

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Doktorský studijní program: Biochemie



Mgr. Kseniya Ustinova

Substrátová specifita histondeacetylas

Školitel: RNDr. Cyril Bařinka, Ph.D.

Praha, 2020

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 α -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.

Obsah

Abstrakt	iii
1 Úvod.....	1
2 Cíle práce	2
3 Výsledky a diskuse.....	3
3.1 Human histone deacetylase 6 shows strong preference for tubulin dimers over assembled microtubules.....	3
3.2 The disordered N-terminus of HDAC6 is a microtubule-binding domain critical for efficient tubulin deacetylation.....	6
3.3 Rational discovery of a new isoxazole-3-hydroxamate-based histone deacetylase 6 inhibitor SS-208 with antitumor activity in syngeneic melanoma mouse models	10
4 Závěry	12
Seznam literatury	13
Životopis	14
Seznam publikací.....	15

1 Úvod

Histondeacetylasy (HDAC) jsou důležitou třídou enzymů, které katalyzují odštěpení acetylové skupiny z ϵ -N-acetyl-lysinu histonů. Histony byly prvním identifikovaným substrátem pro histondeacetylasy. Deacetylace histonů způsobuje zvýšení jejich pozitivního náboje, což vede ke zvýšení vazby mezi histony a DNA. Jméno této třídy bylo navrženo Tauntonem a kol., [1] kteří objevili prvního zástupce rodiny HDAC. Spolu s histonacetyltransferasami (HAT) (EC 2.3.1.48) [2] tvoří histondeacetylasy (EC 3.5.1.98) jemně vyladěný systém [3, 4], podílející se na epigenetické regulaci, regulaci buněčného cyklu a růstu buněk [5]. V našich studiích jsme se zaměřili na HDAC6 - jediného zástupce rodiny HDAC se dvěma homologními katalytickými doménami.

Na rozdíl od ostatních histondeacetylasy vykazuje HDAC6 deacetylační aktivitu hlavně na cytosolických nehistonových substrátech např. tubulinu [6, 7], proteinu tepelného šoku 90 [8, 9], kortaktinu [10] a mnoha dalších [11]. V důsledku toho může regulovat nesčetné množství fyziologických drah včetně buněčné migrace, buněčné proliferace a smrti, pohyblivosti spermií, intracelulárního transportu, buněčné signalizace, imunitní odpovědi, transkripce, degradace nesbalených proteinů a agregátů a dráh signalizujících buněčný stres [12, 13]. Jeho zvýšená exprese v rakovinách podporuje buněčnou migraci a vznik metastáz. Chybná regulace HDAC6 koreluje se vznikem nádorů. HDAC6 je možno využít také jako diagnostický marker. HDAC6 je regulátorem buněčné motility, invazivity fibroblastů [6] a karcinomových buněk [14]. Zároveň inhibice HDAC6 spojená s následným omezením nádorové angiogeneze a spouštěním apoptózy může být považována za slibnou strategii v léčbě rakoviny.

Hubbert a kol. v roce 2002 identifikovali tubulin jako první nehistonový substrát pro HDAC6 [6]. Ačkoliv je známo, že acetylace stabilizuje mikrotubuly a chrání je před mechanickým poškozením, tím, že zvyšuje jejich flexibilitu [15], v současné době neexistuje podrobná kinetická analýza deacetylace tubulinu aktivitou HDAC6. Zatímco tubulindeacetylasy aktivita HDAC6 byla jednoznačně přiřazena druhé katalytické doméně, neexistují prakticky žádné informace o příspěvku jiných domén k interakcím HDAC6 s tubulinem. Cílem naší studie je zaplnit tuto mezeru s využitím biochemických a biofyzikálních přístupů.

Nejnovější strategie spočívají ve vývoji nových tříd inhibitorů histondeacetylasy, které by měly mít lepší terapeutický efekt a současně minimalizovat vedlejší nežádoucí účinky. Kombinace inhibitorů histondeacetylasy s proteasovými inhibitory, hormonální terapií, inhibitory tyrosinkinasy a činidly metylujícími DNA má slibné preklinické vyhlídky. Kombinace inhibitorů signální dráhy PD-1 v imunitních buňkách spolu s inhibitory histondeacetylasy je považována za průlom v léčbě rakoviny [16].

2 Cíle práce

Předmětem této práce je studium substrátové specifity lidské histondeacetylasy 6 (HDAC6). Zaměřili jsme se na objasnění molekulární podstaty interakcí mezi lidským HDAC6 a tubulinem, nejlépe charakterizovaným fyziologickým substrátem HDAC6. Dále jsme zkoumali, jakým způsobem rozpoznává HDAC6 dvě hlavní formy tubulinu - volné tubulinové dimery a polymerní mikrotubuly. Naším dalším cílem bylo zjistit, které domény nebo strukturní motivy HDAC6 jsou důležité pro interakce s mikrotubuly. Také nás zajímalo, zda souhra mezi jednotlivými doménami HDAC6 ovlivňuje katalytickou aktivitu HDAC6 vůči různým typům substrátů.

Cílem této práce bylo:

- Zaklonování lidského HDAC6, jeho mutantů a ortologů
- Nalezení nejvhodnějšího heterologního systému a optimalizace podmínek pro expresi HDAC6 (*Kluyveromyces lactis* nebo HEK293)
- Optimalizace postupů přečištění HDAC6 z velkoobjemové produkce
- Podrobná kinetická charakterizace HDAC6 jako tubulindeacetylasy
- Identifikace interakčního rozhraní HDAC6 a tubulinu či mikrotubulů
- Podrobný popis mechanismu interakce HDAC6 s mikrotubuly až na úroveň jedné molekuly
- Návrh struktury a biologická charakterizace nových vysoce specifických inhibitorů HDAC6

3 Výsledky a diskuse

3.1 Human histone deacetylase 6 shows strong preference for tubulin dimers over assembled microtubules

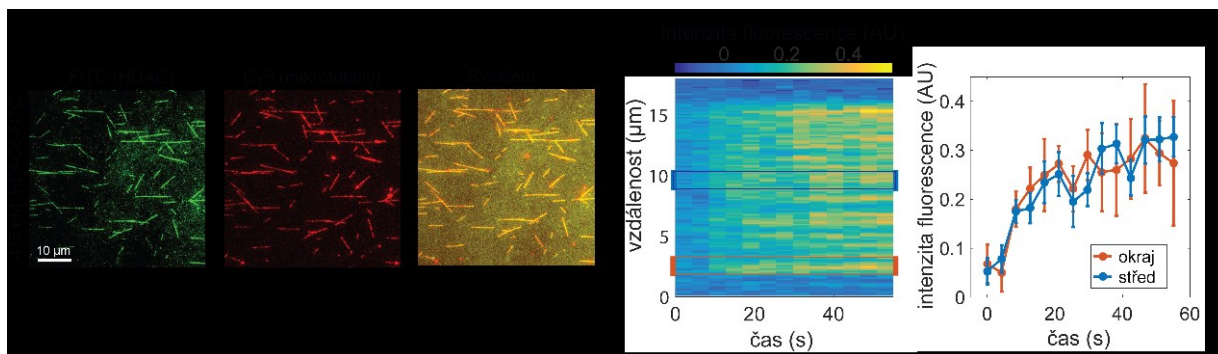
Úvod a motivace studie

Jedním z regulačních mechanismů buňky ovlivňujícím funkci a dynamiku tubulinu a mikrotubulů jsou posttranslační modifikace tubulinu. Nacházejí se hlavně na polymerizovaných mikrotubulech a ovlivňují jejich strukturu a interakci s jinými (dalšími) buněčnými strukturami. Obecně se posttranslační modifikace vyskytují na nestrukturovaných C-koncích tubulinu, avšak lysin 40 α -tubulinu (K40) je situován ve flexibilní smyčce, která směřuje dovnitř mikrotubulu [17]. Acetylace K40 je jednou z nejvíce konzervovaných posttranslačních modifikací a její hladina je řízena protichůdnými aktivitami tubulin acetyltransferasy a HDAC6 [15]. Acetylace K40 je charakteristickým znakem stárnutí mikrotubulů a zabraňuje jejich mechanickému poškození. Mimo jiné může tato acetylace sama o sobě ovlivnit pohyblivost spermií, plodnost, buněčnou signalizaci, buněčný cyklus, intracelulární transport či neurodegenerativní onemocnění.

Ačkoli byl HDAC6 objeven před více než 20 lety, bližší informace o jeho schopnosti deacetylovat různé isoformy tubulinu nebyly dosud publikovány. Většina předchozích studií používala buď pouze částečně přečištěný HDAC6, nebo jeho orthology, případně zkrácené varianty lidského HDAC6. Dostupné informace o substrátové specifitě HDAC6 jsou tedy omezené a často si protirečí. V této práci jsme použili lidský HDAC6 s čistotou >98% a tubulin k biochemické charakterizaci deacetylační aktivity HDAC6. Dále jsme zkoumali interakci HDAC6 s mikrotubuly pomocí mikroskopie na bázi fluorescence s totálním vnitřním odrazem (Total Internal Reflect Fluorescence; TIRF).

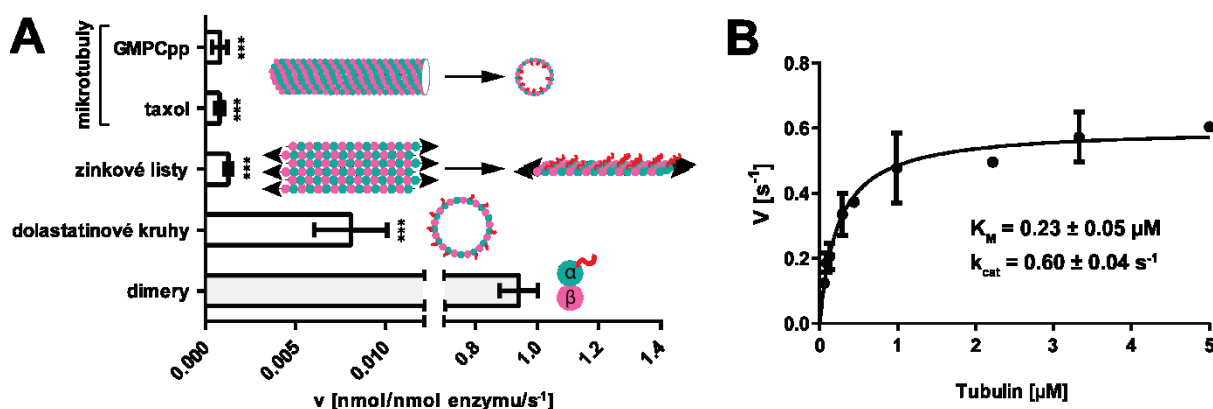
Shrnutí výsledků a závěr

K měřením s využitím fluorescenčního mikroskopu i biochemické charakterizaci deacetylační aktivity jsme použili rekombinantní, vysoce aktivní, lidský HDAC6 a tubulin izolovaných z prasečích mozků. Jako první jsme pomocí TIRF mikroskopie dokázali přímou vazbu HDAC6 na mikrotubuly (obr. 1A). Naměřená data dále ukazují na rychlou kinetiku vazby mezi HDAC6 a mikrotubuly. Na základě kvantifikace signálu této vazby lze říci, že distribuce HDAC6 je rovnoměrná po celé délce mikrotubulů. HDAC6 se pravděpodobně váže spíše na vnější povrch mikrotubulů, aniž by preferoval jejich konce (obr. 1B), na rozdíl od α -tubulin N-acetyltransferazy, která dle dostupných informací upřednostňuje difuzi otevřenými konci do lumen mikrotubulů. V přítomnosti inhibitoru Nexturastat A nebyla ovlivněna vazba HDAC6 na mikrotubuly, z čehož lze usoudit, že pro účinnou vazbu na mikrotubuly není vyžadována deacetylační aktivita HDAC6.



Obrázek 1. Interakce HDAC6 s mikrotubuly. A) HDAC6 značený FITC (zelená) interaguje přímo s mikrotubuly (červená) imobilizovanými na povrchu krycího sklíčka. Fluorescenční signály mikrotubulů a HDAC6 jsou lokalizovány po celé délce mikrotubulů (žlutá). B, C) Fúze GFP-HDAC6 se rovnoměrně váže po celé délce mikrotubulů - bylo pozorováno rovnoměrné zvýšení intenzity fluorescence GFP. Kymograf v panelu B zobrazuje průměrnou (po odečtení pozadí) intenzitu fluorescence GFP čtyř mikrotubulů stejné délky (přibližně 12 μm) po přidání HDAC6-GFP v intervalu 0 až 60 sekund. Panel C ukazuje zprůměrovaný signál GFP (\pm s.d.) v průběhu času na okraji mikrotubulů (oranžová čára) a ve středu (modrá čára). 1,5 μm oblasti použité pro zprůměrování jsou v kymografu B) označeny oranžovými a modrými obdélníky.

Dále jsme se zaměřili na získání kvantitativních a kvalitativních dat ohledně substrátové specifity HDAC6 pro různé formy tubulinu. Volný tubulinový dimer byl deacetylován HDAC6 výrazně efektivněji než různé polymerní formy tubulinu. Účinnost deacetylase byla v případě mikrotubulů snížena 1500krát, v případě zinkových listů 750krát a v případě dolastatinových kruhů 100krát (obr. 2A). Jak zinkové listy, tak dolastatinové kruhy mají peptidovou sekvenci obsahující Lys40 exponovanou, avšak rychlost jejich deacetylase se podstatně liší. Dospěli jsme tedy k závěru, že aminokyseliny tvořící jak boční, tak podélné kontakty v tubulinových polymerních mřížkách jsou zásadní pro deacetylaci aktivitou HDAC6.



Obrázek 2. Deacetylase volných tubulinových dimerů a tubulinových polymerních forem aktivitou HDAC6
 A) HDAC6 vykazuje zvýšenou deacetylační aktivitu na tubulinových dimerech oproti zinkovým listům, dolastatinovým kruhům a mikrotubulům stabilizovaným taxolem či GMPCPP. Data byla získána kvantifikací z Western přenosu. Volné tubulinové dimery jsou deacetylovány 100krát až 1500krát účinněji než tubulinové polymerní formy. α -tubulin je označen modře, β -tubulin růžově a acetylová skupina červeně. B) Rovnovážná kinetika deacetylase dimeru tubulinu pomocí HDAC6. Michaelis-Mentenovy konstanty (K_m a k_{cat}) byly vypočteny z nelineární regresní křivky pomocí programu GraphPad.

HDAC6 deacetyluje různě dlouhé peptidy odvozené od flexibilní smyčky obsahující lysin 40, přičemž rychlost reakce je nepřímo úměrná délce peptidu. V porovnání s tubulinovými dimery byly tyto peptidy deacetylovány s 12krát až 200krát nižší účinností, z čehož lze usoudit, že aminokyseliny smyčky obsahující lysin 40 k vazbě a rozpoznání substrátu příliš nepřispívají. Naopak strukturní prvky mimo tuto smyčku, jako jsou boční a podélná rozhraní, se na vazbě a rozpoznávání substrátu podílejí.

Celkově tato studie nabízí hlubší pochopení vlivu HDAC6 na acetylaci tubulinu v buňce a podrobnou kinetickou analýzu deacetylace tubulinu působením HDAC6 (obr. 2B). Tato deacetylace vyžaduje komplexní interakci se substrátem. Porozumění této interakci by mohlo tvořit základ pro návrh selektivních inhibitorů specificky blokujících deacetylaci tubulinu. Tyto znalosti dále posilují teorii korelace mezi acylací tubulinu a větrem mikrotubulů a mohou pomoci pochopit komplexní systém posttranslačních modifikací v buňkách.

3.2 The disordered N-terminus of HDAC6 is a microtubule-binding domain critical for efficient tubulin deacetylation

Úvod a motivace studie

Přestože je tubulin hlavním fyziologickým substrátem HDAC6, není dosud známo, jak přesně ho HDAC6 rozpoznává a interaguje s ním. Mapováním interakcí HDAC6 s tubulinem můžeme získat nové informace o funkčnosti enzymu a lépe pochopit mechanismus fyziologických procesů založených na acetylaci tubulinu. V předchozí studii jsme ukázali přímou vazbu lidského HDAC6 na stabilizované mikrotubuly. HDAC6 se váže na mikrotubuly rovnoměrně po celé jejich délce, aniž by upřednostňoval konce. Tato vazba je charakteristická svou rychlou kinetikou. Dále jsme poskytli kvantitativní údaje o deacetylaci různých forem tubulinu působením HDAC6. Z našich výsledků vyplývá, že HDAC6 upřednostňuje volný tubulin ve srovnání s polymerovanými mikrotubuly. Předpokládali jsme, že kromě dvou katalytických domén mohou k rozpoznání, vazbě a deacetylaci tubulinu přispívat i další domény HDAC6.

Proto jsme za použití souboru biofyzikálních a biochemických metod zmapovali molekulární základ interakcí mezi HDAC6 a různými tubulinovými formami. Tyto znalosti nám mohou poskytnout základní informace o tom, jakým způsobem rozpoznává HDAC6 tubulin a mikrotubuly, jaký je jeho vliv na polymeraci mikrotubulů nebo mohou být užitečné při navrhování a vývoji inhibitorů specificky zaměřených na systém HDAC6-tubulin.

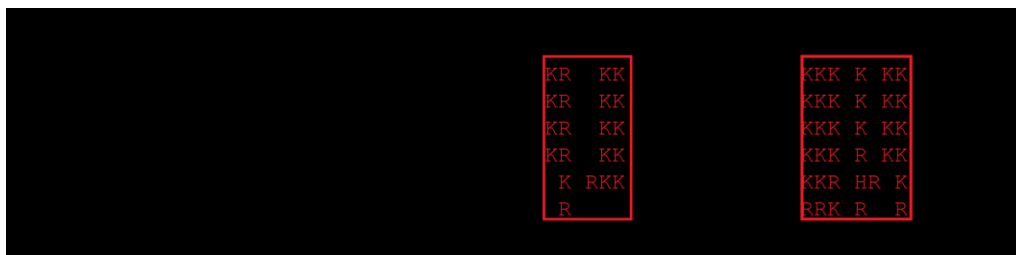
Shrnutí výsledků a závěr

Pomocí heterologní exprese, cílené mutagenese a dalších biochemických a biofyzikálních metod jsme identifikovali N-koncovou nestrukturovanou doménu HDAC6 jako doménu zodpovědnou za vazbu na mikrotubuly. Tuto doménu jsme pak funkčně charakterizovali až na úroveň jednotlivých molekul.

Připravili jsme sadu zkrácených variant HDAC6, u nichž jsme následně ověřili enzymatickou aktivitu a dále je použili k experimentu, jehož cílem bylo zjistit vazebné schopnosti jednotlivých konstruktů na mikrotubuly. Afinity vazby lidského HDAC6 s mikrotubuly je $\text{appKD} = 135 \pm 9 \text{ nM}$. Dále byl ukázán způsob interakce HDAC6 s mikrotubuly. Na úrovni jednotlivých molekul jsme zjistili dvě převládající interakce, a to buď vazba, nebo jednosměrná difúze.

Z výsledků vyplývá, že katalytické domény HDAC6 do vazby na mikrotubuly zapojeny nejsou. Ani nenaktivní mutant HDAC6, ani HDAC6 v komplexu s inhibitorem Nexturastat A, stejně jako HDAC6 divokého typu, nevykazovaly žádný rozdíl v afinitě k mikrotubulům, což naznačuje zásadní roli ostatních domén HDAC6 ve vazbě na mikrotubuly. Pomocí TIRF mikroskopie jsme ukázali, že katalytické domény HDAC6 se na rozdíl od konstruktů obsahujících N-koncovou doménu na

mikrotubuly neváží. Stanovení afinity N-koncové domény ukázalo, že je primárně zodpovědná za interakci HDAC6 s mikrotubuly se zdánlivou disociační konstantou 98 ± 9 nM. Peletovací stanovení naše předchozí výsledky potvrdilo.

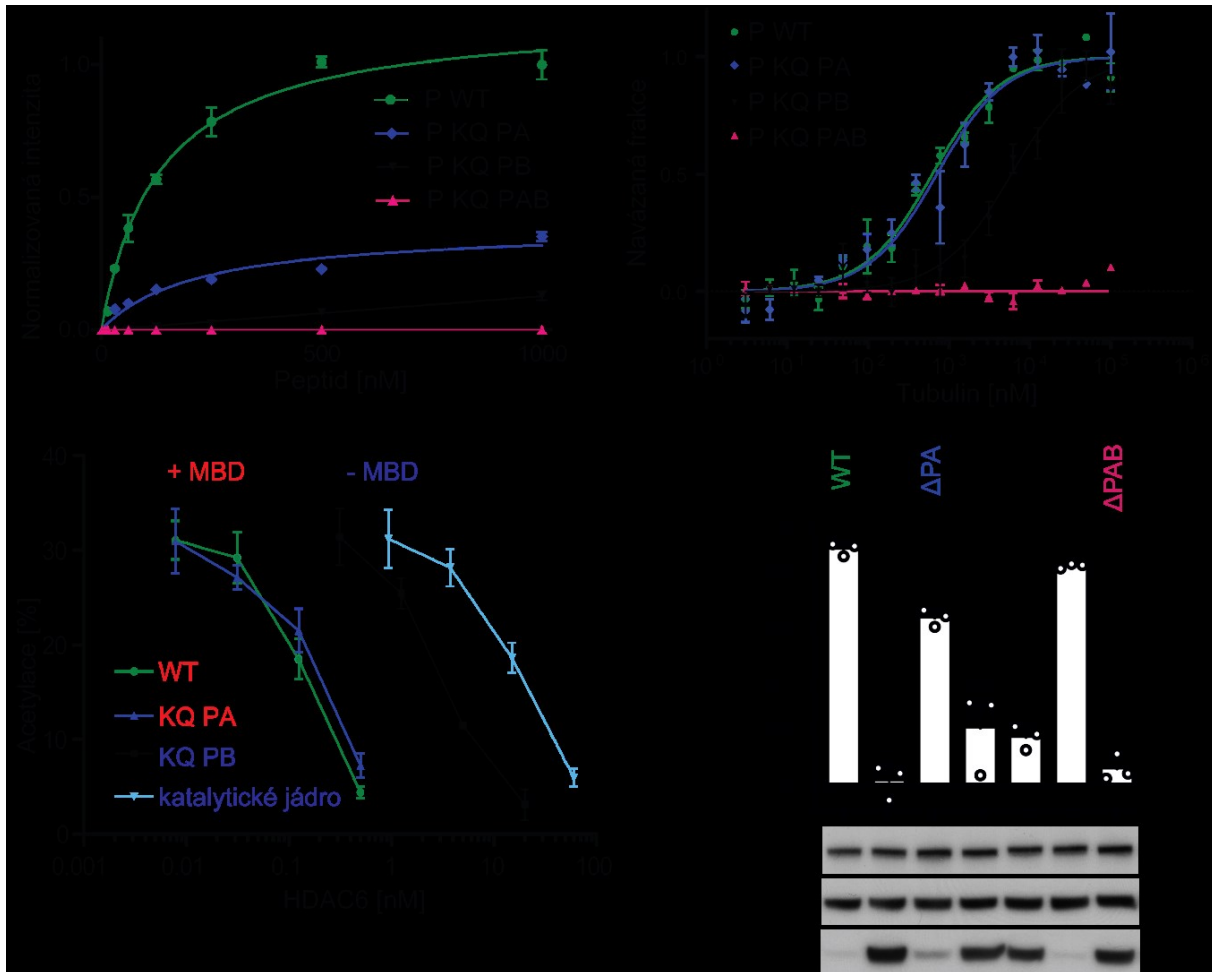


Obrázek 1. Porovnání sekvencí N-koncových domén HDAC6 z různých organismů. Mikrotubulární vazebné motivy HDAC6 zahrnují kladně nabitě oblasti obsahující aminokyseliny Lys-32 až Lys-37 (oblast A) a Lys-51 až Lys-58 (oblast B).

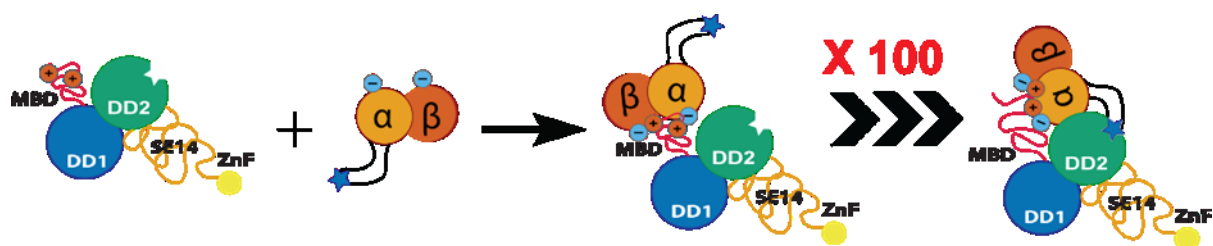
Identifikovali jsme N-koncovou doménu jako doménu vázající se na mikrotubuly (MBD) a funkčně ji charakterizovali až na úroveň jednotlivých molekul. Identifikovali jsme aminokyseliny zapojené do této interakce, které se nacházejí ve dvou kladně nabitých oblastech obsahující Lys-32 až Lys-58 (obr. 1).

Připravili jsme mutanty HDAC6, kde byl acetylovaný lysin v oblastech A a B mimikován glutaminem, který je mu strukturně podobný. Tyto mutantní varianty vykazovaly nižší vazebnou afinitu pro mikrotubuly. Výraznější účinek byl pozorován v případě mutace v oblasti B (KQ PB). Tato zjištění jsme ověřili dalšími experimenty za použití odpovídajících syntetických peptidů. Peptidy obsahující sekvenci divokého typu (P-WT), mutace v oblasti A (P KQ PA), v oblasti B (P KQ PB) či v obou místech (P KQ PAB) měly stejnou afinitu pro mikrotubuly jako mutanty HDAC6 (obr. 2A). Získaná data potvrdila, že je tento motiv zodpovědný za vazbu na mikrotubuly, a to bez účasti ostatních domén HDAC6. Ukázalo se, že vazba HDAC6 na mikrotubuly je zprostředkována elektrostatickými interakcemi mezi záporně nabitým povrchem mikrotubulů a oblastmi HDAC6 s kladným nábojem, které obsahují větší počet lysinů.

MBD HDAC6 je nezbytná nejen pro interakce s mikrotubuly, ale také pro interakce s tubulinovými dimery. S použitím Microscale Thermophoresis (MST) byla stanovena afinita MBD k tubulinovým dimerům na $appKD 577 \pm 102$ nM (obr. 2B). V případě zkrácených konstruktů bez MBD byla účinnost deacetylase tubulinových dimerů pomocí HDAC6 50krát až 120krát nižší (obr. 2C). Tato *in vitro* data byla podložena experimenty *in vivo*. Buňky HDAC6 KO byly transfekovány konstrukty obsahujícími zkrácené varianty HDAC6 a následně byla kvantifikována hladina acetylase buněčného tubulinu. Jak *in vitro*, tak *in vivo* experimenty prokázaly stejnou aktivitu mutantů, což naznačuje, že MBD (zejména oblast B) se významně podílí na deacetylační aktivitě HDAC6.



Obrázek 2. Oblasti MBD jsou zásadní pro vazbu a deacetylaci tubulinu a mikrotubulů. A) Zdánlivé disociační konstanty (appKD) pro peptidy odvozené od MBD HDAC6 - P WT (peptid odvozený od HDAC6 divokého typu); KQ PA (peptid odvozený od varianty HDAC6 s mutacemi v oblasti A); KQ PB (peptid odvozený od varianty HDAC6 s mutacemi v oblasti B); KQ PAB (peptid odvozený od varianty HDAC6 s mutacemi v oblastech A i B) byly vypočteny z vazebných izoterm získaných pomocí TIRF mikroskopie. Zdánlivá disociační konstanta pro P WT byla 131 ± 5 nM. Peptidy odvozené od varianty HDAC6 s mutacemi v obou oblastech vykazovaly nižší vazebnou afinitu pro mikrotubuly. Ještě nižší afinita byla pozorována v případě peptidu KQ PB. Nebyla pozorována žádná vazba pro KQ PAB peptid. B) Vazebná afinita peptidů odvozených od MBD HDAC6 pro dimery volného tubulinu byla kvantifikována pomocí MST. Vypočtené zjevné hodnoty appKD byly 577 ± 102 nM pro divoký typ (P WT), 665 ± 181 nM pro variantu s mutacemi v oblasti A (P KQ PA) a 5898 ± 800 nM pro variantu s mutacemi v oblasti B (P KQ PB). Pro variantu s mutacemi v obou oblastech, tedy A i B (P KQ PAB), nebyla pozorována žádná vazba. C) Deacetylační aktivita variant HDAC6 na volných tubulinových dimerech. Pro účinnou deacetylaci tubulinu je vyžadována 40krát až 150krát vyšší koncentrace variant HDAC6 bez MBD či s mutacemi v oblasti B (-MBD, modrá) oproti variantám s MBD či s mutacemi v oblasti A (+ MBD, červená). D) Deacetylační aktivita variant HDAC6 *in vivo* v buňkách HEK293T HDAC6 KO. Zatímco exprese všech variant byla podobná, hladina deacetylce tubulinu byla vysoká v případě variant HDAC6 bez mutací v oblastí B a u varianty s mutací K / R.



Obrázek 3. Mechanismus deacetylace substrátu pomocí HDAC6. MBD HDAC6 interaguje s tubulinem prostřednictvím iontových interakcí, čímž zvyšuje lokální koncentraci komplexu HDAC6 s tubulinem, což vede ke 100krát rychlejší deacetylaci tubulinu.

Součinnost MBD a katalytických domén je rozhodující pro rozpoznání a účinnou deacetylaci volných tubulinových dimerů jak *in vitro*, tak *in vivo* (obr. 2D). Při deacetylaci volného tubulinu zvyšuje přítomnost N-koncové domény účinnost reakce více než 100krát. Tyto výsledky dokazují zásadní vliv domén mimo katalytické jádro na deacetylační aktivitu HDAC6, což může vést k novým strategiím na poli selektivní inhibice HDAC6.

3.3 Rational discovery of a new isoxazole-3-hydroxamate-based histone deacetylase 6 inhibitor SS-208 with antitumor activity in syngeneic melanoma mouse models

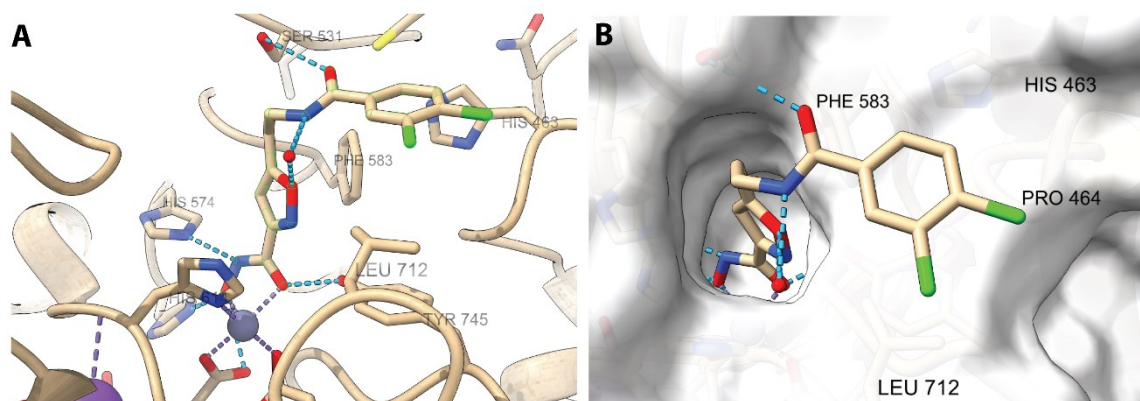
Úvod a motivace studie

Selektivní inhibitory HDAC6 jsou považovány za potenciální léčiva různých neurologických poruch. V současnosti se v klinických studiích používají pro léčbu mnohočetného myelomu, lymfomu, rakoviny prsu a melanomu částečně selektivní inhibitory HDAC6 ricolinostat (ACY-1215) a citarinostat (ACY-241), a to buď samostatně, nebo v kombinaci s dalšími léčivy. Kombinace selektivního inhibitoru HDAC6 Nexturastat A a inhibitoru PD-1 vedla ke značnému zlepšení protinádorové imunitní odpovědi inhibující růst nádoru [18]. Existují však obavy, že inhibice histondeacetylasy může působit toxicky nebo vyvolat nežádoucí účinky. Vzhledem k omezené selektivitě současných sloučenin specifických pro HDAC6 je nutné identifikovat inhibitory HDAC6 s lepší selektivitou a dobrými farmakologickými vlastnostmi, které by mohly být použity při kombinované terapii rakoviny nebo chronických neurologických onemocnění.

Shrnutí výsledků a závěr

I. Byla navržena a nasyntetizována série inhibitorů histondeacetylasy 6 a určena jejich inhibiční aktivita. Inhibitor 1a, který obsahuje skupinu vázající zinek na bázi isoxazol-3-hydroxamátu, vykazoval výraznou inhibiční aktivitu vůči HDAC6 narušil od jeho analogů 1b a 1c, které obsahují alkylhydroxamátovou, respektive fenyhydroxamátovou skupinu vázající zinek. Na základě vztahu struktury a funkce byla modifikována koncová skupina inhibitoru 1 za vzniku sloučeniny 7b, nazvané SS-208, s vysokou inhibiční aktivitou, která byla použita pro další studie.

II. Inhibitor SS-208 byl krystalován v komplexu s druhou katalytickou doménou HDAC6 z *Danio rerio* a struktura komplexu určena rentgenostrukturní analýzou (obr. 1). Struktura odhalila bidentátní vazbu inhibitoru na zinečnatý ion, který tak vykazuje typickou pětičlennou koordinační sféru. Karbonylový kyslík hydroxamátové skupiny je akceptorem vodíkové vazby z hydroxyly Y745, zatímco N-O skupina interaguje s postranními řetězci H573 a H574. Dále bylo zjištěno, že interakce mezi 3,4-dichlorofenylovou koncovou skupinou inhibitoru a L1 kapsou, která je tvořena postranními řetězci aminokyselin H463, P464, F583 a L712, je důležitá pro selektivitu SS-208 vůči HDAC6.



Obrázek 1. Krystalová struktura komplexu SS-208 s katalytickou doménou 2 histondeacetylasy 6. A) Zobrazení interakcí mezi SS-208 a aminokyselinami, které formují tunel aktivního místa HDAC6. Tyto aminokyseliny a SS-208 jsou znázorněny jako „tyčky“, kde atomy uhlíku jsou béžové, kyslíku červené, dusíku modré a chloru zelené. Zinečnatý ion v aktivním místě je zobrazen jako šedá koule, molekuly vody jako červená koule a vodíkové můstky jako modré přerušované čáry. B) Interakce mezi koncovou skupinou inhibitoru SS-208 a L1 kapsou na povrchu HDAC6, která je tvořena zbytky aminokyselin H463, P464, F583 a L712. HDAC6 je zobrazen jako poloprůhledný povrch.

III. ADMET (absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece a toxicita) testování inhibitoru SS-208 ukázalo, že inhibitor je negativní v Amesově testu, nevykazuje významnou inhibici v hERG (human Ether-à-go-go related gene) stanovení a je metabolicky stabilnější než jeho prekurzor 1a. Ve srovnání s jinými inhibitory HDAC6 jako Tubastatin A a Nexturastat A způsobuje SS-208 v buňkách melanomu pouze minimální buněčnou smrt a zvyšuje úroveň acetylace α -tubulinu. Dále inhibitor SS-208 skrze IL-6 ovlivňuje fosforylaci STAT3 a negativně reguluje expresi PD-L1. Důsledkem je utlumení růstu nádoru v myším syngenickém modelu melanomu SM1. Inhibitor SS-208 dále způsobil infiltraci CD8⁺ buněk a NK buněk do nádoru a také zvýšený poměr makrofágů M1 a M2 v nádorovém mikroprostředí.

Nahrazení fenyl-hydroxamátové skupiny isoxazol-3-hydroxamátovou skupinou tedy výrazně zlepšuje selektivitu inhibitoru vůči HDAC6. This is a promising feature regarding ongoing efforts in the development of HDAC6-selective inhibitors.

4 Závěry

Tato práce ukazuje význam HDAC6 jako hlavní tubulindeacetylasu regulující nesčetné množství buněčných procesů. V publikacích zahrnutých v této práci jsme se zabývali několika různými aspekty fungování HDAC6 - od deacetylace tubulinu až po vývoj specifických inhibitorů pro HDAC6.

Nejprve jsme provedli podrobnou kinetickou studii mechanismu interakce HDAC6 s tubulinem a jeho polymerizovanými formami včetně mikrotubulů. Naše data ukazují, že účinná deacetylace vyžaduje přístupné aminokyselinové zbytky na tubulinových rozhraních zapojených do podélných a laterálních interakcí v mikrotubulové mřížce. Kromě toho jsme identifikovali N-konec HDAC6 jako MBD nezbytný pro interakci s mikrotubuly. Domény mimo katalytické jádro HDAC6 hrají důležitou roli v rozpoznávání tubulinu. Nakonec popisujeme návrh, syntézu a strukturní a biologickou charakterizaci SS-208, nového selektivního inhibitoru HDAC6 na bázi isoxazol-3-hydroxamátu.

Celkově zde představená práce přispěla k rostoucímu množství znalostí o HDAC6, jeho substrátové specifitě, mechanismu interakce s tubulinem a jeho významu při léčbě některých onemocnění.

Seznam literatury

1. Taunton, J., Hassig, C. A. & Schreiber, S. L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p, *Science*. **272**, 408-11.
2. Shida, T., Cueva, J. G., Xu, Z., Goodman, M. B. & Nachury, M. V. (2010) The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**, 21517-22.
3. Berger, S. L. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription, *Nature*. **447**, 407-12.
4. Shahbazian, M. D. & Grunstein, M. (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation, *Annu Rev Biochem*. **76**, 75-100.
5. Abel, T. & Zukin, R. S. (2008) Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders, *Curr Opin Pharmacol*. **8**, 57-64.
6. Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F. & Yao, T. P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase, *Nature*. **417**, 455-8.
7. Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S. & Matthias, P. (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo, *Embo J*. **22**, 1168-79.
8. Kovacs, J. J., Murphy, P. J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J. T., Nicchitta, C. V., Yoshida, M., Toft, D. O., Pratt, W. B. & Yao, T. P. (2005) HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor, *Mol Cell*. **18**, 601-7.
9. Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., Seto, E. & Bhalla, K. (2005) Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors, *J Biol Chem*. **280**, 26729-34.
10. Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J. T., Yang, X. J., Dent, S. R., Yao, T. P., Lane, W. S. & Seto, E. (2007) HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin, *Mol Cell*. **27**, 197-213.
11. Aldana-Masangkay, G. I. & Sakamoto, K. M. (2011) The role of HDAC6 in cancer, *J Biomed Biotechnol*. **2011**, 875824.
12. Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A. & Yao, T. P. (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress, *Cell*. **115**, 727-38.
13. Boyault, C., Sadoul, K., Pabion, M. & Khochbin, S. (2007) HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination, *Oncogene*. **26**, 5468-76.
14. Saji, S., Kawakami, M., Hayashi, S., Yoshida, N., Hirose, M., Horiguchi, S., Itoh, A., Funata, N., Schreiber, S. L., Yoshida, M. & Toi, M. (2005) Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer, *Oncogene*. **24**, 4531-9.
15. Xu, Z. J., Schaedel, L., Portran, D., Aguilar, A., Gaillard, J., Marinkovich, M. P., They, M. & Nachury, M. V. (2017) Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation, *Science*. **356**, 328-332.
16. Suraweera, A., O'Byrne, K. J. & Richard, D. J. (2018) Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi, *Front Oncol*. **8**.
17. Sadoul, K. & Khochbin, S. (2016) The growing landscape of tubulin acetylation: lysine 40 and many more, *Biochem J*. **473**, 1859-68.
18. Knox, T., Sahakian, E., Banik, D., Hadley, M., Palmer, E., Noonepalle, S., Kim, J., Powers, J., Gracia-Hernandez, M., Oliveira, V., Cheng, F. D., Chen, J., Barinka, C., Pinilla-Ibarz, J., Lee, N. H., Kozikowski, A. & Villagra, A. (2019) Selective HDAC6 inhibitors improve anti-PD-1 immune checkpoint blockade therapy by decreasing the anti-inflammatory phenotype of macrophages and down-regulation of immunosuppressive proteins in tumor cells, *Sci Rep-Uk*. **9**.

Životopis

Kseniya Ustinova, Mgr.

Narozena: 18.03.1993, Horodok, Ukrajina

ZAMĚSTNÁNÍ

Laboratoř strukturní biologie,
Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., BIOCEV
Průmyslová 595,252 50 Vestec, Česká republika
orcid.org/0000-0001-6632-5850
ResearcherID: L-7261-2017

VZDĚLÁNÍ

- 2015 – up to now Univerzita Karlova, Praha, Česká republika, Ph.D. student., Biochemie
- 2015 – up to now Laboratoř strukturní biologie, Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i.,
BIOCEV, Ph.D. student,
Disertační práce: Substrate specificity of histone deacetylases
- 2014 – 2015 Lvovská národní univerzita Ivana Franka, Ukrajina, Mgr., Biochemie
Diplomová práce: Vliv cysteinové desulfurázy NFS1 na odolnost kvasinek
Saccharomyces cerevisiae vůči isobutanolu
- 2010 – 2014 Lvovská národní univerzita Ivana Franka, Ukrajina, Bc, Biologie
Bakalářská práce: Inženýrské a biochemické vlastnosti kmenů *Hansenula polymorpha*
s expresí modifikovaného transportéru glukózy / xylózy Sut1p *Pichia stipites*

OCENĚNÍ

- cena za nejlepší přednášku - ARBRE-MOBIEU Prague 2020 plenary meeting, Prague, Česká republika, 2020
- cena za nejlepší přednášku - XV Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, Česká republika, 2018
- cena za nejlepší poster - Joint Meeting of Czech and German Biophysicists, Hünfeld, Německo, 2017

GRANTS AND CERTIFICATES

Popis interakcí mezi tubulinem a histondeacetylase 6 na molekulární úrovni. Hlavní řešitel, Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK), Praha, Česká republika, 1558218, 2018 – 2020

Cambridge ESOL Level 1 Certificate in ESOL International – First Certificate in English

Seznam publikací

Publikace zahrnuté do disertační práce

Skultetyova L., Ustinova K., Kutil Z., Novakova Z., Pavlicek J., Mikesova J., Trapl D., Baranova, P., Havlinova B., Hubalek M., Lansky Z., Barinka C.: **Human histone deacetylase 6 shows strong preference for tubulin dimers over assembled microtubules.** *Sci Rep* **2017**, 7:11547.

Ustinova K., Novakova Z., Saito M., Meleshin M., Mikesova J., Kutil Z., Baranova P., Havlinova B., Schutkowski M., Matthias P., Barinka C.: **The disordered N-terminus of HDAC6 is a microtubule-binding domain critical for efficient tubulin deacetylation.** *J Biol Chem* **2020**, 295:2614-2628.

Shen S., Hadley M., Ustinova K., Pavlicek J., Knox T., Noonepalle S., Tavares M.T., Zimprich Ch.A., Zhang G., Robers M.B., Bařinka C., Kozikowski A.P., Villagra A.: **Discovery of a new isoxazole-3-hydroxamate-based histone deacetylase 6 inhibitor SS-208 with antitumor activity in syngeneic melanoma mouse models.** *J Med Chem* **2019**, 62 (18): 8557-8577.

