např. pyridoxalfosfátu nebo streptomycinu)⁵⁷. Jeho reaktivita se využilo při chemických modifikacích proteinů, kdy vznikaly *N*-acetylované deriváty Hcy thiolaktonu⁵⁹.

Bylo prokázáno, že Hcy thiolakton je velmi toxický pro centrální nervový systém, nicméně mechanismus tohoto jevu není zcela objasněn^{60, 61}. Předpokládá se, že toxicita Hcy thiolaktonu je důsledkem jeho vlivu na metabolismus kyseliny homocysteinové - silného neurotransmiteru⁶². Dále se zjistilo, že lidské rakovinné buňky produkují více Hcy thiolaktonu než buňky zdravé^{56, 63}. Hcy thiolakton způsobuje stejně jako Hcy apoptózu buněk^{64, 65}, ovšem již při šedesátkrát nižší koncentraci oproti Hcy^{64, 66}.

S-nitroso-Hcy je taktéž strukturně podobný methioninu a teoreticky by mohl nahrazovat methionin v biosyntéze proteinů. Oproti Hcy ale S-nitroso-Hcy nemá volnou thiolovou skupinu, čímž se nepředpokládá jeho přeměna na Hcy thiolakton, a může být tedy přenesen na tRNA. S-nitroso-Hcy pravděpodobně existuje *in vivo*, u lidí ještě detekován ale nebyl⁵¹. S-nitrosothioly jsou obecně důležitou složkou NO-dependentní signální dráhy⁶⁷.

2.2.2 Nemoci spojené s poruchami metabolismu homocysteinu

Zájem o problematiku týkající se Hcy a jeho metabolismu se během posledních let zvýšil vzhledem k rizikům, které jsou spojeny s jeho vysokou koncentrací v krevní plazmě. Na rozdíl od ostatních intracelulárních thiolových sloučenin (GSH, cystein) je Hcy pro buňku ve vyšších koncentracích toxický⁶⁸. Hcy je považován za rizikový faktor kardiovaskulárních chorob⁶⁹, lupénky⁷⁰, nedostatečné činnosti ledvin⁷¹, rozštěpu páteře⁷², Alzheimerovy choroby^{73, 74}, komplikace v těhotenství^{75, 76}, poruchy nervové soustavy⁷⁷⁻⁷⁹, osteoporózy, demence⁸⁰ atd.

Nedostatek folátu, substrátu pro MS, může zvyšovat poškození DNA^{81, 82}, výskyt nádorů⁸³ a snížit schopnost oprav DNA^{84, 85} pravděpodobně kvůli akumulaci Hcy. Změny v methylacích DNA mohou být ale způsobeny několika faktory, včetně změn v koncentracích SAM a/nebo SAH.

Nízká koncentrace betainu a cholinu v plazmě způsobuje u lidí hypomethylaci DNA⁸⁶ a je spojována s vyšším výskytem tuků a dalších látek vyskytujících se u metabolického syndromu⁸⁷. Při nedostatku cholinu byla prokázána akumulace mastných kyselin v játrech^{88, 89} a zvýšená pravděpodobnost výskytu karcinomu jater^{90, 91}. Mírně vyšší koncentrace Hcy je ovšem v populaci obvyklá (10-20%)⁹². Způsobená může být genetickými i negenetickými faktory (např. stravou chudou na vitamin B₆, B₁₂ či folát). Zvýšená koncentrace Hcy v plazmě je pak označována za hyperhomocysteinemii.

Hyperhomocysteinemie

Fyziologická hladina Hcy v plazmě se pohybuje mezi 5-15 μM . Vyšší koncentrace Hcy se označuje jako hyperhomocysteinemie a rozděluje se do tří skupin: mírná (15-30 μM), střední (31-100 μM) a těžká (> 100 μM). Těžká hyperhomocysteinemie může být způsobena dědičným nedostatkem enzymů Hcy metabolismu, nejčastěji ale mutacemi enzymu CBS¹⁸. Běžně se také vyskytuje při cirhóze jater⁹³, kdy je inhibována biosyntéza SAM^{94, 95}. Chronický nadbytek Hcy vede naopak k vyššímu množství SAH, a tím ovlivnění SAM:SAH poměru⁹⁶.

Vliv nadměry Hcy, jakožto oxidantu vyvolávající oxidační stres, je považován za příčinu *in vivo*^{97, 98} a *in vitro*⁹⁹ peroxidace lipidů a špatné regulace metabolismu sterolů¹⁰⁰. Dalším vlivem je taktéž porucha funkce endotheliálních buněk díky redukcí NO a glutathion peroxidasy, což způsobí sníženou koncentraci GSH v buňce¹⁰⁰. NO má silné vasodilatační účinky. Za normálních podmínek se účastní detoxifikace Hcy a to jeho přeměnou na S-nitrosohomocystein, který má taktéž vasodilatační účinky a který inhibuje funkci krevních destiček¹⁰¹. Glutathion peroxidasa katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku, který vzniká mimo jiné autooxidací Hcy a který zároveň pravděpodobně ovlivňuje dostupnost NO v buňce¹⁰².

Aktivace defektních enzymů příslušnými kofaktory nebo jejich prekurzory (folát, vitamíny B₆, B₁₂) jako prevence nebo léčba hyperhomocysteinemie sice snižují u pacientů hladinu Hcy^{103, 104}, ale léčba závisí také na příčině a vážnosti daného defektu. Pokud tento přístup nepomůže, bývá přistoupeno k podávání betainu a kyseliny listové s cílem zesílit jinou z cest metabolismu Hcy^{105, 106}.

Homocystinurie

Vážné homocysteinemie způsobené vrozenými homozygotními genetickými dysfunkcemi jsou často nazývány homocystinurií. Homocystinurie je multisystémové onemocnění způsobené deficitem CBS, MTR, MTHFR nebo syntézy kobalaminu^{107, 108}. Převážně se projevuje vážnými vadami očí včetně dislokace čočky, krátkozrakostí, zeleným zákalem a oční atrofií¹⁰⁸.

CBS katalyzuje kondenzaci Hcy a serinu za vzniku cystathioninu. Kofaktorem je zde vitamin B₆. Přibližně polovina nemocných homocystinurií pozitivně reagují na léčbu vitamínem B₆. V ostatních případech se přistupuje k léčbě betainem, popřípadě spolu s další terapií⁴⁰. Betain stejně tak zlepšuje metabolismus Hcy při nedostatku MTHFR⁴⁰. V několika studiích bylo ovšem publikováno, že vyšší koncentrace Hcy, která přetrvávala i po léčbě betainem (obecně 30-80 μM) je signifikantně spojována s kardiovaskulárními chorobami¹⁰⁹.

Role BHMT

Změny v aktivitě BHMT byly zaznamenány u onemocnění jako cirhóza či karcinom jater - celosvětově pátého nejčastějšího karcinomu¹¹⁰⁻¹¹². U těchto onemocnění jsou klíčové enzymy metabolismu Hcy, včetně BHMT, razantně redukovány^{93, 110}. Tyto změny pak hrají roli při nestabilitě genetického kódu a epigenetických modifikacích, jako je například methylace DNA a modifikace histonů⁶⁸. Protože BHMT katalyzuje reakci, při které se snižuje množství Hcy a následně vzniká SAM, je jí přisuzována důležitá role prevence jater před hepatotoxicitou^{113, 114}. Prokázána byla i BHMT regulovaná exprese apolipoproteinu B, což vede ke zvýšení množství dalších příbuzných lipoproteinů¹¹⁵. Poruchy genu kódujícího BHMT vedou k hyperhomocysteinemii a homocystinurii¹².

2.3 Zn^{2+} -dependentní thiolové a selenové methyltransferasy

Zn^{2+} -dependentní thiol/selenol methyltransferasy, neboli rodina enzymů Pfam 02574, používají thioly nebo selenoly jako akceptory methylových skupin. Do této rodiny patří methionin synthasa (MS), thiol/selenol methyltransferasa, adenosylmethionin homocystein methyltransferasa (SAM-HMT), BHMT^{116, 117} a také nedávno objevená BHMT-2².

Tyto enzymy mají dva typické strukturní motivy (u BHMT odpovídající 214-GVNCH-218 a 293-VRYIGGCCGFEFYHI-307), které obsahují tři cysteiny (217, 299, 300), které váží Zn^{2+} , a jsou tedy pro aktivitu enzymu nezbytné¹¹⁸. Role atomu zinku je polarizovat či deprotonovat thioly či selenoly a tím je aktivovat k nukleofilnímu ataku na substrát - donor methyly¹¹⁹. Atom zinku obecně bývá tetrahedrálně koordinován k histidinovým, cysteinovým, aspartátovým či glutamátovým aminokyselinovým postranním řetězcům¹²⁰. Popsány byly ale i vazby k threoninu, tyrosinu či serinu^{121, 122}.

U BHMT je čtvrtým ligandem vázajícím Zn^{2+} tyrosin v pozici 160¹²³. Ovšem Tyr160 není konzervovanou aminokyselinou thiol/selenol methyltransferasové rodiny enzymů. Některé aminokyseliny, zodpovědné u BHMT za vazbu substrátů (Asp26, Gly27, Gly28, Glu159, Trp44) a které jsou v rámci primární sekvence enzymů rodiny Pfam 02574 konzervovány, naznačují, že všechny tyto enzymy mají podobnou strukturu aktivního místa pro vazbu atomu zinku a Hcy³. Aminokyseliny 11-318, které u BHMT tvoří $(\alpha/\beta)_8$ barel, jsou u členů rodiny Pfam 02574 také velmi podobné^{116, 117}.

Většina enzymů patřících do této rodiny je složena z mnohem méně aminokyselin než BHMT. U většiny končí aminokyselinová sekvence v pozici odpovídající Ser325 u BHMT. Navíc většina proteinů patřících do této rodiny, jejichž struktura byla zkoumána, jsou, na rozdíl od BHMT, monomery. BHMT je tedy v této rodině enzymů středem zájmu díky své C-koncové části, která je zodpovědná za oligomerizaci a může lépe objasnit vazebné mechanismy napomáhající stabilizaci. Za tímto účelem byly provedeny studie, kde byla BHMT rozbalována pomocí močoviny, a byly připraveny mutantní enzymy, které byly sledovány pomocí fluorescence tryptofanu¹²⁴.

2.4 Betain-homocystein S-methyltransferasa

Lidská BHMT (EC 2.1.1.5) je protein složený z 406 aminokyselin, monomer má přibližně 45 kDa a pI 6,6. Je to cytozolický¹²⁵ Zn²⁺ metaloenzym¹²⁶ patřící do rodiny enzymů Pfam 02574.

Izolace a charakterizace koňského, kryšního či prasečího enzymu BHMT byla provedena již v šedesátých letech minulého století¹²⁷⁻¹²⁹. Lidská BHMT z jaterních buněk byla poprvé purifikována až v devadesátých letech¹³⁰ a rekombinantní BHMT byla exprimována a purifikována v laboratoři našeho spolupracovníka T. A. Garrowa relativně nedávno, v roce 1996¹².

2.4.1 Gen betain-homocystein S-methyltransferasy

Savčí BHMT je vysoce konzervovaný enzym. Lidský a prasečí gen mají 88% identitu a na úrovni aminokyselin dokonce 94% identitu¹². Porovnáním lidského genu BHMT s myším byla zjištěna 61% identita¹².

Myší model s deletovaným genem pro BHMT enzym (*Bhmt*^{-/-}) kompletně ztratil aktivitu enzymu, kdežto heterozygotní model myši měl 53% BHMT aktivitu. Tyto výsledky značí bílelickou expresi *Bhmt* genu⁸.

Pro lepší pochopení mezi genetickými polymorfismy a funkcí BHMT¹³¹ byly provedeny studie pro zjištění vztahu mezi genotypem a fenotypem enzymu. Množství i aktivita BHMT během fetálního vývoje stoupala. Identifikovány byly 4 různé polymorfismy v rámci jednoho nukleotidu, které by mohly být biomarkery pro změnu exprese a funkce BHMT a tedy mít roli při onemocnění jater¹³¹. Byly zjištěny také obvyklé mutace genu¹³²

BHMT, například substituce Gln239Arg je u lidí běžnou variantou vyskytující se přibližně u 10-17% dospělé populace^{132, 133}.

2.4.2 Distribuce betain-homocystein S-methyltransferasy

Enzym BHMT se u většiny živočišných druhů nejvíce vyskytuje v játrech a ledvinách, přičemž v játrech reprezentuje 0,6-1,6% všech rozpustných proteinů. Ovšem aktivita BHMT v lidských, prasečích a obzvláště krysích ledvinných buňkách je velmi malá^{1, 125, 134}. BHMT byla také nalezena v buňkách oční čočky makaka thesis (*Macaca mulatta*) v 0,5-10% zastoupení všech proteinů¹³⁵. Identifikována byla i v interakci s tubulinem v mikrotubulech¹³⁶ a s buněčnými organely autofagosomy¹³⁷. V žádných dosud testovaných mikroorganismech ani rostlinách nebyla aktivita BHMT potvrzena¹²⁸, výjimkou jsou *Pseudomonas denitrificans*¹³⁸ a *Aspergillus nidulans*¹³⁹.

Značná přítomnost BHMT v játrech a ledvinách značí její důležitost v metabolismu Hcy a regulaci osmózy jakožto procesů primárně probíhajících v těchto orgánech. Její přítomnost v očních čočkách naznačuje další, dosud neznámé funkce tohoto enzymu⁷⁶.

2.4.3 Známé *in vivo* funkce betain-homocystein S-methyltransferasy

Odvozená aminokyselinová sekvence prasečí BHMT je z 95%, 96%, 94% a 96% identická s lidskou, hovězí, krysí a myší BHMT. Nicméně je nutné zmínit, že i přesto se metabolismus Hcy a exprese jeho enzymů v lidských a myších buňkách liší¹⁴⁰.

Mnoho studií se zabývalo působením stravy na metabolismus Hcy. Strava byla zaměřena na sirté aminokyseliny, lipotropní faktory (obohacené o methionin, cholin, betain, cystin) a hormony. Například stravování myší potravou bez přítomnosti methioninu se projevilo vyšší expresí a **aktivací BHMT**, která byla dále zvýšena doplněním cholinu a betainu v potravě^{47, 141, 142}. Aktivaci BHMT pozorovali taktéž po přidávku cysteinu do potravy krys^{143, 144}. Toto bylo pozorováno i u enzymových BHMT reakcí *in vitro*, kde stejné množství cysteinu vedlo k 59% inhibici⁵. Poměr cysteinu ku cystinu může pravděpodobně ovlivňovat redoxní stav aktivního místa BHMT a její katalytickou aktivitu¹⁴⁵. Stejný způsob regulace byl popsán i u inducibilní NO syntasy¹⁴⁶.

Chyby v metabolismu Hcy jsou způsobené taktéž příjmem ethanolu. Po příjmu alkoholu byla aktivita BHMT *in vivo* zvýšena¹⁴⁷. Zároveň docházelo ke snížení MS aktivity, aby se koncentrace SAM udržela v klinicky normálních hodnotách¹⁴⁷. Toto vedlo

k akumulaci intracelulárního SAH¹⁴⁸, a tedy snížení poměru SAM:SAH, což negativně ovlivňuje aktivitu mnoha důležitých jaterních methyltransferas¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

Inhibice BHMT *in vivo* pomocí specifického inhibitoru S-(4-karboxybutyl)-DL-homocysteinem (CBHcy) způsobila zvýšení koncentrace celkového Hcy v plazmě, pokles hladiny SAM a CBS, což vedlo k poklesu cysteinu, který je limitní látkou při biosyntéze GSH^{43, 152, 153}. Snížení CBS, a tedy přeměny Hcy transsulfurační cestou je pravděpodobně snaha buňky podpořit remethylační cestu pomocí MS za vzniku methioninu, nicméně vysoké koncentrace Hcy přetrvávají^{43, 152}. Zajímavým výsledkem v další studii byla snížená koncentrace taurinu (dalšího osmolytu) vlivem CBHcy, kdy byla zároveň zvýšená koncentrace betainu v plazmě⁴³.

Snížení hladiny BHMT také ovlivňuje hladinu methioninu, a působí tak na růst a proliferaci rakovinných jaterních buněk, které jsou na dostatku methioninu velmi závislé^{154, 155}. Rakovinné buňky mají vysoký požadavek na SAM kvůli transmetylačním reakcím i syntéze polyaminů^{156, 157}. U myši byly zjištěny tři indikátory měnící se při výskytu nádorů, a to změny v hladinách SAM a SAH a hypomethylace DNA¹⁵⁸. Absence BHMT a zároveň nedostatek methioninu ve stravě navíc zvyšují pravděpodobnost ztučnění jater. Aktivita BHMT je tedy nutná k udržení normální hladiny GSH, k prevenci akumulace tuků v játrech¹⁵² a k prevenci před hepatotoxicitou^{113, 114}.

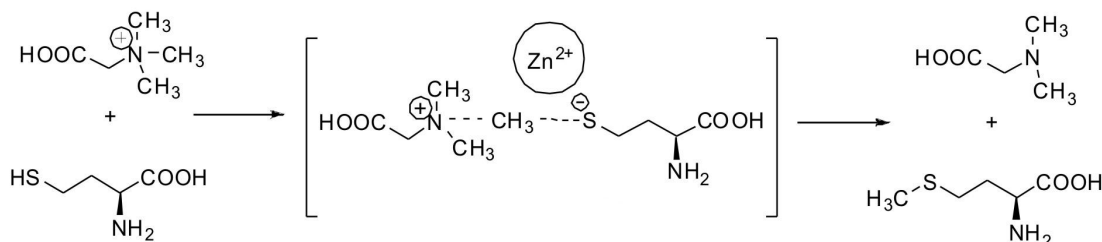
Teprve v roce 2011 byl Tengem et al. vyvinut první **Bhmt^{-/-} myši model**⁸. Výsledky studie *Bhmt^{-/-}* myšního modelu jsou v souladu s výsledky *in vitro* studií inhibice BHMT pomocí CBHcy, zjištěnými do té doby. Delece *Bhmt* genu vyústila v několik biochemických abnormalit včetně vzniku hyperhomocysteinemie, výraznému snížení poměru SAM:SAH, zvýšení koncentrace betainu ve tkáních a naopak snížení hladin cholinu, fosfocholinu, glycerolfosfocholinu, fosfatidylcholinu a sfingomyelinu⁸. Delece *Bhmt* genu také vedla u *Bhmt^{-/-}* myšního modelu ke zvýšení citlivosti k inzulinu a ke glukose, k větší spotřebě O₂, snížené schopnosti udržet si tělesnou teplotu a k snížení obezity. Celková redukce tuků může být vysvětlena celkovým nárůstem tělesného energetického výdeje, zvýšenou oxidací glukosy, snížením syntézy triacylglyceridů a snížením transportu lipidů z jater, který se následně ukládá v tukové tkáni¹⁵⁹. Nicméně *Bhmt^{-/-}* myši mají sníženou koncentraci jaterního fosfatidylcholinu, který se účastní exportu VLDL a triglyceridů z jater, což zvyšuje akumulaci tuků v játrech^{8, 152}. U 64 % myši byl po necelém roce života patrný karcinom jater.

Touto studií Teng et al.⁸ potvrdili, že BHMT má důležitou roli v metabolismu Hcy a jeho homeostázy. Delece *Bhmt* genu neovlivnila reprodukci potomstva. BHMT tedy není pro produkci ani embryonální vývoj nezbytná⁸, což bylo naznačováno v jiných *in vitro*

studiích¹⁶⁰. Jsou také známy jednonukleotidové polymorfismy lidského BHMT genu, které mohou pozměnit aktivitu enzymu nebo jeho expresi¹³¹, a mohou tedy mít podobné následky, jaké byly popsány u *Bhmt*^{-/-} myši⁸.

2.4.4 Reakční mechanismus betain-homocystein S-methyltransferasy

BHMT katalyzuje přenos methylové skupiny z betainu na L-Hcy za vzniku L-methioninu a dimethylglycinu (DMG), jak je znázorněno na obrázku 3. Mechanismus této reakce je tzv. uspořádaný bi-bi, kde prvním vázajícím se substrátem je L-Hcy a prvním uvolňujícím se produktem je DMG^{4,5}. Během vazby substrátů dochází k nukleofilnímu ataku thiolátové skupiny L-Hcy na methylovou skupinu betainu, aktivace (depolarizace -SH skupiny) L-Hcy je zprostředkována vazbou kationtu zinku¹²³.



Obrázek 3: Reakce katalyzovaná BHMT, kdy dochází k přenosu methylové skupiny z betainu na L-Hcy za vzniku L-methioninu a DMG. V hranatých závorkách je znázorněn hypotetický tranzitní stav.

Afinity k oběma substrátům BHMT byly v literatuře několikrát popsány a liší se nejen v závislosti na původu enzymu. Hodnoty K_m BHMT k L-Hcy se pohybují v mikromolárním rozmezí a publikováno bylo překvapivé rozpětí 4-120 μM ^{126, 130}. Publikované hodnoty afinit BHMT k betainu se dle literatury pohybují v rozpětí ještě větším, a to mezi 23 μM až 2 200 μM ^{126, 161}. D-Hcy substrátem BHMT není¹⁶². Stejně tak SAM a SMM, methylodonory enzymů Pfam 02574 rodiny¹¹⁶, nejsou nativními substráty BHMT. Naopak jako methylodonor dokáže BHMT využívat dimethylthioacetát¹⁶³ či dimethylthiopropionát¹²⁹.

Předpokládá se, že BHMT je zodpovědná za přibližně polovinu remethylačních reakcí vedoucích ke vzniku methioninu z Hcy¹⁶⁴, čímž má značnou roli v regulaci koncentrace Hcy v plazmě. Ani CBS společně s MS nestačí dostatečně metabolizovat přebytek Hcy, pokud je BHMT nefunkční⁸. Nicméně aktivity BHMT a taktéž MS, která je zodpovědná za přeměnu

druhé poloviny Hcy remetylační cestou, jsou navíc závislé na výživě a hormonech (včetně kortizonů, insulinu, estradiolu, thyroïdních hormonech a testosteronu)¹⁶⁵⁻¹⁶⁷.

2.4.5 Struktura betain-homocystein S-methyltransferasy

Krystalografie a studie sedimentační rychlosti ukázaly, že rekombinantní BHMT (lidská i krysí) tvoří v nativní konformaci tetrametr složený z identických podjednotek^{3, 123, 168, 169}, kde každý monomer má své vazné místo pro ion zinku a substráty¹²⁶. Potvrzena byla také nezbytnost oligomerizace pro katalytickou funkci BHMT¹⁷⁰. Zda je ale BHMT, jakožto tetrametr, schopná katalyzovat současně čtyři reakce zároveň, se dosud neví. V roce 2002 byla vyřešena krystalová struktura neaktivního oxidovaného lidského enzymu zbaveného atomů zinku a také struktura enzymu v komplexu se specifickým inhibitorem CBHcy^{3, 123}. O dva roky později byla vyřešena struktura volného a aktivního potkaního enzymu s vázaným Zn²⁺ a bez vázaného ligandu¹²³.

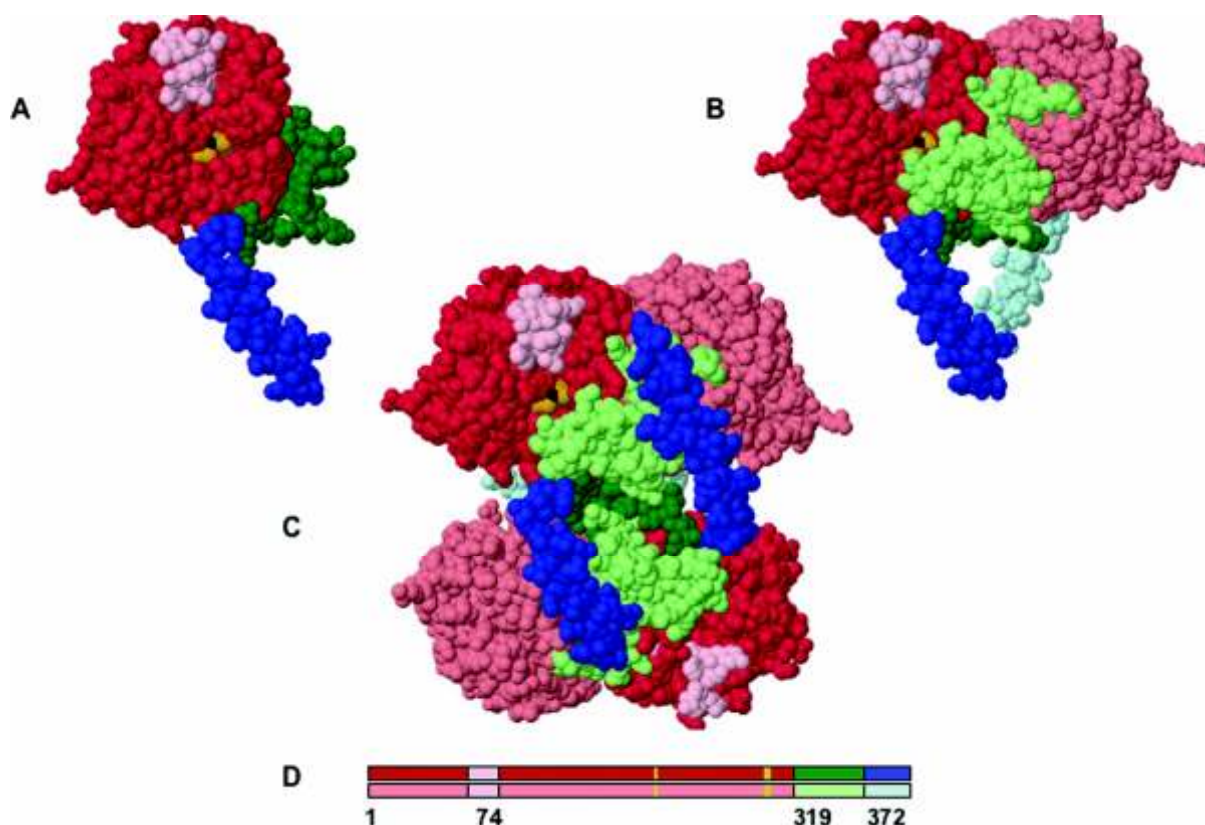
Hlavní strukturou každého monomeru lidské BHMT je $(\alpha/\beta)_8$ barel složený z aminokyselin 11-318³. Aminokyseliny 318-406 na C-konci jednoho monomeru (A) tvoří tzv. dimerizační část, která interaguje s L1 (aminokyseliny 38-52) a L7 (aminokyseliny 248-277) smyčkou protějšního monomeru (B), čímž vznikne dimer (AB). Smyčka z aminokyselin 362-365 v dimerizační části monomeru (A), resp. (B) se váže s totožnou smyčkou protějšního monomeru (C), resp. (D). Monomery (C) a (D) již tvoří dimer (CD) stejným způsobem popsaným výše, čímž se tvoří finální tetrametr (ABCD). BHMT je tedy dimer dimerů^{3, 169} (viz obrázek 4 a 5). Mutace aminokyselin v dimerizační části BHMT vedly k velmi nízké aktivitě a expresi nebo k nemožnosti purifikace mutantního enzymu. Úplná eliminace dimerizační části pak destabilizovala BHMT, což vedlo k rychlé degradaci rekombinantního enzymu v expresním systému *E. coli*¹⁷⁰.

Smyčka L1 a L7 také tvoří vstup do aktivního místa BHMT¹²³. Aktivní místo enzymu je kompletně vytvořeno až po dimerizaci, neboť některé aminokyseliny pomáhají tvořit aktivní centrum dalšího monomeru¹⁷⁰. U aktivního místa BHMT je atom zinku, který se třemi thiolovými skupinami cysteinů (217, 299, 300) a jednou hydroxyskupinou tyrosinu (160) tvoří tetrahedrální uspořádání^{3, 123}. Při vazbě L-Hcy do aktivního místa enzymu dojde k přerušení vazby tyrosinu a atomu zinku a nahrazení Tyr160 substrátem Hcy, což vyvolá konformační změny v aktivním místě enzymu. Nová pozice Tyr160 napomáhá vytvoření hydrofobního prostředí pro následnou vazbu druhého substrátu, betainu^{4, 123}.

BHMT vyžaduje pro svou katalytickou aktivitu přítomnost thiolových redukčních činidel¹⁴⁵. Krátkodobé (<1 h) vystavení enzymu neredukujícímu prostředí vede ke ztrátě aktivity, ale ne ke ztrátě atomu zinku. Příčinou jsou malé strukturní změny v blízkosti aktivního místa způsobené spojením dvou cysteinů (217 a 299) disulfidickým můstkem³, který je ale okamžitě přerušen dodáním redukčního činidla, což vede k obnovení aktivity enzymu. Dlouhodobé vystavení BHMT neredukujícímu prostředí pak vede k pomalé ztrátě atomu zinku a ireversibilní ztrátě aktivity BHMT. Změny v množství thiolových redukčních činidlech tak mohou *in vivo* působit jako spínače BHMT aktivity a naopak^{3, 145}.

Smyčka L2 (aminokyseliny 79-95) je velmi mobilní a důležitá pro vazbu L-Hcy. Pokud je aktivní místo enzymu volné, smyčka L2 je otevřená a substráty mají přístup do aktivního místa. Ovšem po navázání substrátů je část smyčky L2 (konkrétně Phe76 a Tyr77) posunuta směrem do centra enzymu přes vstup do aktivního místa, jak bylo zjištěno z krystalové struktury BHMT s CBHcy^{3, 123}. Navíc Phe76 se nejprve podílí na vazbě L-Hcy, následně ale mění konformaci a taktéž napomáhá tvorbě hydrofobního prostředí pro vazbu betainu¹²³.

Z map elektronových hustot tranzitního stavu BHMT s navázaným CBHcy byly zjištěny aminokyseliny zodpovědné za vazbu L-Hcy (Asp26, Glu159) a betainu (Trp44, Phe76, Tyr77, Tyr160, Phe261, Phe267)³. Mutace v některých těchto pozicích (Glu159, Tyr77) vedly k poklesu aktivity BHMT, jiné naznačily svou další roli ve vazbě betainu¹⁷¹. Během vazby substrátů tedy dochází ke konformačním změnám enzymu, jak je popsáno výše. Celý tento složitý mechanismus perfektně souhlasí s bi-bi mechanismem a pomalou katalytickou schopností BHMT.



Obrázek 4: Krystalová struktura potkaní BHMT (PDB označení 1UMY¹²³). $(\alpha/\beta)_8$ barel je označen červeně, dimerizační část zeleně, smyčka z aminokyselin 362-365 v dimerizační části modře, smyčka L2 růžově, cysteiny v aktivním místě enzymu vázající atom zinku žlutě a atom zinku je černě. Je znázorněn monomer BHMT A), dimer BHMT B), tetrametr BHMT C) a zjednodušená primární struktura BHMT D)¹⁷².

2.4.6 Kompetitivní inhibitory betain-homocystein S-methyltransferasy

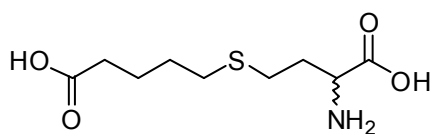
Analogy substrátů v tranzitním stavu se používají jako efektivní kompetitivní inhibitory enzymů¹⁷³. Látky napodobující substráty v tranzitním stavu se při katalytické reakci enzymů na daný enzym váží pevně a stabilizují termodynamicky stálou konformaci podobnou tranzitnímu stavu, který při běžné reakci trvá jen velmi krátkou dobu. Znalost tranzitního stavu substrátů enzymu poskytuje dostatečnou informaci pro syntézu jemu podobných látek, které se budou pevně vázat k enzymu a poskytnou tak nástroj pro studium mechanismu jeho účinku a strukturní studie enzymu¹⁷³.

Jako možné inhibitory BHMT byly testovány mnohé metabolity (např. cystathionin, homocystin), redukční činidla a analogy substrátů^{6, 7, 109, 162, 174-176}. Dosud nejsilnějším a specifickým kompetitivním inhibitorem BHMT je S-(4-karboxybutyl)-DL-homocystein (CBHcy), který pravděpodobně nenapodobuje tranzitní stav, nýbrž spíše vázající se

substráty či produkty reakce¹⁶² (obrázek 7). Nejprve byla určena zdánlivá konstanta inhibice CBHcy, a to K_i $6,5\mu\text{M}$ ¹⁶². Později⁷ byla hodnota K_i^{app} CBHcy k betainu určena jako 12nM. Rozdíl v těchto hodnotách byl pravděpodobně způsoben rozdílnou čistotou připraveného CBHcy, metodikou měření a také zdrojem enzymu BHMT. Původně byla použita izolovaná BHMT z lidských jaterních buněk, při pozdějším měření již rekombinantně připravený enzym⁷. Vzhledem k tomu, že D-Hcy není substrátem BHMT, jako inhibitory fungují jen L-izomery látek¹⁶². Většina inhibitorů byla připravena jako směsi enantiomerů. Publikované hodnoty IC_{50} a K_i^{app} těchto látek budou tedy ještě nižší⁷.

Krystalová struktura BHMT v komplexu s kompetitivním inhibitorem CBHcy³ pomohla objasnit vazby substrátů v aktivním místě, interakci atomu zinku s třemi cysteiny a nakonec byl objasněn i čtvrtý ligand atomu zinku při vazbě substrátů, a to vazba s atomem síry inhibitoru, a tedy i substrátu Hcy v aktivním centru enzymu^{3, 123}.

Kyselina isovalerová a kyselina 3,3-dimethylbutyrová (analogy DMG nebo betainu) jsou dobrými kompetitivními inhibitory BHMT. Soutěží o vazné místo s betainem, což značí, že kladný náboj není pro vazbu v aktivním místě nezbytný, a také, že vazné místo pro betain či DMG může existovat ve dvou různých stavech, které jsou pravděpodobně způsobené přesunem záporně nabitě skupiny enzymu v aktivním místě. Jeden stav umožňuje vazbu kladně nabitě skupiny a druhý pak vazbu neutrální skupiny substrátu či produktu¹³⁰. BHMT je velmi citlivá na jakékoli modifikace ve struktuře inhibitoru. Většina dosud připravených látek inhibuje méně oproti CBHcy⁷. Slabým inhibitorem BHMT je také SAH, který soutěží o vazné místo s Hcy¹³⁰. DMG je nekompetitivním inhibitorem BHMT^{130, 177}.

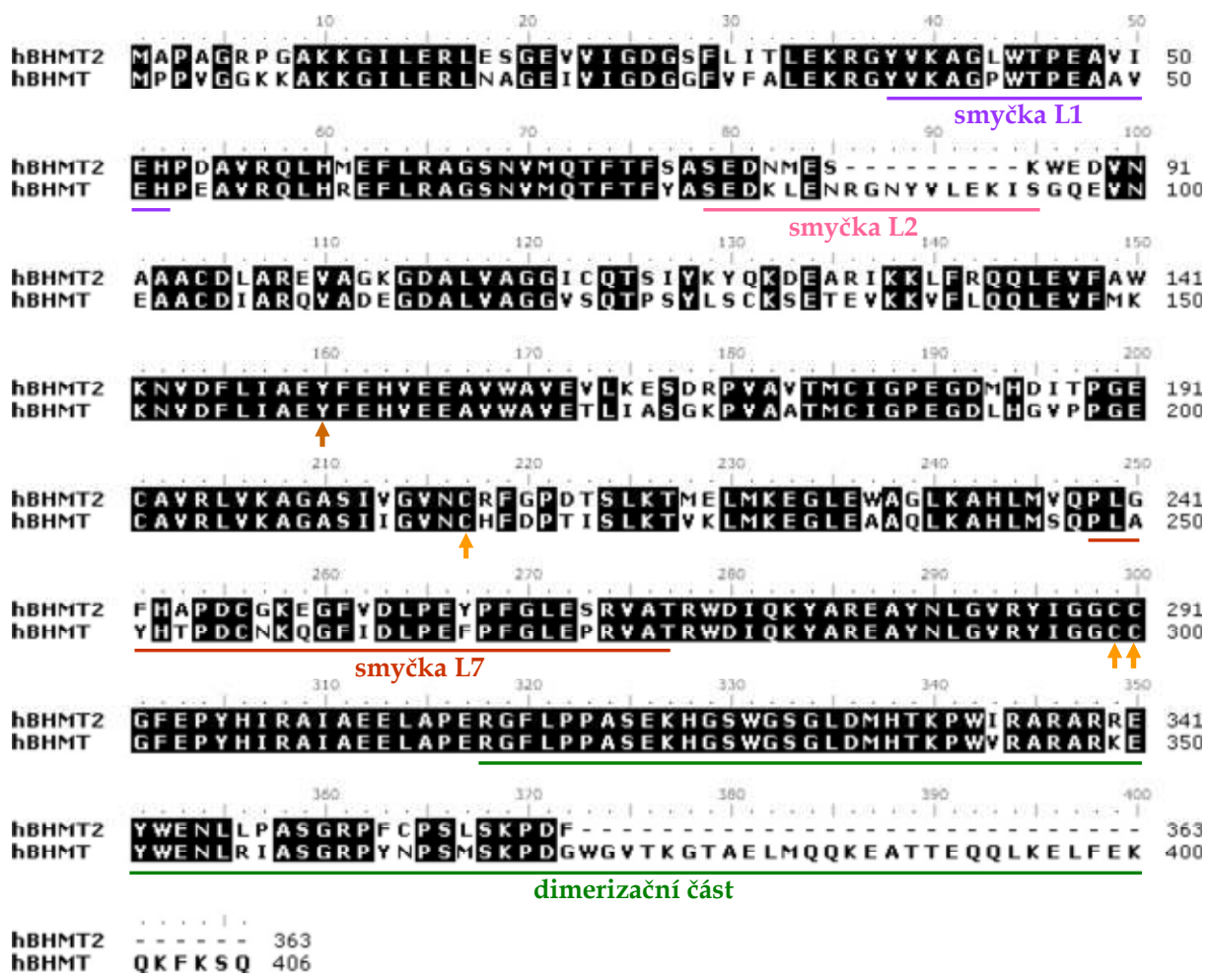


Obrázek 7: Specifický inhibitor BHMT, S-(4-karboxybutyl)-DL-homocystein (CBHcy).

2.5 Betain-homocystein S-methyltransferasa 2

Další enzym, BHMT-2, který je schopen remethylovat Hcy, byl objeven teprve nedávno¹. BHMT-2 a BHMT mají ze 73% identickou aminokyselinovou sekvenci¹ (viz obrázek 5).

BHMT-2 je protein složený z 363 aminokyselin, má přibližně 40 kDa a pI 5,6. Je to cytozolický Zn^{2+} metaloenzym patřící do rodiny enzymů Pfam 02574².



Obrázek 5: Primární struktura BHMT a předpokládaná primární struktura BHMT-2. Identické aminokyseliny jsou v černém pozadí. Barevnými čarami jsou označeny aminokyseliny účastnící se důležitých sekundárních struktur zmíněných v textu. Žluté šipky ukazují na cysteiny a oranžová šipka na tyrosin, které váží atom zinku. Převzato² a upraveno.

2.5.1 Gen betain-homocystein S-methyltransferasy 2

Lidský a myší gen kódující BHMT-2 byl objeven v roce 2000¹. Prasečí BHMT-2 gen má 87%, 82% a 83% identitu v primární sekvenci s lidským, krysím a myším BHMT-2 genem¹³. Vzhledem k podobnosti BHMT-2 s BHMT se předpokládá společný vývoj genů obou těchto enzymů^{1,76}.

2.5.2 Distribuce betain-homocystein S-methyltransferasy 2

BHMT-2 se také vyskytuje v buňkách jater, kde je exprimována zhruba 20krát méně než BHMT. V buňkách ledvin je BHMT-2 přibližně ve stejném množství jako BHMT^{1, 2}. mRNA BHMT-2 byla v menší míře nalezena také v lidském mozku, srdci a kosterních svalech¹. Nicméně izolace aktivní BHMT-2 z buněk zmíněných orgánů dosud nebyla úspěšná².

2.5.3 Známé *in vivo* funkce betain-homocystein S-methyltransferasy 2

Zvýšená exprese BHMT-2 byla pozorována u kryš krmených stravou bohatou na ethanol, kdy docházelo ke ztučnění jater. BHMT-2 byla poté označena jako další možný biomarker tohoto onemocnění¹⁷⁸. BHMT-2 je také možný genetický faktor ovlivňující biosyntézu GSH a methioninu a chrání játra proti toxicitě způsobené acetaminofenem (paracetamolem)¹⁷⁹, který je velmi rozšířeným užívaným analgetikem. Akutní selhání jater je nejčastěji způsobené právě paracetamolem¹⁸⁰, neboť jeho přiměřené použití je sice efektivní a bezpečné, ale jeho nadměrný příjem, zvláště po konzumaci alkoholu, způsobuje poškození jater a buněčnou smrt^{181, 182}.

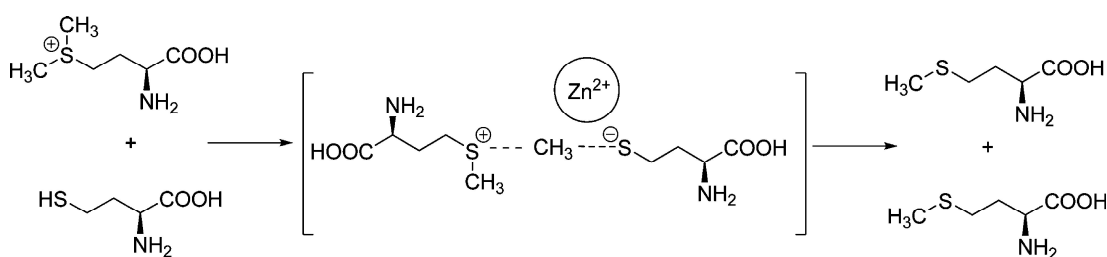
Polymorfismus lokalizovaný na chromozomu s *Bhmt-2* genem u těhotných žen byl označen jako faktor s nižší pravděpodobností narození dítěte s rozštěpem rtu či patra¹⁸³. Riziko vzniku rozštěpu patra je spojováno se třemi enzymy metabolismu Hcy - MTR, BHMT a BHMT-2^{184, 185}.

Rychlá degradace BHMT-2 či chybné skládání do nativní konformace enzymu ovlivnilo studium tohoto enzymu, což způsobilo nedostatek informací ohledně fyziologických funkcí. Přesná úloha BHMT-2 v metabolismu sirných aminokyselin tedy stále není objasněna.

2.5.4 Reakční mechanismus betain-homocystein S-methyltransferasy 2

Po dlouhou dobu se nedařilo definovat enzymovou aktivitu BHMT-2, neboť po expresi a purifikaci velmi rychle degraduje a nespecificky agreguje¹⁶¹. Navíc samotná exprese probíhá v malých výtěžcích, které ale, dle publikací, mohou být zvýšeny pěstováním buněk v přítomnosti 1mM Hcy nebo kotransfekcí s BHMT¹⁶¹.

Až v roce 2008 se podařilo Szegedi et al. získat rekombinantní BHMT-2, stabilizovat ji 40% (v/v) glycerolem a měřit tak enzymovou aktivitu BHMT-2². Poprvé také naznačili možnou tvorbou hetero-oligomerů BHMT a BHMT-2¹⁷⁰. Název tohoto enzymu je poněkud matoucí, neboť není schopen metabolizovat betain jako substrát². BHMT-2 katalyzuje přenos methylové skupiny z SMM na L-Hcy za vzniku dvou molekul L-methioninu, jak je znázorněno na obrázku 6. Je také schopna *in vitro* metabolizovat SAM, ale jen v malé míře. Toto zjištění není překvapující vzhledem k faktu, že většina enzymů patřících do rodiny Pfam 02574 je schopna katalyzovat methylační reakci, kdy donorem methyly je SAM. Betain, který je substrátem pro BHMT, ale BHMT-2 nemetabolizuje².



Obrázek 6: Reakce katalyzovaná BHMT-2, kdy dochází k přenosu methylové skupiny z SMM na L-Hcy za vzniku L-methioninu. V hranatých závorkách je znázorněn hypotetický tranzitní stav.

2.5.5 Struktura betain-homocystein S-methyltransferasy 2

Jak již bylo zmíněno, BHMT-2 a BHMT mají ze 73% identickou aminokyselinovou sekvenci¹. Enzymu BHMT-2 chybí oproti BHMT dvě oblasti¹ (viz obrázek 5). Je to 9 aminokyselin na N-konci (aminokyseliny 86-94), které se u BHMT účastní vazby jednoho ze substrátů - betainu¹²³. Hlavní rozdíl v primární sekvenci je ale na C-konci, kde má BHMT navíc 34 aminokyselin (373-406), které jsou u ní zodpovědné za oligomerizaci, respektive dimerizaci dimerů BHMT, jak bylo popsáno výše v kapitole 2.5.2^{3, 123}. Částečná eliminace této dimerizační části pravděpodobně destabilizuje BHMT-2 a přispívá k rychlé degradaci enzymu^{2, 186}. Tomu odpovídá, že snaha purifikovat zkrácený BHMT enzym končící v pozici Gly319 a Gly372 byla neúspěšná¹⁷⁰. Nicméně některé aminokyseliny zodpovědné za dimerizaci i tetramerizaci BHMT jsou u BHMT-2 konzervované. Stejně tak tři cysteiny vázající atom zinku jsou analogické².

Vzhledem k značné nestabilitě BHMT-2 se dle dosavadní literatury předpokládá její nutná hetero-oligomerizace, nicméně krystalografické studie a možný efekt hetero-oligomerizace BHMT a BMHT-2 *in vivo* jsou zatím cílem dalších výzkumů.

3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Hlavními cíli této dizertační práce bylo získání aktivních rekombinantních enzymů BHMT a BHMT-2 a studium vlivu inhibice BHMT na proteom a relevantní metabolity jaterních buněk.

Byly navrženy a připraveny nové inhibitory těchto enzymů, které měly pomoci k lepšímu pochopení strukturních požadavků aktivních míst obou enzymů.

U poměrně nově popsaného enzymu BHMT-2 byl primární zájem získat dlouhodobě stabilní a aktivní enzym a získat první silný a hlavně selektivní inhibitor, který by v budoucnu mohl přispět ke studiu fyziologických funkcí BHMT-2, které jsou nám stále neznámé.

Pro sledování vlivu inhibice BHMT na proteom a metabolity buňky bylo záměrem použít již popsaný silný a selektivní inhibitor CBHcy na buněčnou linii HepG2, což je vyvinutý model lidských hepatocytů, a také na samotné lidské primární hepatocyty.

Během řešení úkolů dizertační práce vyplynul i poslední cíl, a to studium regulace BHMT aktivity draselnými ionty.

Konkrétní cíle práce tedy byly následovné:

- Zavedení reprodukovatelné přípravy aktivních rekombinantních enzymů BHMT a BHMT-2 do naší laboratoře.
- Testování schopnosti inhibice nově připravených látek vůči rekombinantním enzymům BHMT a BHMT-2, u nejsilnějších inhibitorů charakterizování jejich inhibice hodnotami IC_{50} a K_i^{app} .
- Zkoumání vlivu inhibice BHMT a simulované hyperhomocysteinemie pomocí buněčných linií HepG2, ^{BHMT}HepG2 (HepG2 buněčná linie s transfekovaným genem pro BHMT) a lidských primárních hepatocytů s použitím proteomických a metabolomických studií. Cílem zájmu byly jak intracelulární proteiny, tak sekretované proteiny.
- Studium vlivu iontů alkalických kovů a amonných iontů na aktivitu a substrátovou specifitu BHMT.

4. MATERIÁL A METODY

Chemikálie, materiál a metody použité k vypracování této dizertační práce jsou detailně popsány v příslušných publikacích (přílohy č. 1-6). V následujících kapitolách jsou pro přehlednost dizertační práce metody stručně popsány.

4.1 *Expese a purifikace proteinů*

4.1.1 **Betain homocystein S-methyltransferasa**

Gen kódující lidský enzym BHMT byl zaklonován do vektoru pTYB4 jako fúzní protein s chitinovou kotvou (pokusy provedeny v laboratoři Prof. T. A. Garrowa, University of Illinois, Urbana, USA)¹⁸⁷. Enzym BHMT byl exprimován v bakteriálním expresním systému (*E. coli* BL21(DE3)) v 2xYT mediu. Po indukci exprese pomocí 0,3mM IPTG probíhala exprese enzymu přes noc při 20°C a následně purifikace pomocí chitinové afinitní chromatografie. Byla zjištěna výsledná koncentrace enzymu metodou podle Bradfordové¹⁸⁸, čistota enzymu pomocí SDS-PAGE a v některých případech také identita enzymu pomocí MS analýzy tryptických štěpů enzymu.

4.1.2 **Betain homocystein S-methyltransferasa 2**

Gen kódující lidský enzym BHMT-2 byl zaklonován do vektoru pTYB4 jako fúzní protein s chitinovou kotvou (pokusy provedeny v laboratoři Prof. T. A. Garrowa, University of Illinois, Urbana, USA)¹⁸⁷. Enzym BHMT-2 byl exprimován v bakteriálním expresním systému (*E. coli* BL21(DE3)) v 2xYT mediu společně s bakteriálním expresním systémem (*E. coli* BL21(DE3)) nesoucím gen pro BHMT enzym. Po indukci exprese 0,3mM IPTG probíhala exprese obou enzymů najednou přes noc při 20°C. Směs enzymů BHMT-2 a BHMT byla purifikována pomocí chitinové afinitní chromatografie. Byla zjištěna celková výsledná koncentrace enzymů metodou podle Bradfordové¹⁸⁸, čistota enzymů pomocí SDS-PAGE a identita enzymů pomocí MS analýzy tryptických štěpů enzymů. Výsledný přibližný poměr enzymů BHMT-2 a BHMT ve směsi byl určen vyhodnocením SDS-PAGE v programu Quantity One - 4.6.9 (Bio-Rad, USA). Odhad složení heterooligomerů a homooligomerů ve směsi purifikovaných enzymů BHMT a BHMT-2 byl proveden na základě výsledků nativní elektroforézy.

4.1.3 Mutantní formy enzymu betain-homocystein S-methyltransferasy

Mutanty enzymu BHMT (bodové mutace v pozicích 26,27,28 a 159) byly připraveny ve spolupracující laboratoři ve skupině Prof. T. A. Garrowa (University of Illinois, Urbana, USA). Exprese, purifikace, výsledné koncentrace, stanovení čistoty i identity jednotlivých mutantů BHMT enzymu pomocí MS analýzy byly prováděny stejně jako pro BHMT.

4.2 Metabolomické studie homocysteinového cyklu

Pro zjištění vlivu simulované hyperhomocysteinemie a inhibice enzymu BHMT byly měřeny koncentrace metabolitů Hcy cyklu, konkrétně methioninu, cysteinu, betainu, Hcy, SAM a SAH. Pro tyto účely byly použity buněčné linie HepG2 (ATCC, USA), tatáž buněčná linie HepG2 se zaklonovaným genem pro BHMT, zde označovaná jako ^{BHMT}HepG2, a primární kultury lidských hepatocytů.

Buněčná linie ^{BHMT}HepG2 byla získána od Dr. Cheng Ji (University of Southern Kalifornia, Los Angeles, USA). Primární kultury lidských hepatocytů byly zakoupeny od firmy Biopredic (Francie).

4.2.1 Extrakce proteinů z buněčných linií

Buňky linií HepG2 a ^{BHMT}HepG2 byly pěstovány v MEM mediu s přidáním fetálním hovězím sérem, L-glutaminem, penicilinem a streptomycinem při 5% CO₂ a 37°C. Následně byl do media přidán 0,1mM DL-homocystein, 2mM DL-homocystein a/nebo 0,1mM CBHcy na 4, 24 nebo 72 hodin. Lýze buněk určených k metabolomické studii a určení aktivity BHMT enzymu probíhala sonikací v 90% methanolu s 0,03% TFA a 1mM DTT. Pro zjištění celkové koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové byly buňky lyzovány v 7M močovíně, 2M thiomočovíně, 4% CHAPS, 65mM DTT a 40mM Tris.

4.2.2 Extrakce proteinů z primárních kultur

Lidské hepatocyty byly pěstovány v William's E Glutamax™ mediu s přidáním penicilinem, streptomycinem, hovězím inzulinem a hemisukcinátem hydrokortisonu při 5% CO₂ a 37°C. Následně byl do media přidán 0,1mM DL-homocystein nebo 2mM DL-homocystein nebo 0,1mM CBHcy na 48 hodin.

Lýze buněk určených k metabolomické studii a určení aktivity BHMT enzymu probíhala sonikací v 90% methanolu s 0,03% TFA a 1mM DTT. Lýze buněk určených k proteomické studii a určení celkové koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové

probíhala v 7M močovně, 2M thiomčovně, 4% CHAPS, 65mM DTT, 2% amfolytech (pH 4-7) a 40mM Tris.

Pro proteomické studie sekretovaných proteinů bylo po 24 hodinách (celkem dvakrát) sbíráno inkubační medium, ve kterém byly proteiny vysráženy ACN a resuspendovány v rehydratačním pufru (7M močovina, 2M thiomčovina, 4% CHAPS, 50mM DTT, 0,8% amfolyty (pH 3-10)). Práce s primárními kulturami prováděla RNDr. I. Selicharová, CSc. (UOCHB AV ČR, v.v.i.).

4.2.3 Stanovení koncentrace metabolitů homocysteinového cyklu

Lyzované proteiny z buněčných linií a primárních kultur byly podrobeny LC-MS/MS analýze. Separace vzorků probíhala na koloně C₁₈ s reverzní fází. Stanovení koncentrace metabolitů methioninu, cysteinu, betainu, Hcy, SAM a SAH byla prováděna Dr. M. Kořínkem, Dr. V. Šístkem a Dr. P. Mikešem (Apigenex s.r.o., ČR).

4.3 Stanovení enzymových aktivit

4.3.1 Stanovení aktivity betain-homocystein S-methyltransferasy

Aktivita purifikovaného rekombinantního lidského enzymu BHMT a jeho mutantů byla standardně měřena 30 či 60 minut při 37°C v reakční směsi (0,5 ml) obsahující DL-homocystein, betain a N-¹⁴C-methyl-betain, popřípadě S-methyl-L-methionin a S-[methyl-¹⁴C]methyl-L-methionin (tento byl připraven Doc. RNDr. T. Elbertem, CSc., UOCHB AV ČR, v.v.i., ČR), β-merkapt ethanol, enzym a 50mM K-fosfátový pufr (pH 7,5) nebo Tris-HCl pufr (pH 7,5). Přesné složení reakční směsi se lišilo dle potřeb měření a je detailně popsáno v jednotlivých publikacích, které jsou součástí této práce (příloha č. 1-6). Účinek inhibitorů byl testován při jejich 20μM, popřípadě 1 μM koncentraci.

Aktivita enzymu BHMT měřená v buněčných lyzátech probíhala 24 hodin při 37°C v reakční směsi (1 ml) obsahující 1mM DL-homocystein, 2mM betain (0,2μCi), 10% β-merkapt ethanol, 5.10⁶ lyzovaných buněk a 50mM K-fosfátový pufr (pH 7,5).

Produkty enzymové reakce byly separovány ionexovou chromatografií a následně bylo měřeno beta záření úměrné přenosu ¹⁴C-methylové skupiny z betainu na DL-homocystein.

4.3.2 Stanovení aktivity betain-homocystein S-methyltransferasy 2

Aktivita purifikovaného rekombinantního lidského enzymu BHMT-2 byla standardně měřena 60 minut při 37°C v reakční směsi (0,2 ml) obsahující 2,5mM DL-homocystein,

0,25mM *S*-methyl-L-methionin (0,3 μ Ci), 0,2mM chlorid zinečnatý, 0,1% β -merkaptoethanol, 0,2-1 μ M enzymy (BHMT s BHMT-2) a 50mM Tris-HCl pufr (pH 7,5).

Účinek inhibitorů byl testován při jejich 20 μ M koncentraci. Při měření hodnoty K_i^{app} byla fixní koncentrace *S*-methyl-L-methioninu (0,25mM; 0,3 μ Ci), koncentrace DL-homocysteinu se pohybovala v rozmezí 75-250 μ M a inhibitoru 0-300nM.

Produkty enzymové reakce byly separovány ionexovou chromatografií a následně bylo měřeno beta záření úměrné přenosu 14 C-methylové skupiny z *S*-methyl-L-methioninu na DL-homocystein.

4.4 Syntéza inhibitorů enzymů betain-homocystein *S*-methyltransferasy a betain-homocystein *S*-methyltransferasy 2

Nové látky, jakožto možné inhibitory enzymů BHMT a BHMT-2, byly navrženy a syntetizovány Ing. J. Píchou, Ph.D. a Mgr. V. Vaňkem, Ph.D. (UOCHB AV ČR, v.v.i.). Čistota finálních látek byla ověřena elementární analýzou (P, C, H, N, S, F) a RP-HPLC, jejich struktura byla ověřena metodami NMR (1 H, 13 C), HRMS a IR. Analýzy byly provedeny v laboratořích skupiny Mgr. S. Matějkové, Doc. RNDr. J. Cvačky, Ph.D., Mgr. L. Bednárové, Ph.D. nebo RNDr. M. Buděšínským, CSc.

4.5 Proteomické studie

Byly připraveny 2DE analytické a preparativní gely z proteinů z buněčného lyzátu a sekretovaných proteinů. Analytické gely byly analyzovány v programu PDQuest Advanced 8.0.1 2D Gel Analysis Software (Bio-Rad). Preparativní gely byly použity k určení vybraných proteinů, a to štěpením proteinů trypsinem a následnou nano-LC-MS/MS analýzou. Práce na nano-LC-MS/MS a vyhodnocování dat prováděla Mgr. Z. Demianová, Ph.D. (UOCHB AV ČR, v.v.i.).

Metodou „Western blotting“ byly ověřeny změny v expresi proteinů nalezených pomocí analytických 2DE gelů. Použity byly 1DE i 2DE gely, ze kterých byly proteiny přeneseny na PVDF membránu. Navázání primární protilátky proti BHMT, CBS, aktinu, OAT, cytokeratinu 8 a 18, Fib- γ , nukleofosminu, GNMT, Apo A1, PEPCK1 a SAHH bylo detekováno pomocí sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou s využitím substrátu SuperSignal West Femto maximum sensitivity (Pierce). Pro vyhodnocení byl

použit program ChemiDoc MP Imaging Systém (Bio-Rad). Metodu „Western blotting“ a vyhodnocování dat prováděla Mgr. I. Selicharová, Dr. (UOCHB AV ČR, v.v.i.).

4.6 Molekulové modelování

Molekulárně-dynamické studie byly provedeny Mgr. Janou Paterovou (UOCHB AV ČR, v.v.i.). Pro modelování byla použita struktura potkaní BHMT označená PDB kódem 1UMY¹²³ a struktura lidské BHMT s navázaným inhibítozem CBHcy (PDB kód 1LT8)³ se simulovanými okolními podmínkami totožnými s experimentálními. Analýza dat probíhala na základě výpočtů hustoty výskytu iontů v prostoru kolem aktivního místa enzymu.

4.7 Krystalografie

Enzym BHMT s L-Hcy krystalizoval při 4°C smícháním 2 μ l 11 mg/ml BHMT v 50mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM TCEP, 20mM L-Hcy, 2 μ l 20% PEG 5000 MME a 0,4 μ l 15% 1,2,3-heptantriolu. Pro hrubý model struktury byla použita PDB struktura lidské BHMT označená 1LT8³.

Krystalizace BHMT enzymu, analýza krystalů rentgenovou difrakcí a vyhodnocení výsledků byly provedeny v laboratoři Dr. Markose Koutmose, PhD., Uniformed Services University of the Health Science, Maryland, USA.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

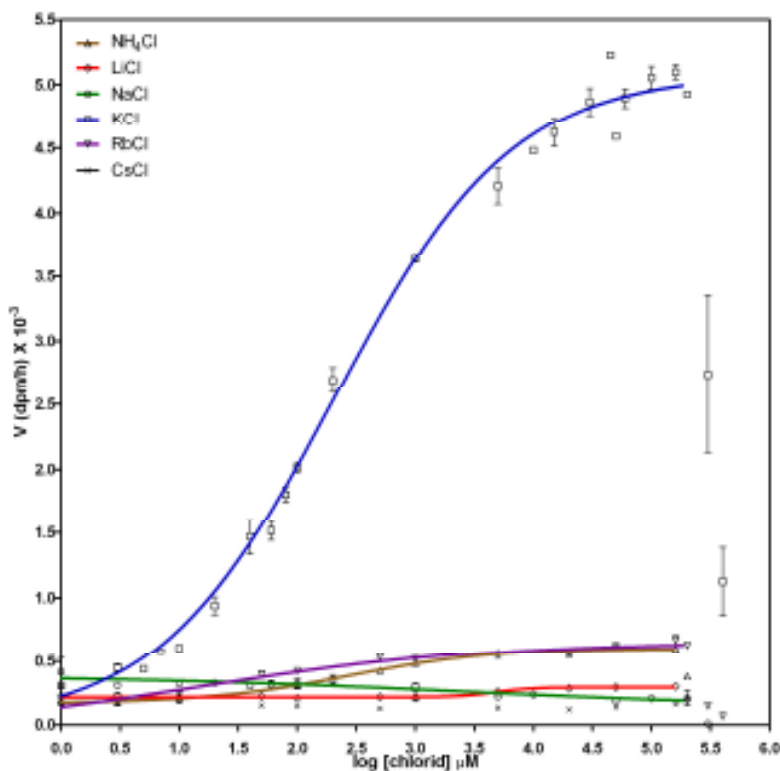
V první části (kapitola 5.1) této práce jsou uvedeny studie zabývající se vlivem alkalických kovů, obzvláště draslíku, na katalytickou schopnost enzymu BHMT a jeho substrátovou specifitu. V další části (kapitoly 5.2 a 5.3) jsou experimenty zaměřené na vývoj a testování nových inhibitorů BHMT enzymu. Třetí část (kapitoly 5.4 a 5.5) se zabývá testy Hcy cyklu v buněčných liniích a primárních kulturách. A konečně poslední částí této práce (kapitola 5.6) jsou studie optimalizace purifikace a stabilizace BHMT-2 enzymu a vývoj jeho prvních inhibitorů.

5.1 Regulace katalytické aktivity a změny substrátové specifity betain-homocystein S-methyltransferasy způsobené draselnými ionty – příloha č. 1

Manuskript připravený k odeslání do časopisu Journal of Biological Chemistry (viz příloha č. 1): Mládková, J.; Paterová, J.; Diamond, C. E.; Tryon, K.; Jungwirth, P.; Koutmos, M.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. Structural Role of Potassium Ions in the Catalytic Activity of Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase.

Výsledky, které jsme získali v průběhu výzkumu enzymů BHMT a BHMT-2 (viz dále příloha č. 6) dokazují, že BHMT nekatalyzuje přenos methylové skupiny ze SMM na Hcy v prostředí 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) bez draselných iontů. Szegedi at al.² naopak publikovali výsledky dokazující, že BHMT je v přítomnosti SMM a Hcy katalyticky aktivní, i když desetkrát méně než v přítomnosti betainu a Hcy. Cílem této práce bylo prozkoumat vliv iontů alkalických kovů a amonných iontů na aktivitu a substrátovou specifitu BHMT. Studie proběhly na úrovni biochemických experimentů, ale též molekulárně-dynamických modelací a krystalografie.

Mezi testovanými kationty zvyšovaly aktivitu BHMT (se substráty betainem a Hcy) nejvíce draselné ionty, a to přibližně desetkrát při 150-200mM koncentraci KCl (EC₅₀ pro K⁺ je 100μM). Rubidné a amonné kationty stimulovaly aktivitu BHMT maximálně dvojnásobně ve srovnání s aktivitou bez přítomnosti monovaletních kationtů (viz obrázek 8).



Obrázek 8: Vliv iontů alkalických kovů a amonných iontů na aktivitu BHMT se substráty betainem a Hcy.

Stanovili jsme hodnoty zdánlivých K_m pro oba substráty BHMT za přítomnosti 150mM K^+ (K_m pro betain je asi 60 μM a pro DL-Hcy je 15 μM) i bez přítomnosti K^+ (K_m pro betain je 75 μM a pro DL-Hcy je 338 μM). Fakt, že katalýza BHMT probíhá tzv. bi-bi mechanismem⁴, kdy jako první do reakce vstupuje Hcy a až následně je možné navázání druhého substrátu, naše výsledky objasňuje. Draselné ionty zvyšují afinitu BHMT obzvláště k Hcy, jakožto prvnímu substrátu, který pozmění konformaci aktivního místa enzymu. Tuto teorii potvrdila i krystalová struktura BHMT s navázanými L-Hcy a draselnými ionty (viz dále). Betain, který se váže až jako druhý substrát, se zdá být na draselných iontech nezávislý. Afinity k oběma substrátům byly v literatuře již několikrát popsány a liší se nejen v závislosti na původu enzymu, ale také na experimentálních podmínkách. Rozdíly v těchto hodnotách byly způsobeny, mimo jiné, právě použitím různých koncentrací draselných iontů, které ovlivnily aktivitu BHMT.

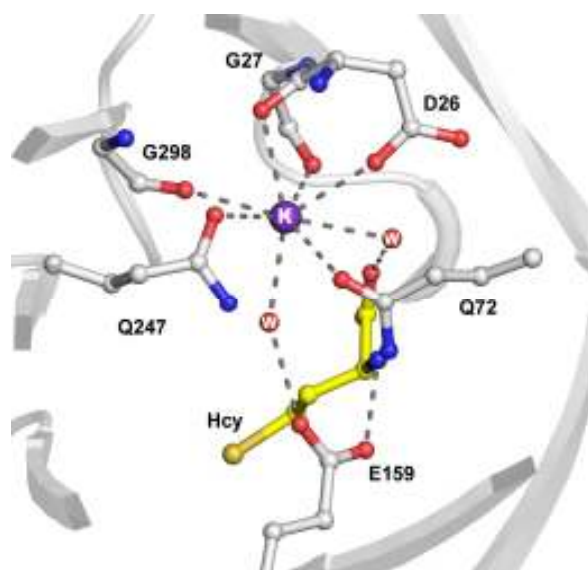
Dále jsme potvrdili, že v prostředí 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) bez K^+ iontů BHMT nekatalyzuje přeměnu SMM a Hcy. V přítomnosti draselných iontů ale BHMT mění svou substrátovou specifitu a přenáší methylovou skupinu ze SMM na Hcy za vzniku methioninu. I zde jsme stanovili zdánlivé K_m pro substráty za přítomnosti 150mM K^+ (K_m pro SMM je

přibližně 3,4mM a pro DL-Hcy je přibližně 2,3mM), i když tyto hodnoty jsou pouze přibližné vzhledem k faktu, že nebylo možné dosáhnout maximálních rychlostí reakce. Vzhledem k intracelulární koncentraci draselných iontů v buňce (~160mM) je zřejmé, že za fyziologických podmínek je BHMT schopná přenášet methylovou skupinu jak z betainu, tak z SMM. Koncentrace SMM v buňce sice zatím není známa, ale pravděpodobně bude záviset na množství SMM přijímaného v potravě a dá se očekávat, že nepřevyší koncentraci betainu². Nicméně afinita BHMT k SMM je tak malá, že pravděpodobnost této katalýzy *in vivo* je podle nás minimální.

Pomocí molekulárního modelování jsme se snažili odhadnout vazebné místo draselného, ale i rubidného či sodného kationtu či kationtů v blízkosti aktivního místa BHMT. Mapa s hustotou výskytu iontů prozradila distribuci těchto iontů v enzymu a místa, kde se vyskytují s nejvyšší pravděpodobností. Předpovězena tak byla dvě klíčová vazebná místa pro draselné ionty; první vazebné místo K⁺ je mezi karboxylovými skupinami Asp26 a Glu159 v aktivním místě volného enzymu a druhé vazebné místo K⁺ v enzymu s vázaným CBHcy je pouze u Asp26. V tomto druhém případě K⁺ interaguje přímo s CBHcy a přes molekulu vody i s Glu159. Na základě těchto výsledků byly navrženy bodové mutace BHMT enzymu, a to Asp26Ala, Glu159Ala, Glu159Gln, Glu159Asp, ale také Gly27Ser a Gly28Ser, které v BHMT tvoří konzervovanou katalytickou triádu Asp26-Gly27-Gly28.

Nejaktivnější mutant BHMT byl Gly28Ser s 81% aktivity vzhledem k nativní BHMT, ostatní Gly28 a Gly27 mutanty byly aktivní maximálně z 8%. Zajímavé jsou výsledky všech mutantů v pozici Glu159. Výtěžky purifikací těchto mutantů jsou, pokud vůbec nějaké, mizivé a aktivita nulová. Zdá se tedy, že Glu159, kromě své účasti při vazbě Hcy³, hraje také roli při produkci BHMT.

Aby byla dále osvětlena úloha draselných iontů v enzymu BHMT, kolegové ve spojených státech vyřešili krystalovou strukturu tetrametru BHMT s navázanými draselnými ionty a zároveň s vázaným substrátem L-Hcy (viz obrázek 9). Z map elektronových hustot je zřejmá vazba draselného iontu u každého aktivního místa monomeru BHMT. Draselný kationt je stabilizován řadou vazeb, z nichž klíčovou hraje právě Asp26 a i vazba K⁺, která je zprostředkována přes molekulu vody přímo s L-Hcy a také přes další molekulu vody s Glu159. Interakce draselného iontu s L-Hcy objasňuje výraznou pozitivní změnu afinity Hcy k BHMT. Vazba draselných iontů na BHMT tedy vede k lokálnímu uspořádání a stabilizaci aktivního místa enzymu, která se zdá být optimálnější pro vazbu substrátů a tak i pro kinetické vlastnosti a také substrátovou specifitu enzymu. Krystalová struktura enzymu tak potvrdila model předpovězený pomocí molekulární dynamiky a simulací.



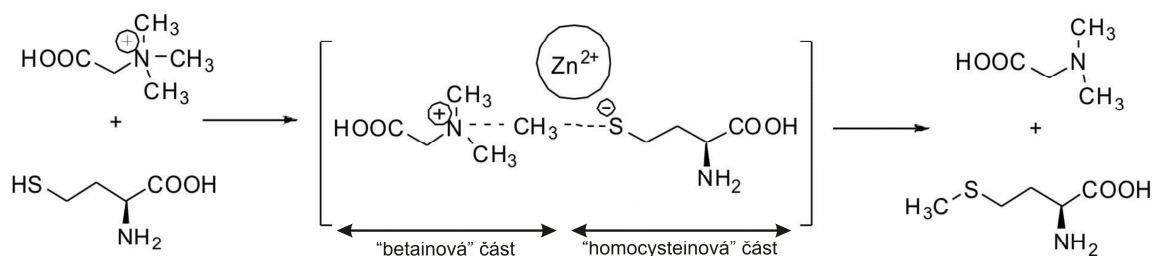
Obrázek 9: Prostorová struktura části aktivního místa BHMT enzymu s vázaným iontem draslíku (fialově), L-Hcy (žlutě) a aminokyselinami, které se účastní vazby s iontem draslíku.

Podíl dizertantky na této publikaci asi 70%: purifikace a exprese enzymu BHMT a jeho mutantních forem, měření enzymových kinetik, vyhodnocení experimentálních dat, podíl na sepsání a revizi publikace.

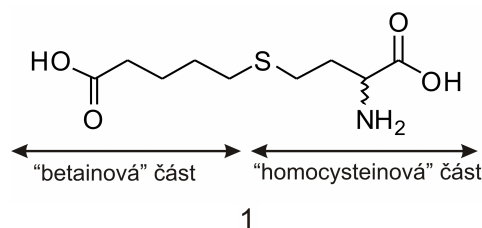
5.2. Strukturně-aktivitní studie nových inhibitorů betain-homocystein S-methyltransferasy – příloha č. 2

Výsledky byly publikovány v časopise *Journal of Medicinal Chemistry* (viz příloha č. 2): Vaněk, V.; Buděšínský, M.; Kabeleová, P.; Šanda, M.; Kožíšek, M.; Hančlová, I.; Mládková, L.; Brynda, J.; Rosenberg, I.; Koutmos, M.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. Structure-Activity Study of New Inhibitors of Human Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 3652-3665.

Tato práce byla zaměřena na navržení, syntézu a následné testování látek určených k inhibici BHMT enzymu. Cílem bylo lepší pochopení strukturních vlastností aktivního místa enzymu. Vyvinuty byly dvě série látek, které a) testovaly vliv pozice a počtu atomů síry v molekule inhibitoru, popřípadě jejich záměnu za jiné heteroatomy, a b) napodobovaly hypotetický tranzitní stav reakce katalyzované BHMT se substráty L-Hcy a betainem (viz obrázek 10). Syntetizovány byly S-alkylované deriváty Hcy se záměnami v „betainové“ části molekuly. Výchozí strukturou pro návrhy a přípravu nových látek byl již dříve publikovaný inhibitor¹⁶² CBHcy, látka **1** (obrázek 11).



Obrázek 10: Reakce katalyzovaná BHMT, kdy dochází k přenosu methylové skupiny z betainu na L-Hcy za vzniku DMG a L-methioninu. V závorce je znázorněn hypotetický tranzitní stav.

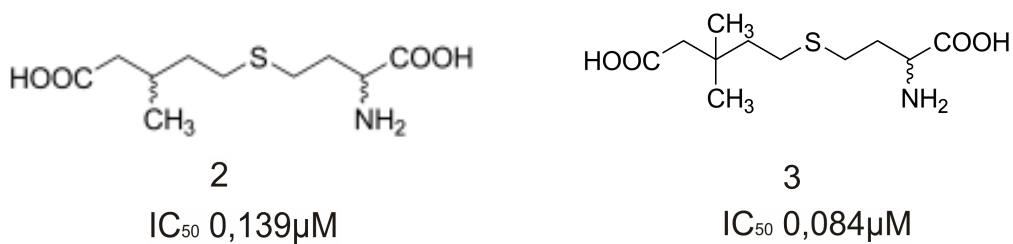


Obrázek 11: Specifický inhibitor BHMT, S-(4-karboxybutyl)-DL-homocystein (CBHcy) .

Inhibiční vlastnosti veškerých nově syntetizovaných látek byly testovány při jejich 20 μ M koncentraci. Nejúčinnější z inhibitorů byly následně testovány při 1 μ M koncentraci a určena byla také jejich hodnota IC₅₀ vůči BHMT. Porovnáním získaných dat s novými inhibitory a také s inhibitory vyvinutými již dříve nejen v naší laboratoři^{7, 162} bylo zjištěno, že pozice atomu síry v molekule inhibitoru je nezbytná a vysoce specifická a odpovídá poloze atomu síry v „homocysteinové“ části molekuly. Navíc bylo v roce 2002 prokázáno³, že atom síry v této pozici přímo interaguje s atomem zinku, který je nepostradatelný pro katalytickou aktivitu BHMT. V této práci bylo zjištěno, že připravené látky, které odpovídají hypotetickému tranzitnímu stavu substrátů, BHMT neinhibují. Překvapivě ani sekundární, terciální či kvartérní aminy v molekule inhibitoru napodobující strukturu hypotetického tranzitního stavu v „betainové“ části molekuly nevykazovaly vysoké inhibiční vlastnosti, pravděpodobně vlivem kladného náboje na atomu dusíku. Důvody prozatím nejsou zcela jasné a jsou předmětem dalšího studia.

Nejsilnějšími inhibitory se ukázaly být látky s jednou (2) či dvěma (3) methylovými skupinami na místě již zmíněného aminu (viz obrázek 12). Jejich IC₅₀ hodnoty jsou srovnatelné (2), či dokonce lepší (3) než hodnoty do té doby nejsilnějšího publikovaného inhibitoru BHMT, CBHcy (1). Vzhledem k tomu, že jejich struktura neodpovídá hypotetickému tranzitnímu stavu, lze usuzovat, že se váží jiným způsobem než BHMT substráty. Na základě faktu, že katalýza BHMT probíhá tzv. bi-bi mechanismem⁴, kdy jako první do reakce vstupuje Hcy, který pozmění konformaci enzymu, a následně je možné navázání druhého substrátu - betainu, byla navržena hypotéza několika konformačních stavů během katalytické reakce BHMT. Velmi nízké číslo přeměny BHMT enzymu tuto teorii ještě více podporuje. Nejúčinnější inhibitory této studie tak neinteragují s BHMT jako substráty, nýbrž nejspíše interagují s BHMT v konformaci, která odpovídá již vázaným produktům, tzv. „bi-product analogues“. Mechanismus interakce je ale podobný. Nejprve se

do aktivního místa naváže „homocysteinová“ část molekuly, následně dojde ke změně konformace a navázání druhé části inhibitoru.



Obrázek 12: Nejúspěšnější inhibitory této studie: S-alkylované deriváty Hcy.

Podíl dizertantky na této publikaci asi 10%: inhibiční experimenty.

5.3 Vývoj nové skupiny inhibitorů betain-homocystein S-methyltransferasy – příloha č. 3

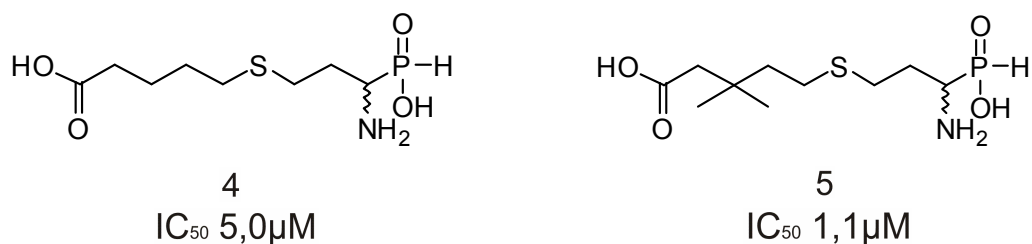
Výsledky byly publikovány v časopise *European Journal of Medicinal Chemistry* (viz příloha č. 3): Pícha, J.; Vaněk, V.; Buděšínský, M.; Mládková, J.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. The Development of a New Class of Inhibitors for Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 65, 256-275.

V této publikaci jsme se dále a detailněji zabývali studiem mechanismu vazby ligandů do aktivního místa enzymu BHMT, tentokrát pomocí látek modifikovaných v „homocysteinové“ části jejich molekuly. Opět jsme vycházeli ze struktury dříve publikovaného inhibitoru CBHcy, **1** (viz obrázek 11). Nově syntetizované látky se lišily záměnou karboxylové skupiny za různé bioisosterické skupiny (např. tetrazol, oxadiazolon). Záměnou karboxylové skupiny za karboxamid byl v dané části molekuly také potlačen negativní náboj, záměnou za fosfonovou či fosfinovou kyselinou byla zvýšena kyselost a polarita dané látky a vyvinuty byly také látky s pyrolidinovým motivem. Schopnost daných látek inhibovat enzym BHMT byla opět testována při jejich 20 μ M koncentraci a u nejúčinnějších látek byly určeny hodnoty IC₅₀.

Ukázalo se, že žádný připravený amid není vhodným inhibitorem BHMT, a tedy že záporný náboj karboxylové skupiny „homocysteinové“ části molekuly je pro rozpoznání ligandu důležitý. I přes to byla v této řadě amidických látek zjištěna vyšší inhibice BHMT u polárnějších látek. Dobré inhibiční vlastnosti nevykazovaly ani látky se substituovanou tetrazolovou skupinou, která je oproti karboxylové skupině lipofilnější, ale má stejnou aciditu, a je tedy považována za výhodnou obměnu karboxylové skupiny. Důvodem neúspěchu mohou v tomto případě být sterické zábrany, stejně jako u neúspěšné inhibice BHMT látkami s pyrolidinovým motivem či kyselinou fosfonovou. Nejúspěšnějšími inhibitory této studie byly látky se substituovanou kyselinou fosfinovou (viz obrázek 13). Inhibice byla ještě zesílena přidáním dvou methylových skupin v „betainové“ části molekuly (obrázek 13, látka **5**) tak, jak bylo úspěšně pozorováno v předcházející studii předložené v této práci jako příloha č. 2.

Přestože bylo v této práci připraveno dalších 13 nových inhibitorů BHMT, nejúčinnější z nich byl přibližně desetkrát slabší než dříve popsán inhibitor CBHcy (**1**). Studie nicméně pomohla definovat neobyčejnou selektivitu BHMT vůči Hcy. Některé z nových látek, ačkoli

nejsou nejúčinnějšími inhibitory BHMT, mohou být použity pro *in vivo* testy vzhledem k jejich předpokládané biologické snášenlivosti.



Obrázek 13: Nejúspěšnější inhibitory této studie: S-alkylovaný derivát Hcy se substituovanou kyselinou fosfinovou (4) a S-alkylovaný derivát Hcy se substituovanou kyselinou fosfinovou a dvěma methylovými skupinami v „betainové“ části molekuly (5).

Podíl dizertantky na této publikaci asi 30%: inhibiční experimenty, podíl na revizi a opravě publikace.

Obě předešlé prezentované práce (příloha č. 2 a 3) pomohly osvětlit a kompletně definovat strukturní požadavky aktivního místa BHMT na vázající se ligand, a to pomocí 30 nově syntetizovaných látek testovaných jako inhibitory BHMT. Nejsilnější inhibitory těchto studií mohou být použity k dalším farmakologickým experimentům pro studium funkce enzymu BHMT *in vivo*.

5.4 Kvantifikace metabolitů homocysteinového cyklu a role betain-homocystein S-methyltransferasy v buňkách HepG2 – příloha č. 4

Výsledky byly publikovány v časopise *Biomedical Chromatography* (viz příloha č. 4): Kořínek, M.; Šístek, V.; Mládková, J.; Mikeš, P.; Jiráček, J.; Selicharová, I. Quantification of homocysteine-related metabolites and the role of betaine-homocysteine S-methyltransferase in HepG2 cells. *Biomedical Chromatography* **2013**, *27*, 111-121.

Cíle našich experimentů v rámci této publikace byly zaměřené na studium vnitrobuněčných koncentrací klíčových metabolitů Hcy cyklu, a to konkrétně Hcy, methioninu, cysteinu, SAM, SAH a betainu v buněčných liniích HepG2 a ^{BHMT}HepG2 (buněčná linie HepG2 se zaklonovaným genem pro BHMT). Změny koncentrací těchto látek byly ovlivněny inhibicí BHMT nebo simulací hyperhomocysteinemie pomocí přidaného Hcy. Za tímto účelem jsme optimalizovali a validovali rychlou a citlivou LC-MS/MS metodu pro souběžné analyzování polárních látek s limitem detekce v nanomolárních koncentracích.

Kritickým krokem pro přesné určení koncentrace metabolitů v buňkách se ukázalo být rychlé zpracování a následně okamžité zamražení buněk kapalným dusíkem kvůli zastavení metabolické aktivity. Již při ponechání buněk při laboratorní teplotě pouhých 15 minut jsme pozorovali změny v koncentracích metabolitů, které se pohybovaly mezi 20 a 300 %.

Mezi liniemi HepG2 a ^{BHMT}HepG2 jsme rozdílly ve vnitrobuněčných koncentracích sledovaných metabolitů nezaznamenali. Pro obě buněčné linie tedy platí následující výsledky. **0,1mM Hcy** přidaný do média se projevil pouze a jen v prvních hodinách nárůstem koncentrací Hcy, SAH a o něco méně i cysteinu. Jejich koncentrace se ale během 24 hodin vrátily k normálním hodnotám odpovídajícím kontrole. Tímto je zřejmé rychlé vypořádání se buněk s mírně narušeným Hcy cyklem. Buňky rostoucí v médiu s **2mM Hcy** vykazovaly obzvlášť velký nárůst intracelulárních koncentrací Hcy a SAH, které s časem sice měly sestupnou tendenci, během 72 hodin ale na původní koncentraci nepoklesly. Méně také vzrostla množství cysteinu a methioninu, která se ovšem během 24 hodin vrátila k počátečním hodnotám. Od začátku sestupnou tendenci měl v tomto experimentu pouze betain. Ten slouží jako druhý substrát reakce katalyzované BHMT. Vzhledem k tomu, že dosud není znám žádný jiný enzym, který by metabolizoval betain⁴³, jeho úbytek značí potřebu buňky metabolizovat velký nadbytek Hcy také pomocí BHMT. U obou buněčných

linií byl zaznamenán pokles poměru SAM:SAH, tzv. „methylačního indexu“, který udává pravděpodobnost methylace.

V buňkách rostoucích v médiu s **0,1mM CBHcy** neměl inhibitor BHMT na koncentraci metabolitů žádný vliv, a to ačkoli vliv tohoto inhibitoru v *in vivo* studiích na myších¹⁵³ či kryších⁴³ vedl k hyperhomocysteinemii. Zřejmá byla jen úplná inhibice aktivity BHMT v obou buněčných liniích.

Naopak neočekávané byly výsledky **BHMT aktivit** v buněčných lyzátech obou linií po experimentech s přidáním Hcy. Aktivita BHMT v HepG2 buňkách nebyla nijak ovlivněna přidáním Hcy v médiu, avšak aktivita BHMT v ^{BHMT}HepG2 buňkách se s rostoucí koncentrací Hcy v médiu snižovala. Příčinou tohoto jevu může být buď inhibice BHMT nadměrou SAH v buňce, neboť SAH je účinný inhibitor většiny methyltransferas, anebo potlačení indukce proteinů vlivem stresu způsobeným nadměrou Hcy v buňce, jak ve své studii naznačil Dionisio et al.¹⁹⁰. Jak bylo zmíněno v článku autorů, kteří vyvinuli ^{BHMT}HepG2 buněčnou linii¹¹⁴, vyšší indukce enzymu BHMT by teoreticky mohla chránit buňky před zmíněným Hcy podmíněným stresem. Výsledky získané naší studií tuto hypotézu bohužel nepotvrdily.

Ačkoli HepG2 buněčná linie slouží jako model pro metabolismus lidských jaterních buněk, metabolismus Hcy je v této buněčné linii pozměněn tak, jak tomu bývá u karcinomu jater. Kupříkladu enzymy SAM synthasa (isoforma I), CBS, N-methyltransferasa a také BHMT v HepG2 buňkách chybí nebo je jejich exprese výrazně potlačena^{114, 191, 192}. Proto byla použita ^{BHMT}HepG2 buněčná linie, která má, podle našich měření, desetkrát vyšší aktivitu BHMT oproti HepG2. Rozdíly v koncentracích námi sledovaných metabolitů jsme mezi liniemi ale nezaznamenali. Výjimkou byl betain, který měl zhruba 1,4-krát vyšší koncentraci v HepG2 buňkách než v ^{BHMT}HepG2 buňkách. I přes tento negativní aspekt HepG2 buněčné linie poskytly téměř neomezené množství stálého materiálu, což nám umožnilo optimalizovat LC-MS/MS metodu pro stanovení polárních látek Hcy metabolismu. Právě tato metoda byla dále využita v následující studii (viz příloha č. 5), kde byly pro stanovení metabolitů použity primární kultury lidských jaterních buněk. Použití této metody může být samozřejmě dále rozšířeno o stanovování dalších nízkomolekulárních polárních látek.

Podíl dizertantky na této publikaci asi 30%: kultivace a pokusy s buněčnými liniemi HepG2 a ^{BHMT}HepG2, zpracování buněčných lyzátů a příprava vzorků pro LC-MS/MS, měření aktivit BHMT v buněčných lyzátech, účast na vyhodnocení experimentálních dat.

5.5 Efekt hyperhomocysteinemie a inhibice betain-homocystein S-methyltransferasy na metabolity a proteom hepatocytů - příloha č. 5

Výsledky byly publikovány v časopise *Biochimica et Biophysica Acta - Protein and Proteomics* (viz příloha č. 5): Selicharová, I.; Kořínek, Demianová, Z.; Chrudinová, M.; Mládková, J.; Jiráček, J. Effect of Hyperhomocysteinemia and Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase Inhibition on Hepatocyte Metabolites and the Proteome. *BBA- Proteins and Proteomics* **2013**, 1834, 1596-1606.

V předešlé práci jsme vyvinuli LC-MS/MS metodu pro souběžné analyzování polárních látek Hcy cyklu, kterou jsme v této publikaci taktéž použili pro metabolomické stanovení Hcy, methioninu, cysteinu, SAM, SAH, betainu, a navíc také DMG, cystathioninu a cholinu. Metabolomické studie byly v této práci navíc doplněny proteomickými pro zjištění změn v intracelulárních a sekretovaných proteinech buněk ovlivněných inhibicí BHMT nebo hyperhomocysteinemií simulovanou přidáním Hcy. Abychom lépe osvětlili fyziologickou úlohu BHMT v lidských jaterních buňkách, použili jsme tentokrát primární kultury lidských hepatocytů (od tří dárců s benigním nálezem, jednoho pacienta s metastázemi a jednoho dárce s pro nás neznámou diagnózou) a pro porovnání znovu buněčnou linii HepG2. Primární kultury nám poskytly nezaměnitelný zdroj lidských buněk, jehož množství a životnost jsou ale oproti buněčným liniím velmi omezené.

Aktivita BHMT v primárních hepatocytech je podle našich měření stonásobná oproti HepG2. V hepatocytech rostoucích v médiu s inhibitorem CBHcy byla aktivita BHMT takřka nulová.

Již porovnáním základních koncentrací námi zjišťovaných metabolitů byly patrné rozdíly v koncentraci SAM mezi HepG2 buněčnou linií a primárními hepatocyty (nejvyšší u buněčné linie HepG2 a následně u pacienta s metastázemi). Snížená koncentrace SAM obecně vede k proliferaci. Dodání SAM zdravým buňkám vede k inhibici apoptosy, kdežto rakovinné buňky to k apoptose stimuluje¹.

Přidáním inhibitoru BHMT (CBHcy) nebo 0,1mM Hcy do media byly v metabolomických studiích pozorovány jen malé změny způsobené snahou buněk odstranit nadbytečný Hcy. U buněk ovlivněných **inhibitorem BHMT** byl prokázán pokles hladiny SAM v buňkách. Vliv **0,1mM Hcy** vedl k nárůstu Hcy, SAH a cystathioninu. Podobně **2mM Hcy** v médiu ovlivnil zvýšení koncentrace Hcy, SAH, SAM, DMG a extrémně pak

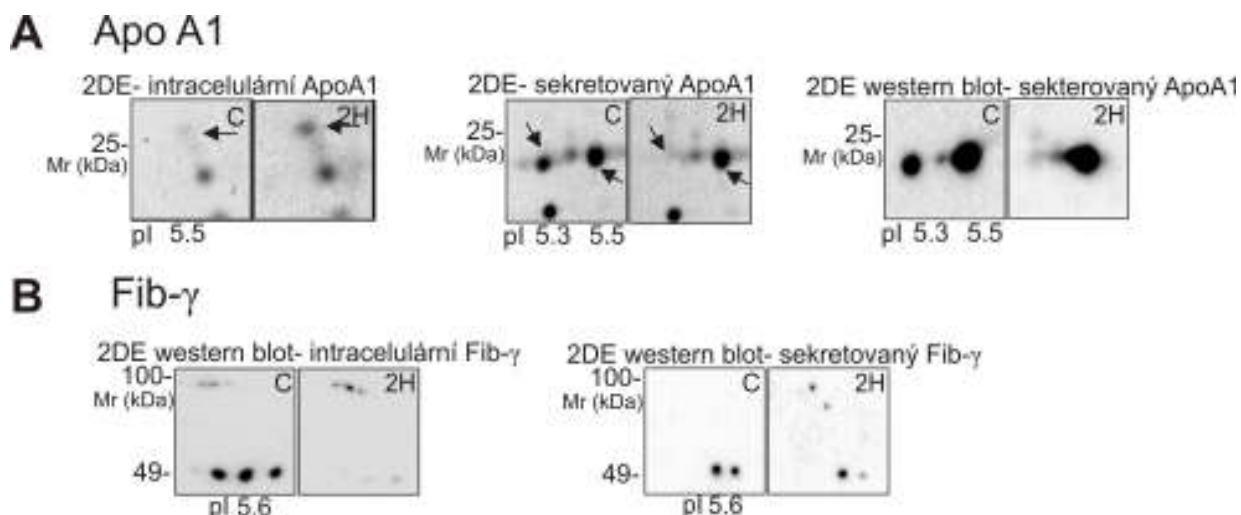
koncentraci cystathioninu a naopak vedl ke snížení koncentrace cysteinu a úplné spotřebě betainu.

Proteomické studie poukázaly na signifikantní změny v expresi intracelulárních a sekretovaných proteinů jen u buněk ovlivněných 2mM Hcy. Tyto změny se týkaly většinou cytozolických enzymů metabolismu cukrů a aminokyselin. Ovlivněna byla také buněčná proliferace, a to proteiny, které zpomalují buněčný růst a syntézu polyaminů. Koncentrace sekretovaných proteinů byla vlivem 2mM Hcy obecně snížena. Nejzajímavější a nejdůležitější změny u buněk ovlivněných 2mM Hcy byly v rozdílech proteinů apolipoproteinu A1 (Apo A1) a fibrinogenu gamma (Fib- γ).

Množství Apo A1 bylo intracelulárně zvýšeno, zatímco v sekretovaných proteinech zcela chyběl a zastoupená zde byla jen forma jeho propeptidu (viz obrázek 14 A). Je tedy možné, že narušením cyklu Hcy docházelo k chybné tvorbě funkčního proteinu Apo A1, což může být důsledek narušeného transportu Apo A1 z tkání. Apo A1 je hlavní složkou HDL a účastní se transportu tuků, včetně cholesterolu, z tkání do jater. Porucha metabolismu cholesterolu byla již u hyperhomocysteinemie popsána¹⁹³.

Také množství Fib- γ bylo jak v médiu tak intracelulárně zvýšeno, a to překvapivě ve formě jeho dimerů, zatímco výskyt intracelulárního monomeru Fib- γ se snížil (viz obrázek 14 B). Dimerizace sekretovaného Fib- γ byla v menší míře zaznamenána také u buněk ovlivněných 0,1mM Hcy a inhibitorem BHMT, CBHcy. Formace dimerů Fib- γ by tedy mohla být považována za potenciální markery časného onemocnění jater.

Výsledky našich prací souhlasí s experimenty prováděnými na myších či krysách a potvrzují, že u onemocnění jater hraje roli stres endoplasmatického retikula, oxidativní stres, a chyby v metabolismu lipidů a aminokyselin.



Obrázek 14: Viditelné změny intracelulárních a sekretovaných proteinů ApoA1 (A) a Fib-γ (B) v kontrolních vzorcích (označené v obrázku C) a buňkách ovlivněných 2mM Hcy (označené v obrázku 2H). Použité byly metody 2DE a „western blotting“ z 2DE gelů.

Podíl dizertantky na této publikaci asi 10%: kultivace a pokusy s buněčnými liniemi HepG2, zpracování buněčných lyzátů a příprava vzorků pro LC-MS/MS, měření aktivit BHMT v buněčných lyzátech, příprava 2DE gelů.

5.6 Optimalizace purifikace rekombinantní betain-homocystein S-methyltransferasy 2 a její první inhibitory – příloha č. 6

Výsledky byly publikovány v časopise *Journal of Medicinal Chemistry* (viz příloha č. 6): Mládková, J.; Vaněk, V.; Buděšínský, M. G.; Elbert, T.; Demianová, Z.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. Double-Headed Sulfur-Linked Amino Acids As First Inhibitors for Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase 2. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 6822-6831.

Naše skupina se již dlouhodobě zabývá studiem enzymu BHMT. Zkušenosti získané během několika let byly nyní využity pro studium poměrně nově objeveného enzymu BHMT-2. Po dlouhou dobu nebylo měření enzymové aktivity BHMT-2 enzymu úspěšné, neboť rekombinantní BHMT-2 se projevila jako velmi nestabilní enzym. Li et al.¹⁶¹ popsali agregaci a rychlou degradaci BHMT-2. Pravděpodobně z tohoto důvodu nebyla až do roku 2008 změřena žádná její katalytická aktivita. Szegedi et al.² poté připravili rekombinantní BHMT-2 stabilizovanou 40% glycerolem, což jim poskytlo dostatek času na základní biochemické charakterizování enzymu (např. K_m^{app} pro SMM).

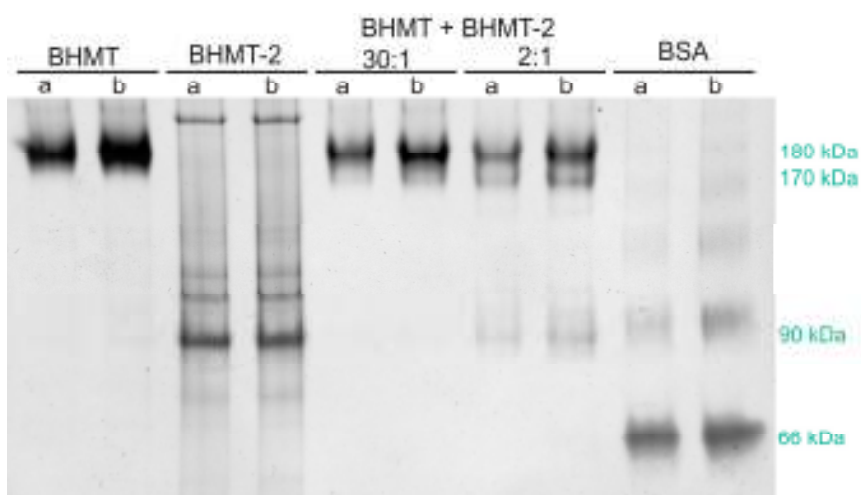
Purifikace BHMT-2 v naší laboratoři nebyla úspěšná ani po snaze stabilizovat BHMT-2 glycerolem či jinými činidly, ani ultrafiltrací. Purifikací byl sice získán čistý enzym, ale s nesignifikantními hodnotami aktivit, které během dvou dnů už nebyly detekovatelné. Vzhledem k velké podobnosti (73% identita) obou enzymů, BHMT a BHMT-2, byla již v předchozích studiích^{161, 170} naznačena jejich možná ko-oligomerizace. Provedli jsme tedy ko-purifikaci enzymů BHMT a BHMT-2. Výsledkem bylo získání dlouhodobě aktivního enzymu BHMT-2 stabilizovaného enzymem BHMT. Je nutné zmínit, že nestačí jen smíchat dva čisté enzymy, BHMT-2 a BHMT. Pro získání aktivní BHMT-2 je nutné purifikovat oba enzymy zároveň ze směsi příslušných transfekovaných bakterií. Získané výsledky naznačují specifickou interakci BHMT a BHMT-2 v buňce.

Porovnáním primárních sekvencí obou enzymů je na C- konci BHMT-2 patrná absence 34 aminokyselin, které jsou u BHMT důležité pro oligomerizaci, resp. dimerizaci dimerů¹²³. Eliminace dimerizační části BHMT vedla v bakteriálním systému (*E. coli*) k rychlé degradaci¹⁷⁰. Další aminokyseliny důležité u BHMT pro dimerizaci či tetramerizaci ovšem BHMT-2 nepostrádá². Je tedy pravděpodobné, že enzym BHMT-2 pouze není schopen tvořit homooligomery, ale může tvořit heterooligomery.

Přestože množství buněk *E. coli* nesoucích gen pro BHMT a pro BHMT-2 v kultivačním mediu bylo stejné, podíl exprimované BHMT byl třicetkrát větší oproti BHMT-2. Nasnadě byl návrh purifikace směsi enzymů v poměru třicetkrát zvýhodňujícím *E. coli* nesoucích gen pro BHMT-2. Výsledkem byla směs BHMT ku BHMT-2 v poměru obsahu proteinů 2:1, přičemž specifická aktivita BHMT-2 se ale nezvýšila (tyto výsledky nejsou součástí publikovaného článku - přílohy č.6).

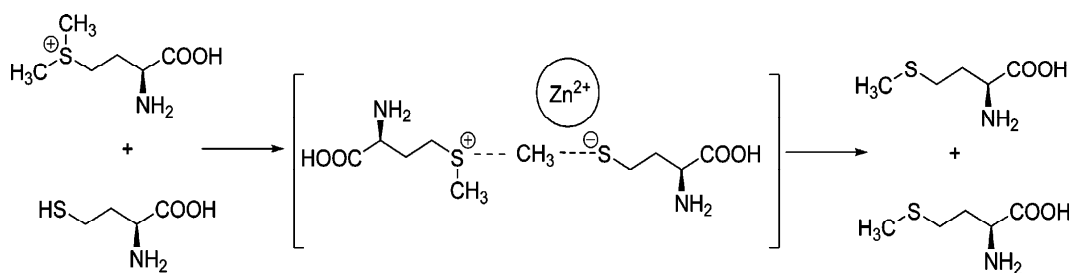
Pomocí nativní elektroforézy jsme se pokusili odhadnout složení heterooligomerů a homooligomerů ve směsi purifikovaných enzymů BHMT a BHMT-2, což bylo nejlépe patrné ze směsi enzymů v poměru 2:1 (viz obrázek 15). Nejintenzivnější pruh na elektroforéze odpovídá 180 kDa, a tedy homotetrameru složeného pouze z monomerů BHMT. Slabší pruh na 170 kDa odpovídá heterotetrameru dvou monomerů BHMT a dvou monomerů BHMT-2 a velmi slabý pruh na zhruba 90 kDa pravděpodobně patří buď heterodimeru BHMT s BHMT-2, nebo homodimeru BHMT či BHMT-2. Zároveň je z gelu patrná neschopnost BHMT-2 tvořit homotetramery (obrázek 15, 3. a 4. jamka zleva), naopak nejintenzivnější pruh se shoduje s molekulovou hmotností homodimeru BHMT-2. Nicméně je zde třeba podotknout, že samotná BHMT-2 ve vzorku již nebyla katalyticky aktivní a s největší pravděpodobností již byla degradovaná¹⁶¹ (tyto výsledky nejsou součástí publikovaného článku - přílohy č.6).

I přes výrazný nadbytek BHMT (30:1) bylo možné pokračovat v dalších studiích enzymu BHMT-2, jelikož za daných podmínek (reakční směs bez draselných iontů; více viz příloha č. 1) enzym BHMT nemetabolizuje SMM a Hcy, a nikterak tedy neovlivňoval výsledky měření. Následovala optimalizace měření aktivity BHMT-2, stanovení K_m^{app} BHMT-2 k DL-Hcy ($107 \pm 10 \mu\text{M}$) a inhibiční studie nově syntetizovaných látek včetně CBHcy. K_m^{app} BHMT-2 k SMM ($\pm 940 \mu\text{M}$) bylo stanoveno již dříve².

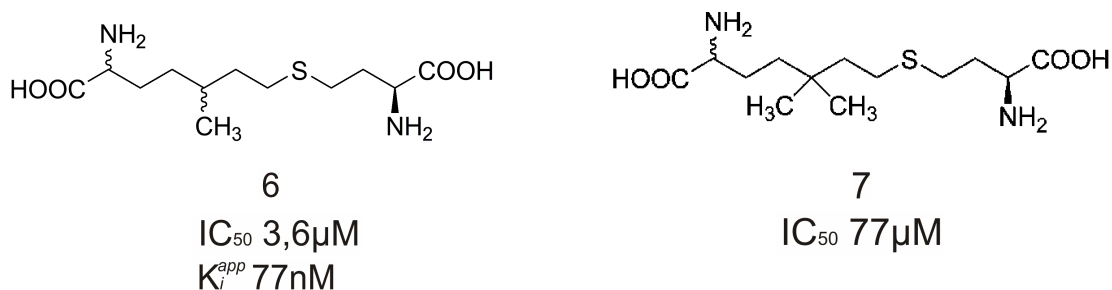


Obrázek 15: Nativní elektroforéza (6% separační gel) BHMT, BHMT-2, směsi BHMT a BHMT-2 v poměru 30:1 a 2:1 a BSA. Vzorky jsou nanášeny vždy ve dvou koncentracích: 0,5 µg (a) a 0,7 µg (b). Na obrázku vpravo jsou v odpovídající pozici označené molekulové hmotnosti.

Při navrhování potenciálních inhibitorů BHMT-2 byly uplatněny poznatky o příbuzném enzymu BHMT, jeho mechanismu katalýzy a struktuře jeho nejsilnějších inhibitorů (viz též příloha č. 2 a 3). Připravena byla série látek (celkem 8) napodobujících hypotetický tranzitní stav substrátů reakce katalyzované BHMT-2 (viz obrázek 16) nebo strukturu spojených produktů. U všech látek byla testována síla inhibice při jejich 20 µM koncentraci jak vůči BHMT-2 tak BHMT. Cílem bylo získat silný, ale zároveň selektivní inhibitor BHMT-2. Vzhledem k podobnosti obou enzymů a zkušenostem s BHMT bylo nejvíce nadějí vkládáno do látek 6 a 7 (viz obrázek 17) napodobujících spíše spojené produkty než tranzitní stav reakce. Obě tyto látky inhibovaly BHMT-2 při 20 µM koncentraci minimálně z 90%, avšak látka 7, na rozdíl od látky 6, relativně dobře inhibovala také BHMT, a není tedy selektivním inhibitorem BHMT-2. Další studie byly prováděny jen na látce 6, u které byla stanovena silná kompetitivní inhibice BHMT-2 s hodnotou K_i^{app} (77 ± 7 nM) k DL-Hcy. Jelikož stále neznáme funkci BHMT-2 *in vivo*, tento inhibitor, do této doby jediný silný a selektivní inhibitor BHMT-2, může být důležitým nástrojem pro jeho další *in vivo* studie. Výsledky prezentované v této publikaci a v publikacích, které jsou součástí této práce jako přílohy č. 2 a 3, signalizují podobnost katalytických mechanismů obou enzymů BHMT a BHMT-2.



Obrázek 16: Reakce katalyzovaná BHMT-2, kdy dochází k přenosu methylové skupiny z SMM na L-Hcy za vzniku L-methioninu. V závorce je znázorněn hypotetický tranzitní stav.



Obrázek 17: Nejúspěšnější inhibitory této studie: S-alkylované deriváty Hcy.

Podíl dizertantky na této publikaci asi 80%: optimalizace purifikace a exprese enzymů BHMT a BHMT-2, optimalizace a měření aktivit BHMT-2, měření aktivit BHMT, inhibiční experimenty, vyhodnocení experimentálních dat, podíl na sepsání a revizi publikace.

6. ZÁVĚR

Předkládaná dizertační práce přináší shrnuté nové cenné poznatky o dvou lidských enzimech BHMT a BHMT-2 účastnících se metabolismu Hcy. Hlavní výsledky této práce lze shrnout do následujících bodů:

- Popsali jsme katalytickou aktivaci BHMT a změnu v její substrátové specifitě způsobenou draselnými ionty. Metodami molekulového modelování, pomocí připravených mutantních forem BHMT a krystalografie jsme také objasnili vazbu draselných iontů v blízkosti aktivního místa BHMT a změnu konformace aktivního místa enzymu po vazbě draselných iontů.
- Navrhli a připravili jsme sérii 30 nových látek pro inhibici BHMT, díky kterým bylo zjištěno, že neúčinnější inhibitory nenapodobují tranzitní stav substrátů enzymu, nýbrž spíše vázané produkty reakce, tzv. bi-product analogs. Prokázána byla velká selektivita BHMT vůči Hcy, a navíc důležitost záporného náboje jeho karboxylové skupiny.
- Mezi těmito novými látkami byl také identifikován dosud nejsilnější inhibitor BHMT (viz obrázek 12, látka 3).
- Pomocí proteomických a metabolomických metod jsme v buněčných liniích HepG2, ^{BHMT}HepG2 a primárních lidských hepatocytech identifikovali proteiny, které jsou ovlivněny narušeným metabolismem Hcy. Nejzásadnější změny se týkaly chybné tvorby funkčního proteinu Apo A1 a dimerizace extracelulárního Fib- γ . Hlavním projevem inhibice BHMT je snížená hladina SAM v buňkách.
- Optimalizovali jsme purifikaci BHMT-2 enzymu a stabilizovali jeho katalytickou aktivitu ko-purifikací s příbuzným enzymem BHMT. Zdá se, že nativní forma BHMT-2 s BHMT tvoří v buňce heterotetramery.
- Navrhli a připravili jsme dosud jediný silný a zároveň selektivní inhibitor BHMT-2, který může být použit při studiu dosud neznámých fyziologických funkcí BHMT-2 (viz obrázek 17, látka 6).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Chadwick, L. H.; McCandless, H. E.; Silverman, G. L.; Schwartz, S.; Westaway, D.; Nadeau, J. H. Betaine-homocysteine methyltransferase-2: cDNA cloning, gene sequence, physical mapping, and expression of the human and mouse genes. *Genomics* **2000**, *70*, 66-73.
2. Szegedi, S. S.; Castro, C. C.; Koutmos, M.; Garrow, T. A. Betaine-homocysteine S-methyltransferase-2 is an S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 8939-8945.
3. Evans, J. C.; Huddler, D. P.; Jiracek, J.; Castro, C.; Millian, N. S.; Garrow, T. A.; Ludwig, M. L. Betaine-homocysteine methyltransferase: Zinc in a distorted barrel. *Structure* **2002**, *10*, 1159-1171.
4. Castro, C.; Gratson, A. A.; Evans, J. C.; Jiracek, J.; Collinsova, M.; Ludwig, M. L.; Garrow, T. A. Dissecting the catalytic mechanism of betaine-homocysteine S-methyltransferase by use of intrinsic tryptophan fluorescence and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5341-5351.
5. Finkelst, J. D.; Harris, B. J.; Kyle, W. E. Methionine metabolism in mammals - kinetic study of betaine-homocysteine methyltransferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1972**, *153*, 320-&.
6. Collinsova, M.; Castro, C.; Garrow, T. A.; Yiotakis, A.; Dive, V.; Jiracek, J. Combining combinatorial chemistry and affinity chromatography: Highly selective inhibitors of human betaine: Homocysteine S-methyltransferase. *Chemistry & Biology* **2003**, *10*, 113-122.
7. Jiracek, J.; Collinsova, M.; Rosenberg, I.; Budesinsky, M.; Protivinska, E.; Netusilova, H.; Garrow, T. A. S-alkylated homocysteine derivatives: New inhibitors of human betaine-homocysteine S-methyltransferase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 3982-3989.
8. Teng, Y. W.; Mehedint, M. G.; Garrow, T. A.; Zeisel, S. H. Deletion of Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase in Mice Perturbs Choline and 1-Carbon Metabolism, Resulting in Fatty Liver and Hepatocellular Carcinomas. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 36258-36267.
9. Mato, J. M.; Alvarez, L.; Ortiz, P.; Pajares, M. A. S-adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics* **1997**, *73*, 265-280.
10. Taoka, S.; Ohja, S.; Shan, X. Y.; Kruger, W. D.; Banerjee, R. Evidence for heme-mediated redox regulation of human cystathionine beta-synthase activity. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 25179-25184.
11. Chen, Z. Q.; Crippen, K.; Gulati, S.; Banerjee, R. Purification and kinetic mechanism of a mammalian methionine synthase from pig-liver. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 27193-27197.
12. Garrow, T. A. Purification, kinetic properties, and cDNA cloning of mammalian betaine-homocysteine methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 22831-22838.
13. Ganu, R. S.; Garrow, T. A.; Sodhi, M.; Rund, L. A.; Schook, L. B. Molecular characterization and analysis of the porcine betaine homocysteine methyltransferase and betaine homocysteine methyltransferase-2 genes. *Gene* **2011**, *473*, 133-138.
14. Mosharov, E.; Cranford, M. R.; Banerjee, R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* **2000**, *39*, 13005-13011.
15. Beatty, P. W.; Reed, D. J. Involvement of the cystathionine pathway in the biosynthesis of glutathione by isolated rat hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1980**, *204*, 80-87.

16. Pajares, M. A.; Duran, C.; Corrales, F.; Pliego, M. M.; Mato, J. M. Modulation of rat-liver S-adenosylmethionine synthetase-activity by glutathione. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 17598-17605.
17. Delgado-Reyes, C. V.; Wallig, M. A.; Garrow, T. A. Immunohistochemical detection of betaine-homocysteine S-methyltransferase in human, pig, and rat liver and kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2001**, *393*, 184-186.
18. Zou, C. G.; Banerjee, R. Homocysteine and redox signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* **2005**, *7*, 547-559.
19. Shapiro, S. K.; Yphantis, D. A. Assay of S-methylmethionine and S-adenosylmethionine homocysteine transmethylases. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1959**, *36*, 241-244.
20. Mudd, S. H.; Levy, H. L.; Krauss, J. P. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8 ed.; McGraw Hill: New York, **2001**; Vol. 2.
21. Chen, P.; Poddar, R.; Tipa, E. V.; Dibello, P. M.; Moravec, C. D.; Robinson, K.; Green, R.; Kruger, W. D.; Garrow, T. A.; Jacobsen, D. W. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: Implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Advances in Enzyme Regulation, Vol 39* **1999**, *39*, 93-109.
22. Wijekoon, E. P.; Hall, B.; Ratnam, S.; Brosnan, M. E.; Zeisel, S. H.; Brosnan, J. T. Homocysteine metabolism in ZDF (type 2) diabetic rats. *Diabetes* **2005**, *54*, 3245-3251.
23. Finkelstein, J. D. Metabolic regulatory properties of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **2007**, *45*, 1694-1699.
24. Petrossian, T. C.; Clarke, S. G. Uncovering the Human Methyltransferasome. *Molecular & Cellular Proteomics* **2011**, *10*.
25. Finkelstein, J. D.; Kyle, W. E.; Martin, J. J.; Pick, A. M. Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1975**, *66*, 81-87.
26. Vitvitsky, V.; Mosharov, E.; Tritt, M.; Ataulakhanov, F.; Banerjee, R. Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox Report* **2003**, *8*, 57-63.
27. Matthews, R. G.; Daubner, S. C. Modulation of methylenetetrahydrofolate reductase-activity by S-adenosylmethionine and by dihydrofolate and its polyglutamate analogs. *Advances in Enzyme Regulation* **1982**, *20*, 123-131.
28. Waterland, R. A.; Jirtle, R. L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition* **2004**, *20*, 63-68.
29. Van den Veyver, I. B. Genetic effects of methylation diets. *Annual Review of Nutrition* **2002**, *22*, 255-282.
30. Ueland, P. M. Choline and betaine in health and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **2011**, *34*, 3-15.
31. Cui, Z.; Houweling, M. Phosphatidylcholine and cell death. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, *1585*, 87-96.
32. Zeisel, S. H. Choline: Critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annual Review of Nutrition* **2006**, *26*, 229-250.

33. Porter, R. K. Mammalian mitochondrial inner membrane cationic and neutral amino acid carriers. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **2000**, 1459, 356-362.
34. Lever, M.; Slow, S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical Biochemistry* **2010**, 43, 732-744.
35. Feng, Y. X.; Muller, V.; Friedrich, B.; Risler, T.; Lang, F. Clinical significance of cell volume regulation. *Wiener Klinische Wochenschrift* **2001**, 113, 477-484.
36. Schliess, F.; Haussinger, D. The cellular hydration state: A critical determinant for cell death and survival. *Biological Chemistry* **2002**, 383, 577-583.
37. Lang, F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *Journal of the American College of Nutrition* **2007**, 26, 613S-623S.
38. Haussinger, D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochemical Journal* **1996**, 313, 697-710.
39. Dmitrieva, N. I.; Burg, M. B. Hypertonic stress response. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2005**, 569, 65-74.
40. Craig, S. A. S. Betaine in human nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, 80, 539-549.
41. Schafer, C.; Hoffmann, L.; Heldt, K.; Lornejad-Schafer, M. R.; Brauers, G.; Gehrman, T.; Garrow, T. A.; Haussinger, D.; Mayatepek, E.; Schwahn, B. C.; Schliess, F. Osmotic regulation of betaine homocysteine-S-methyltransferase expression in H4IIE rat hepatoma cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2007**, 292, G1089-G1098.
42. Delgado-Reyes, C. V.; Garrow, T. A. High sodium chloride intake decreases betaine-homocysteine S-methyltransferase expression in guinea pig liver and kidney. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **2005**, 288, R182-R187.
43. Strakova, J.; Williams, K. T.; Gupta, S.; Schalinske, K. L.; Kruger, W. D.; Rozen, R.; Jiracek, J.; Li, L.; Garrow, T. A. Dietary intake of S-(alpha-carboxybutyl)-DL-homocysteine induces hyperhomocysteinemia in rats. *Nutrition Research* **2010**, 30, 492-500.
44. Kharbanda, K. K.; Mailliard, M. E.; Baldwin, C. R.; Beckenhauer, H. C.; Sorrell, M. F.; Tuma, D. J. Betaine attenuates alcoholic steatosis by restoring phosphatidylcholine generation via the phosphatidylethanolamine methyltransferase pathway. *Journal of Hepatology* **2007**, 46, 314-321.
45. Best, C. H.; Huntsman, M. E. The effects of the components of lecithine upon deposition of fat in the liver. *Journal of Physiology-London* **1932**, 75, 405-412.
46. Rabinowitch, I. M. Effects of betaine upon the cholesterol and bilirubin contents of blood plasma in diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal* **1936**, 34, 637-641.
47. Park, E. I.; Garrow, T. A. Interaction between dietary methionine and methyl donor intake on rat liver betaine-homocysteine methyltransferase gene expression and organization of the human gene. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 7816-7824.
48. Wagner, C. Biochemical role of folate in cellular metabolism (Reprinted from Folate and Health Disease, pgs 23-42, 1995). *Clinical Research and Regulatory Affairs* **2001**, 18, 161-180.
49. Augspurger, N. R.; Scherer, C. S.; Garrow, T. A.; Baker, D. H. Dietary S-methylmethionine, a component of foods, has choline-sparing activity in chickens. *Journal of Nutrition* **2005**, 135, 1712-1717.

50. Mudd, S. H.; Datko, A. H. The S-methylmethionine cycle in lemna-paucicostata. *Plant Physiology* **1990**, *93*, 623-630.
51. Jakubowski, H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2004**, *61*, 470-487.
52. Jakubowski, H.; Fersht, A. R. Alternative pathways for editing non-cognate amino-acids by aminoacyl-transfer rna-synthetases. *Nucleic Acids Research* **1981**, *9*, 3105-3117.
53. Jakubowski, H.; Goldman, E. EDITING OF ERRORS IN SELECTION OF AMINO-ACIDS FOR PROTEIN-SYNTHESIS. *Microbiological Reviews* **1992**, *56*, 412-429.
54. Benesch, R. E.; Benesch, R. The acid strength of the -SH group in cysteine and related compounds. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77*, 5877-5881.
55. Jakubowski, H. The determination of homocysteine-thiolactone in biological samples. *Analytical Biochemistry* **2002**, *308*, 112-119.
56. Jakubowski, H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures - Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 1935-1942.
57. Jakubowski, H.; Zhang, L.; Bardeguet, A.; Aviv, A. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells - Implications for atherosclerosis. *Circulation Research* **2000**, *87*, 45-51.
58. Jakubowski, H. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *Faseb Journal* **1999**, *13*, 2277-2283.
59. Benesch, R.; Benesch, R. E. Formation of peptide bonds by aminolysis of homocysteine thiolactones. *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78*, 1597-1599.
60. Langmeier, M.; Folbergrova, J.; Haugvicova, R.; Pokorny, J.; Mares, P. Neuronal cell death in hippocampus induced by homocysteic acid in immature rats. *Epilepsia* **2003**, *44*, 299-304.
61. Folbergrova, J. Anticonvulsant action of both NMDA and Non-NMDA receptor antagonists against seizures induced by homocysteine in immature rats. *Experimental Neurology* **1997**, *145*, 442-450.
62. Frauscher, G.; Karnaukhova, E.; Muehl, A.; Hoeger, H.; Lubec, B. Oral-administration of homocysteine leads to increased plasma triglycerides and homocysteic acid - additional mechanisms in homocysteine induced endothelial damage. *Life Sciences* **1995**, *57*, 813-817.
63. Jakubowski, H.; Goldman, E. Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-transfer rna-synthetase in cultured-mammalian-cells. *Febs Letters* **1993**, *317*, 237-240.
64. Mercie, P.; Garnier, O.; Lascoste, L.; Renard, M.; Closse, C.; Durrieu, F.; Marit, G.; Boisseau, R. M.; Belloc, F. Homocysteine-thiolactone induces caspase-independent vascular endothelial cell death with apoptotic features. *Apoptosis* **2000**, *5*, 403-411.
65. Huang, R. F. S.; Huang, S. M.; Lin, B. S.; Wei, J. S.; Liu, T. Z. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sciences* **2001**, *68*, 2799-2811.
66. Zhang, C.; Cai, Y.; Adachi, M. T.; Oshiro, S.; Aso, T.; Kaufman, R. J.; Kitajima, S. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 35867-35874.

67. Foster, M. W.; McMahon, T. J.; Stamler, J. S. S-nitrosylation in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* **2003**, *9*, 160-168.
68. Pellanda, H. Betaine homocysteine methyltransferase (BHMT)-dependent remethylation pathway in human healthy and tumoral liver. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **2013**, *51*, 617-621.
69. Ueland, P. M.; Refsum, H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular-disease - plasma-levels in health, disease, and drug-therapy. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **1989**, *114*, 473-501.
70. Refsum, H.; Helland, S.; Ueland, P. M. Fasting plasma homocysteine as a sensitive parameter of antifolate effect - a study of psoriasis patients receiving low-dose methotrexate treatment. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **1989**, *46*, 510-520.
71. Chauveau, P.; Chadeaux, B.; Coude, M.; Aupetit, J.; Hannedouche, T.; Kamoun, P.; Jungers, P. Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney International* **1993**, *43*, S72-S77.
72. Steegerstheunissen, R. P. M.; Boers, G. H. J.; Trijbels, F. J. M.; Eskes, T. Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *New England Journal of Medicine* **1991**, *324*, 199-200.
73. Seshadri, S.; Beiser, A.; Selhub, J.; Jacques, P. F.; Rosenberg, I. H.; D'Agostino, R. B.; Wilson, P. W. F.; Wolf, P. A. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine* **2002**, *346*, 476-483.
74. Mizrahi, E. H.; Jacobsen, D. W.; Friedland, R. P. Plasma homocysteine: A new risk factor for Alzheimer's disease? *Israel Medical Association Journal* **2002**, *4*, 187-190.
75. Hague, W. M. Homocysteine and pregnancy. *Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology* **2003**, *17*, 459-469.
76. Pajares, M. A.; Perez-Sala, D. Betaine homocysteine S-methyltransferase: just a regulator of homocysteine metabolism? *Cellular and Molecular Life Sciences* **2006**, *63*, 2792-2803.
77. Greene, N. D. E.; Stanier, P.; Copp, A. J. Genetics of human neural tube defects. *Human Molecular Genetics* **2009**, *18*, R113-R129.
78. Blandini, F.; Fancellu, R.; Martignoni, E.; Mangiagalli, A.; Pacchetti, C.; Samuele, A.; Nappi, G. Plasma homocysteine and L-DOPA metabolism in patients with Parkinson disease. *Clinical Chemistry* **2001**, *47*, 1102-1104.
79. Hankey, G. J.; Eikelboom, J. W. Homocysteine and stroke. *Current Opinion in Neurology* **2001**, *14*, 95-102.
80. Mattson, M. P.; Shea, T. B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences* **2003**, *26*, 137-146.
81. Melnyk, S.; Pogribna, M.; Miller, B. J.; Basnakian, A. G.; Pogribny, I. P.; James, S. J. Uracil misincorporation, DNA strand breaks, and gene amplification are associated with tumorigenic cell transformation in folate deficient/repleted Chinese hamster ovary cells. *Cancer Letters* **1999**, *146*, 35-44.
82. James, S. J.; Yin, L. Diet-induced dna damage and altered nucleotide-metabolism in lymphocytes from methyl-donor-deficient rats. *Carcinogenesis* **1989**, *10*, 1209-1214.

83. Cravo, M. L.; Mason, J. B.; Dayal, Y.; Hutchinson, M.; Smith, D.; Selhub, J.; Rosenberg, I. H. Folate-deficiency enhances the development of colonic neoplasia in dimethylhydrazine-treated rats. *Cancer Research* **1992**, *52*, 5002-5006.
84. James, S. J.; Miller, B. J.; McGarrity, L. J.; Morris, S. M. The effect of folic-acid and/or methionine deficiency on deoxyribonucleotide pools and cell-cycle distribution in mitogen-stimulated rat lymphocytes. *Cell Proliferation* **1994**, *27*, 395-406.
85. James, S. J.; Basnakian, A. G.; Miller, B. J. In-vitro folate-deficiency induces deoxynucleotide pool imbalance, apoptosis, and mutagenesis in chinese-hamster ovary cells. *Cancer Research* **1994**, *54*, 5075-5080.
86. Tsujiuchi, T.; Tsutsumi, M.; Sasaki, Y.; Takahama, M.; Konishi, Y. Hypomethylation of CpG sites and c-myc gene overexpression in hepatocellular carcinomas, but not hyperplastic nodules, induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Japanese Journal of Cancer Research* **1999**, *90*, 909-913.
87. Konstantinova, S. V.; Tell, G. S.; Vollset, S. E.; Nygard, O.; Bleie, O.; Ueland, P. M. Divergent associations of plasma choline and betaine with components of metabolic syndrome in middle age and elderly men and women. *Journal of Nutrition* **2008**, *138*, 914-920.
88. Buchman, A. L.; Dubin, M. D.; Moukarzel, A. A.; Jenden, D. J.; Roch, M.; Rice, K. M.; Gornbein, J.; Ament, M. E. Choline deficiency - a cause of hepatic steatosis during parenteral-nutrition that can be reversed with intravenous choline supplementation. *Hepatology* **1995**, *22*, 1399-1403.
89. Zeisel, S. H.; Dacosta, K. A.; Franklin, P. D.; Alexander, E. A.; Lamont, J. T.; Sheard, N. F.; Beiser, A. Choline, an essential nutrient for humans. *Faseb Journal* **1991**, *5*, 2093-2098.
90. Salmon, W. D.; Copeland, D. H. Liver carcinoma and related lesions in chronic choline deficiency. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1954**, *57*, 664-677.
91. Ghoshal, A. K.; Farber, E. The induction of liver-cancer by dietary deficiency of choline and methionine without added carcinogens. *Carcinogenesis* **1984**, *5*, 1367-1370.
92. Brosnan, J. T.; Jacobs, R. L.; Stead, L. M.; Brosnan, M. E. Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochimica Polonica* **2004**, *51*, 405-413.
93. Hultberg, B.; Berglund, M.; Andersson, A.; Frank, A. Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* **1993**, *17*, 687-689.
94. Mato, J. M.; Corrales, F. J.; Lu, S. C.; Avila, M. A. S-adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *Faseb Journal* **2002**, *16*, 15-26.
95. Duce, A. M.; Ortiz, P.; Cabrero, C.; Mato, J. M. S-adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis. *Hepatology* **1988**, *8*, 65-68.
96. James, S. J.; Melnyk, S.; Pogribna, M.; Pogribny, I. P.; Caudill, M. A. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: Potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *Journal of Nutrition* **2002**, *132*, 2361S-2366S.
97. Voutilainen, S.; Morrow, J. D.; Roberts, L. J.; Alfthan, G.; Alho, H.; Nyyssonen, K.; Salonen, J. T. Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **1999**, *19*, 1263-1266.
98. Eberhardt, R. T.; Forgione, M. A.; Cap, A.; Leopold, J. A.; Rudd, M. A.; Trolliet, M.; Heydrick, S.; Stark, R.; Klings, E. S.; Moldovan, N. I.; Yaghoubi, M.; Goldschmidt-Clermont, P. J.; Farber, H. W.;

Cohen, R.; Loscalzo, J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *Journal of Clinical Investigation* **2000**, 106, 483-491.

99. Lentz, S. R. Homocysteine and vascular dysfunction. *Life Sciences* **1997**, 61, 1205-1215.
100. Weiss, N.; Heydrick, S.; Zhang, Y. Y.; Bierl, C.; Cap, A.; Loscalzo, J. Cellular redox state and endothelial dysfunction in mildly hyperhomocysteinemic cystathionine beta-synthase-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **2002**, 22, 34-41.
101. Stamler, J. S.; Osborne, J. A.; Jaraki, O.; Rabbani, L. E.; Mullins, M.; Singel, D.; Loscalzo, J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *Journal of Clinical Investigation* **1993**, 91, 308-318.
102. Weiss, N.; Zhang, Y. Y.; Heydrick, S.; Bierl, C.; Loscalzo, J. Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocyst(e)ine-induced endothelial dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, 98, 12503-12508.
103. Jacobsen, D. W. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clinical Chemistry* **1998**, 44, 1833-1843.
104. Maron, B. A.; Loscalzo, A. The Treatment of Hyperhomocysteinemia. *Annual Review of Medicine* **2009**, 60, 39-54.
105. Obregon, D. F.; Murthy, S. N.; McNamara, D. B.; Fonseca, V. A. Novel approaches to the treatment of hyperhomocysteinemia. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2003**, 13, 1023-1035.
106. Kang, S. S. Treatment of hyperhomocyst(e)inemia: Physiological basis. *Journal of Nutrition* **1996**, 126, S1273-S1275.
107. de Baulny, H. O.; Gerard, M.; Saudubray, J. M.; Zittoun, J. Remethylation defects: guidelines for clinical diagnosis and treatment. *European Journal of Pediatrics* **1998**, 157, S77-S83.
108. De Franchis, R.; Sperandio, M. P.; Sebastio, G.; Andria, G. Clinical aspects of cystathionine beta-synthase deficiency: how wide is the spectrum? *European Journal of Pediatrics* **1998**, 157, S67-S70.
109. Allen, R. H.; Stabler, S. P.; Lindenbaum, J. Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate-deficiency and related inborn-errors of metabolism. *Metabolism-Clinical and Experimental* **1993**, 42, 1448-1460.
110. Avila, M. A.; Berasain, C.; Torres, L.; Martin-Duce, A.; Corrales, F. J.; Yang, H. P.; Prieto, J.; Lu, S. C.; Caballeria, J.; Rodes, J.; Mato, J. M. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* **2000**, 33, 907-914.
111. Forestier, M.; Reichen, J.; Solioz, M. Application of mRNA differential display to liver cirrhosis: Reduced fetuin expression in biliary cirrhosis in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, 225, 377-383.
112. Feo, F.; De Miglio, M. R.; Simile, M. M.; Muroli, M. R.; Calvisi, D. F.; Frau, M.; Pascale, R. M. Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer* **2006**, 1765, 126-147.
113. Kaplowitz, N.; Ji, C. Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **2006**, 21, S7-S9.

114. Ji, C.; Shinohara, M.; Kuhlenkamp, J.; Chan, C.; Kaplowitz, N. Mechanisms of protection by the betaine-homocysteine methyltransferase/betaine system in HepG2 cells and primary mouse hepatocytes. *Hepatology* **2007**, *46*, 1586-1596.
115. Sowden, M. P.; Collins, H. L.; Smith, H. C.; Garrow, T. A.; Sparks, J. D.; Sparks, C. E. Apolipoprotein B mRNA and lipoprotein secretion are increased in McArdle RH-7777 cells by expression of betaine-homocysteine S-methyltransferase. *Biochemical Journal* **1999**, *341*, 639-645.
116. Ranocha, P.; Bourgis, F.; Ziemak, M. J.; Rhodes, D.; Gage, D. A.; Hanson, A. D. Characterization and functional expression of cDNAs encoding methionine-sensitive and -insensitive homocysteine S-methyltransferases from Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 15962-15968.
117. Neuhierl, B.; Thanbichler, M.; Lottspeich, F.; Bock, A. A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases - Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 5407-5414.
118. Matthews, R. G.; Goulding, C. W. Enzyme-catalyzed methyl transfers to thiols: the role of zinc. *Current Opinion in Chemical Biology* **1997**, *1*, 332-339.
119. Zhou, Z. H. S.; Peariso, K.; Penner-Hahn, J. E.; Matthews, R. G. Identification of the zinc ligands in cobalamin-independent methionine synthase (MetE) from Escherichia coli. *Biochemistry* **1999**, *38*, 15915-15926.
120. Vallee, B. L.; Auld, D. S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **1990**, *29*, 5647-5659.
121. Park, H. I.; Ming, L. J. The mechanistic role of the coordinated tyrosine in astacin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1998**, *72*, 57-62.
122. Sankaranarayanan, R.; Dock-Bregeon, A. C.; Rees, B.; Bovee, M.; Caillet, J.; Romby, P.; Francklyn, C. S.; Moras, D. Zinc ion mediated amino acid discrimination by threonyl-tRNA synthetase. *Nature Structural Biology* **2000**, *7*, 461-465.
123. Gonzalez, B.; Pajares, M. A.; Martinez-Ripoll, M.; Blundell, T. L.; Sanz-Aparicio, J. Crystal structure of rat liver betaine homocysteine S-methyltransferase reveals new oligomerization features and conformational changes upon substrate binding. *Journal of Molecular Biology* **2004**, *338*, 771-782.
124. Garrido, F.; Gasset, M.; Sanz-Aparicio, J.; Alfonso, C.; Pajares, M. A. Rat liver betaine-homocysteine S-methyltransferase equilibrium unfolding: insights into intermediate structure through tryptophan substitutions. *Biochemical Journal* **2005**, *391*, 589-599.
125. McKeever, M. P.; Weir, D. G.; Molloy, A.; Scott, J. M. Betaine homocysteine methyltransferase - organ distribution in man, pig and rat and subcellular-distribution in the rat. *Clinical Science* **1991**, *81*, 551-556.
126. Millian, N. S.; Garrow, T. A. Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1998**, *356*, 93-98.
127. Fromm, H. J.; Nordlie, R. C. On the purification and kinetics of rat liver thietin-homocysteine transmethylase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1959**, *81*, 363-376.
128. Ericson, L. E. Betaine-homocysteine-methyl-transferases .2. Isolation and properties of the transferase of pig liver. *Acta Chemica Scandinavica* **1960**, *14*, 2113-2126.

129. Durell, J.; Anderson, D. G.; Cantoni, G. L. The synthesis of methionine by enzymic transmethylation .1. Purification and properties of thetin homocysteine methyltransferase. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1957**, *26*, 270-282.
130. Skiba, W. E.; Taylor, M. P.; Wells, M. S.; Mangum, J. H.; Awad, W. M. Human hepatic methionine biosynthesis - purification and characterization of betaine - homocysteine S-methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **1982**, *257*, 4944-4948.
131. Feng, Q. P.; Kalari, K.; Fridley, B. L.; Jenkins, G.; Ji, Y. A.; Abo, R.; Hebring, S.; Zhang, J. P.; Nye, M. D.; Leeder, J. S.; Weinshilboum, R. M. Betaine-homocysteine methyltransferase: Human liver genotype-phenotype correlation. *Molecular Genetics and Metabolism* **2011**, *102*, 126-133.
132. Heil, S. G.; Lievers, K. J. A.; Boers, G. H.; Verhoef, P.; den Heijer, M.; Trijbels, F. J. M.; Blom, H. J. Betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT): Genomic sequencing and relevance to hyperhomocysteinemia and vascular disease in humans. *Molecular Genetics and Metabolism* **2000**, *71*, 511-519.
133. Morin, I.; Platt, R.; Weisberg, I.; Sabbaghian, N.; Wu, Q.; Garrow, T. A.; Rozen, R. Common variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and risk for spina bifida. *American Journal of Medical Genetics Part A* **2003**, *119A*, 172-176.
134. Yamashita, T.; Hashimoto, S.; Kaneko, S.; Nagai, S.; Toyoda, N.; Suzuki, T.; Kobayashi, K.; Matsushima, K. Comprehensive gene expression profile of a normal human liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2000**, *269*, 110-116.
135. Rao, P. V.; Garrow, T. A.; John, F.; Garland, D.; Millian, N. S.; Zigler, J. S. Betaine-homocysteine methyltransferase is a developmentally regulated enzyme crystallin in rhesus monkey lens. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 30669-30674.
136. Sandu, C.; Nick, P.; Hess, D.; Schiltz, E.; Garrow, T. A.; Brandsch, R. Association of betaine-homocysteine S-methyltransferase with microtubules. *Biological Chemistry* **2000**, *381*, 619-622.
137. Furuya, N.; Kanazawa, T.; Fujimura, S.; Ueno, T.; Kominami, E.; Kadowaki, M. Leupeptin-induced appearance of partial fragment of betaine homocysteine methyltransferase during autophagic maturation in rat hepatocytes. *Journal of Biochemistry* **2001**, *129*, 313-320.
138. White, R. F.; Kaplan, L.; Birnbaum, J. Betaine-homocysteine transmethylase in pseudomonas-denitrificans, a vitamin-B12 overproducer. *Journal of Bacteriology* **1973**, *113*, 218-223.
139. Balinska, M.; Paszewski, A. Betaine-homocysteine methyltransferase in the fungus aspergillus-nidulans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1979**, *91*, 1095-1100.
140. Chen, N. C.; Yang, F.; Capecchi, L. M.; Gu, Z. Y.; Schafer, A. I.; Durante, W.; Yang, X. F.; Wang, H. Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues. *Faseb Journal* **2010**, *24*, 2804-2817.
141. Park, E. I.; Renduchintala, M. S.; Garrow, T. A. Diet-induced changes in hepatic betaine-homocysteine methyltransferase activity are mediated by changes in the steady-state level of its mRNA. *Journal of Nutritional Biochemistry* **1997**, *8*, 541-545.
142. Emmert, J. L.; Garrow, T. A.; Baker, D. H. Hepatic betaine-homocysteine methyltransferase activity in the chicken is influenced by dietary intake of sulfur amino acids, choline and betaine. *Journal of Nutrition* **1996**, *126*, 2050-2058.
143. Finkelstein, J. D.; Martin, J. J.; Harris, B. J. Effect of dietary cystine on methionine metabolism in rat-liver. *Journal of Nutrition* **1986**, *116*, 985-990.

144. Finkelstein, J. D.; Martin, J. J.; Harris, B. J. Methionine metabolism in mammals - the methionine-sparing effect of cystine. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263, 11750-11754.
145. Castro, C.; Millian, N. S.; Garrow, T. A. Liver betaine-homocysteine S-methyltransferase activity undergoes a redox switch at the active site zinc. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2008**, 472, 26-33.
146. Li, D.; Hayden, E. Y.; Panda, K.; Stuehr, D. J.; Deng, H. T.; Rousseau, D. L.; Yeh, S. R. Regulation of the monomer-dimer equilibrium in inducible nitric-oxide synthase by nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281, 8197-8204.
147. Barak, A. J.; Beckenhauer, H. C.; Tuma, D. J. Betaine, ethanol, and the liver: A review. *Alcohol* **1996**, 13, 395-398.
148. Barak, A. J.; Beckenhauer, H. C.; Mailliard, M. E.; Kharbanda, K. K.; Tuma, D. J. Betaine lowers elevated S-adenosylhomocysteine levels in hepatocytes from ethanol-fed rats. *Journal of Nutrition* **2003**, 133, 2845-2848.
149. Kharbanda, K. K. Role of transmethylation reactions in alcoholic liver disease. *World Journal of Gastroenterology* **2007**, 13, 4947-4954.
150. Kharbanda, K. K.; Rogers, D. D.; Mailliard, M. E.; Siford, G. L.; Barak, A. J.; Beckenhauer, H. C.; Sorrell, M. F.; Tuma, D. J. Role of elevated S-adenosylhomocysteine in rat hepatocyte apoptosis: Protection by betaine. *Biochemical Pharmacology* **2005**, 70, 1883-1890.
151. Kharbanda, K. K.; Todero, S. L.; Ward, B. W.; Cannella, J. J.; Tuma, D. J. Betaine administration corrects ethanol-induced defective VLDL secretion. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2009**, 327, 75-78.
152. Strakova, J.; Gupta, S.; Kruger, W. D.; Dilger, R. N.; Tryon, K.; Li, L.; Garrow, T. A. Inhibition of betaine-homocysteine S-methyltransferase in rats causes hyperhomocysteinemia and reduces liver cystathionine beta-synthase activity and methylation capacity. *Nutrition Research* **2011**, 31, 563-571.
153. Collinsova, M.; Strakova, J.; Jiracek, J.; Garrow, T. A. Inhibition of betaine-homocysteine S-methyltransferase causes hyperhomocysteinemia in mice. *Journal of Nutrition* **2006**, 136, 1493-1497.
154. Durando, X.; Thivat, E.; Gimbergues, P.; Cellarier, E.; Abrial, C.; Dib, M.; Tacca, O.; Chollet, P. Methionine dependency of cancer cells: a new therapeutic approach? *Bulletin Du Cancer* **2008**, 95, 69-76.
155. Cellarier, E.; Durando, X.; Vasson, M. P.; Farges, M. C.; Demiden, A.; Maurizis, J. C.; Madelmont, J. C.; Chollet, P. Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews* **2003**, 29, 489-499.
156. Duranton, B.; Freund, J. N.; Galluser, M.; Schleiffer, R.; Gosse, F.; Bergmann, C.; Hasselmann, R.; Raul, F. Promotion of intestinal carcinogenesis by dietary methionine. *Carcinogenesis* **1999**, 20, 493-497.
157. Pavillard, V.; Nicolaou, A.; Double, J. A.; Phillips, R. M. Methionine dependence of tumours: A biochemical strategy for optimizing paclitaxel chemosensitivity in vitro. *Biochemical Pharmacology* **2006**, 71, 772-778.
158. Sibani, S.; Melnyk, S.; Pogribny, I. P.; Wang, W.; Hiou-Tim, F.; Deng, L. Y.; Trasler, J.; James, S. J.; Rozen, R. Studies of methionine cycle intermediates (SAM, SAH), DNA methylation and the impact of folate deficiency on tumor numbers in Min mice. *Carcinogenesis* **2002**, 23, 61-65.

159. Teng, Y. W.; Ellis, J. M.; Coleman, R. A.; Zeisel, S. H. Mouse Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase Deficiency Reduces Body Fat via Increasing Energy Expenditure and Impairing Lipid Synthesis and Enhancing Glucose Oxidation in White Adipose Tissue. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 16187-16198.
160. Lee, M. B.; Kooistra, M.; Zhang, B. H.; Slow, S.; Fortier, A. L.; Garrow, T. A.; Lever, M.; Trasler, J. M.; Baltz, J. M. Betaine Homocysteine Methyltransferase Is Active in the Mouse Blastocyst and Promotes Inner Cell Mass Development. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 33094-33103.
161. Li, F.; Feng, Q. P.; Lee, C.; Wang, S. Z.; Pellemounter, L. L.; Moon, I.; Eckloff, B. W.; Wieben, E. D.; Schaid, D. J.; Yee, V.; Weinshilboum, R. M. Human betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and BHMT2: Common gene sequence variation and functional characterization. *Molecular Genetics and Metabolism* **2008**, *94*, 326-335.
162. Awad, W. M.; Whitney, P. L.; Skiba, W. E.; Mangum, J. H.; Wells, M. S. Evidence for direct methyl transfer in betaine - homocysteine S-methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258*, 2790-2792.
163. Maw, G. A. Thetin-homocysteine transmethylase - preliminary manometric study of the enzyme from rat liver. *Biochemical Journal* **1956**, *63*, 116-124.
164. Finkelstein, J. D.; Martin, J. J. Methionine metabolism in mammals - distribution of homocysteine between competing pathways. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259*, 9508-9513.
165. Finkelst.Jd; Kyle, W. E.; Harris, B. J. Methionine metabolism in mammals . Regulation of homocysteine methyltransferases in rat tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1971**, *146*, 84-&.
166. Finkelstein, J. D.; Harris, B. J.; Martin, J. J.; Kyle, W. E. Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary methionine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1982**, *108*, 344-348.
167. Finkelstein, J. D.; Martin, J. J.; Harris, B. J.; Kyle, W. E. Regulation of hepatic betaine homocysteine methyltransferase by dietary betaine. *Journal of Nutrition* **1983**, *113*, 519-521.
168. Bose, N.; Momany, C. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of recombinant human betaine-homocysteine S-methyltransferase. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2001**, *57*, 431-433.
169. Gonzalez, B.; Pajares, M. A.; Too, H. P.; Garrido, F.; Blundell, T. L.; Sanz-Aparicio, J. Crystallization and preliminary X-ray study of recombinant betaine-homocysteine S-methyltransferase from rat liver. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2002**, *58*, 1507-1510.
170. Szegedi, S. S.; Garrow, T. A. Oligomerization is required for betaine-homocysteine S-methyltransferase function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2004**, *426*, 32-42.
171. Gonzalez, B.; Campillo, N.; Garrido, F.; Gasset, M.; Sanz-Aparicio, J.; Pajares, M. A. Active-site-mutagenesis study of rat liver betaine-homocysteine S-methyltransferase. *Biochemical Journal* **2003**, *370*, 945-952.
172. Miller, C. M.; Szegedi, S. S.; Garrow, T. A. Conformation-dependent inactivation of human betaine-homocysteine S-methyltransferase by hydrogen peroxide in vitro. *Biochemical Journal* **2005**, *392*, 443-448.
173. Schramm, V. L. Transition States, Analogues, and Drug Development. *Acs Chemical Biology* **2013**, *8*, 71-81.

174. Lee, K. H.; Cava, M.; Amiri, P.; Ottoboni, T.; Lindquist, R. N. Betaine-homocysteine methyltransferase from rat-liver - purification and inhibition by a boronic acid substrate-analog. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1992**, 292, 77-86.
175. Finkelstein, J. D.; Martin, J. J. Inactivation of betaine-homocysteine methyltransferase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1984**, 118, 14-19.
176. Vanek, V.; Budesinsky, M.; Kabeleova, P.; Sanda, M.; Kozisek, M.; Hanclova, I.; Mladkova, J.; Brynda, J.; Rosenberg, I.; Koutmos, M.; Garrow, T. A.; Jiracek, J. Structure-Activity Study of New Inhibitors of Human Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 3652-3665.
177. Slow, S.; Garrow, T. A. Liver choline dehydrogenase and kidney betaine-homocysteine methyltransferase expression are not affected by methionine or choline intake in growing rats. *Journal of Nutrition* **2006**, 136, 2279-2283.
178. Liu, Z. H.; Ma, Y. L.; Yang, J. J.; Qin, H. L. Upregulated and Downregulated Proteins in Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review of Proteomic Profiling Studies. *Omics-a Journal of Integrative Biology* **2011**, 15, 61-71.
179. Liu, H. H.; Lu, P.; Guo, Y. Y.; Farrell, E.; Zhang, X.; Zheng, M.; Bosano, B.; Zhang, Z. M.; Allard, J.; Liao, G. C.; Fu, S. Y.; Chen, J. Z.; Dolim, K.; Kuroda, A.; Usuka, J.; Cheng, J.; Tao, W.; Welch, K.; Liu, Y. Z.; Pease, J.; de Keczer, S. A.; Masjedizadeh, M.; Hu, J. S.; Weller, P.; Garrow, T.; Peltz, G. An integrative genomic analysis identifies Bhmt2 as a diet-dependent genetic factor protecting against acetaminophen-induced liver toxicity. *Genome Research* **2010**, 20, 28-35.
180. Perkins, J. D. Acetaminophen sets records in the United States: Number 1 analgesic and number 1 cause of acute liver failure - Acetaminophen-induced acute liver failure: Results of a United States multicenter, prospective study. Larson AM, Polson J, Fontana RJ, Davern TJ, Lalani E, Hynan LS, Reisch JS, Schiodt FV, Ostapowicz G, Shakil AO, Lee WW, Acute Liver Failure Study Group. *Hepatology* 2005;42 : 1364-1372. *Liver Transplantation* **2006**, 12, 682-683.
181. Bessems, J. G. M.; Vermeulen, N. P. E. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: Molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Critical Reviews in Toxicology* **2001**, 31, 55-138.
182. James, L. P.; Mayeux, P. R.; Hinson, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition* **2003**, 31, 1499-1506.
183. Mostowska, A.; Hozyasz, K. K.; Biedziak, B.; Misiak, J.; Jagodzinski, P. P. Polymorphisms located in the region containing BHMT and BHMT2 genes as maternal protective factors for orofacial clefts. *European Journal of Oral Sciences* **2010**, 118, 325-332.
184. Mostowska, A.; Hozyasz, K. K.; Jagodzinski, P. P. Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clinical Genetics* **2006**, 69, 512-517.
185. Mostowska, A.; Hozyasz, K. K.; Wojcicki, P.; Dziegelewska, M.; Jagodzinski, P. P. Associations of folate and choline metabolism gene polymorphisms with orofacial clefts. *Journal of Medical Genetics* **2010**, 47, 809-815.
186. Mladkova, J.; Vanek, V.; Budesinsky, M. G.; Elbert, T.; Demianova, Z.; Garrow, T. A.; Jiracek, J. Double-Headed Sulfur-Linked Amino Acids As First Inhibitors for Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase 2. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 6822-6831.

187. Breksa, A. P.; Garrow, T. A. Recombinant human liver betaine-homocysteine S-methyltransferase: Identification of three cysteine residues critical for zinc binding. *Biochemistry* **1999**, *38*, 13991-13998.
188. Bradford, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248-254.
189. Korinek, M.; Sístek, V.; Mladkova, J.; Mikes, P.; Jiracek, J.; Selicharova, I. Quantification of homocysteine-related metabolites and the role of betaine-homocysteine S-methyltransferase in HepG2 cells. *Biomedical Chromatography* **2013**, *27*, 111-121.
190. Dionisio, N.; Jardin, I.; Salido, G. M.; Rosado, J. A. Homocysteine, Intracellular Signaling and Thrombotic Disorders. *Current Medicinal Chemistry* **2010**, *17*, 3109-3119.
191. Slany, A.; Haudek, V. J.; Zwickl, H.; Gundacker, N. C.; Grusch, M.; Weiss, T. S.; Seir, K.; Rodgarkia-Dara, C.; Hellerbrand, C.; Gerner, C. Cell Characterization by Proteome Profiling Applied to Primary Hepatocytes and Hepatocyte Cell Lines Hep-G2 and Hep-3B. *Journal of Proteome Research* **2010**, *9*, 6-21.
192. Wang, Y. C.; Tang, F. Y.; Chen, S. Y.; Chen, Y. M.; Chiang, E. P. I. Glycine-N Methyltransferase Expression in HepG2 Cells Is Involved in Methyl Group Homeostasis by Regulating Transmethylation Kinetics and DNA Methylation. *Journal of Nutrition* **2011**, *141*, 777-782.
193. Obeid, R.; Herrmann, W. Homocysteine and lipids: S-Adenosyl methionine as a key intermediate. *Febs Letters* **2009**, *583*, 1215-1225.

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace, které jsou součástí dizertační práce:

1. Vaněk, V.; Buděšínský, M.; Kabeleová, P.; Šanda, M.; Kožíšek, M.; Hančlová, I.; Mládková, J.; Brynda, J.; Rosenberg, I.; Koutmos, M.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. Structure-Activity Study of New Inhibitors of Human Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 3652-3665. IF 4,8
2. Mládková, J.; Vaněk, V.; Buděšínský, M. G.; Elbert, T.; Demianová, Z.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. Double-Headed Sulfur-Linked Amino Acids As First Inhibitors for Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase 2. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 6822-6831. IF 5,614
3. Kořínek, M.; Šístek, V.; Mládková, J.; Mikeš, P.; Jiráček, J.; Selicharová, I. Quantification of Homocysteine-related Metabolites and the Role of Betaine-homocysteine S-methyltransferase in HepG2 Cells. *Biomedical Chromatography* **2013**, 27, 111-121. IF 1,945
4. Pícha, J.; Vaněk, V.; Buděšínský, M.; Mládková, J.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. The Development of a New Class of Inhibitors for Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 65, 256-275. IF 3,499
5. Selicharová, I.; Kořínek, Demianova, Z.; Chrudinová, M.; Mládková, J.; Jiráček, J. Effect of Hyperhomocysteinemia and Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase Inhibition on Hepatocyte Metabolites and the Proteome. *BBA- Proteins and Proteomics* **2013**, 1834, 1596-1606. IF 3,733

Manuskript, který je součástí dizertační práce:

6. Mládková, J.; Paterová, J.; Diamond, C. E.; Tryon, K.; Jungwirth, P.; Koutmos, M.; Garrow, T. A.; Jiráček, J. Structural Role of Potassium Ions in the Catalytic Activity of Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase. Manuskript připravený k odeslání do časopisu *Journal of Biological Chemistry*.

Publikace, které nejsou součástí dizertační práce:

7. Selicharová, I.; Šanda, M.; Mládková, J.; Ohri, S.S.; Vashishta, A.; Fusek, M.; Jiráček, J.; Větvička, V. 2-DE Analysis of Breast Cancer Cell Lines 1833 and 4175 with Distinct Metastatic Organ-specific Potentials: Comparison with Parental Cell Line MDA-MB-231. *Oncology Reports* **2008**, 19, 1237-1244. IF 1,524

8. Mládková, J.; Šanda, M.; Matoušková, E.; Melicharová, I. Phenotyping Breast Cancer Cell Lines EM-G3, HCC1937, MCF7 and MDA-MB-231 Using 2-D Electrophoresis and Affinity Chromatography for Glutathione-binding proteins. *BMC Cancer* **2010**, 10, 449 IF 3,15

PŘÍLOHY