

## Abstrakt

Tubulin v buňce podléhá posttranslačním modifikacím, jež vytvářejí funkčně odlišné mikrotubuly a označují je pro specializované funkce. Jednou z takovýchto posttranslačních modifikací je acetylace Lys40  $\alpha$ -tubulinu, která je řízena aktivitou histondeacetylasy 6 (HDAC6). Acetylace Lys40 je charakteristickým znakem stabilních mikrotubulů. Chrání je před mechanickým stárnutím, ovlivňuje pohyblivost buněk, jakož i větvení axonů a stabilizaci dendritů. Tubulin vyniká jako nejvýznamnější fyziologický substrát pro HDAC6. HDAC6 je multidoménovým cytosolickým proteinem podílejícím se na nesčetných buněčných procesech a je slibným cílem léčby rakoviny a neurodegenerativních chorob. Pochopení mechanismů interakce HDAC6 s jeho substráty, zejména s tubulinem, může otevřít cestu pro vývoj nových léčebných strategií využívajících vysoce selektivní inhibitory HDAC6.

V této práci jsme zkoumala molekulární podstatu jak HDAC6 rozpoznává tubulin. Naše detailní kinetická analýza ukazuje, že deacetylace volného tubulinu pomocí HDAC6 je 1500krát rychlejší než deacetylace mikrotubulů. Dále jsme ukázali, že na rozdíl od aminokyselin podílejících se na podélných a laterálních interakcích mezi tubulinovými dimery, aminokyseliny flexibilní smyčky obsahující Lys40 (s výjimkou míst P1 a P-1) příliš nepřispívají k rozpoznávání substrátu pomocí HDAC6. Kromě toho jsme ukázali přímou vazbu HDAC6 na mikrotubuly a kvalitativně i kvantitativně tuto vazbu zmapovali. Také jsme identifikovali N-konec HDAC6 jako doménu vázající se na mikrotubuly (MBD), a ukázali, že interakce HDAC6 s tubulinem (mikrotubuly) jsou řízeny iontovými (elektrostatickými) silami. Je zajímavé, že zatímco vazba HDAC6 na mikrotubuly nezávisí na jeho deacetylační aktivitě, přítomnost MBD zvyšuje deacetylaci tubulinu více než 100krát. Naše výsledky tak poskytují základní informace o mechanismu rozpoznávání tubulinu resp. mikrotubulů pomocí HDAC6.

Naše zkušenosti s biochemickými metodami a rentgenovou krystalografií jsme se také využili při vývoji specifického inhibitoru pro HDAC6 (SS-208), jenž obsahuje skupinu vázající zinek na bázi hydroxamátu isoxazolu. Tento inhibitor je vysoce specifický pro HDAC6 a současně slabě inhibuje HDAC1. Experimenty *in vivo* ukázaly, že SS-208 omezuje růst nádoru tím, že podporuje protinádorovou imunitní reakci, aniž by vykazoval přímý cytotoxický efekt vůči nádorovým buňkám.