

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie

Autoreferát disertační práce



Hydrolasy závislé na zinku: Studium struktury a funkce
glutamátcarboxypeptidasy II a histondeacetylasy 6

Ľubica Škultétyová

Školitel: RNDr. Cyril Bařinka, Ph.D.

Praha, 19. 2. 2018

ABSTRAKT

Proteiny vázající zinek představují přibližně desetinu proteomu a významnou část z nich tvoří hydrolasy závislé na zinku. Tato disertační práce se zaměřuje na biochemickou a strukturní charakterizaci glutamátcarboxypeptidasy II (GCPII) a histondeacetylasy 6 (HDAC6), které jsou členy rodiny metalohydrolas závislých na zinku. Zde popisujeme interakci s jejich přirozenými substráty a inhibitory.

GCPII je homodimerní membránová proteasa, která v centrální a periferní nervové soustavě katalyzuje odštěpení glutamátu z neuropřenašeče N-acetyl-aspartylglutamátu (NAAG) a v tenkém střevě z folátů přijatých v potravě. Tento enzym je spojován s několika neurologickými poruchami, u kterých je možná léčba jeho inhibicí a představuje také ideální cíl pro diagnostiku a léčbu rakoviny prostaty. Inhibitory GCPII se obvykle skládají ze skupiny vázající zinek, propojené s částí vázající inhibitor v S1' místě enzymu (tvořenou glutamátovým zbytkem nebo jeho isosterem). Tyto sloučeniny jsou přirozeně silně hydrofilní molekuly, což brání jejich průniku přes hematoencefalickou bariéru a neumožňuje inhibici GCPII v centrální nervové soustavě. U dosud známých inhibitorů byly vyzkoušeny různé přístupy jak změnit tu část molekuly, která se váže do S1' místa a je odpovědná za jejich hydrofilitu. V této disertační práci představujeme různé strategie zaměřené na záměnu tradičního P1' glutamátového zbytku nevětvenými neproteinogenními aminokyselinami a bioisostery glutamátu, nebo zavedením aminohexanového linkeru. Analýza krystalových struktur komplexů GCPII s těmito novými inhibitory odhalila dosud nepopsanou flexibilitu S1' místa, která umožňuje proteinu GCPII vázat objemné zbytky. Identifikovali jsme nové inhibitory se zvýšenou lipofilitou, které i když nejsou silnými inhibitory, mohou složit jako prekursorů pro následní racionální návrh nových léčiv.

Acetylace lysinu 40 v α -tubulinu chrání mikrotubuly před následky mechanického stárnutí a hraje i roli v buněčném pohybu, větvení axonů a růstu a udržování výběžků neuronů. HDAC6 je hlavní deacetylase tubulinu a jeho význam jakožto možného cíle pro léčbu rakoviny a neurodegenerativních onemocnění stále roste. Tím vzrůstá i potřeba hlubšího pochopení jeho interakce s tubulinovým substrátem. V této práci ukazujeme, že HDAC6 deacetyluje dimery tubulinu 1500 krát vyšší rychlostí než mikrotubuly. Naše data naznačují, že s výhradou aminokyselin na pozicích P₁ a P₋₁ přispívají aminokyseliny obklopující Lys40 k rozpoznávání substrátu minimálně, a že účinná deacetylase vyžaduje komplexní podélné a boční interakce s tubulinovým dimerem.

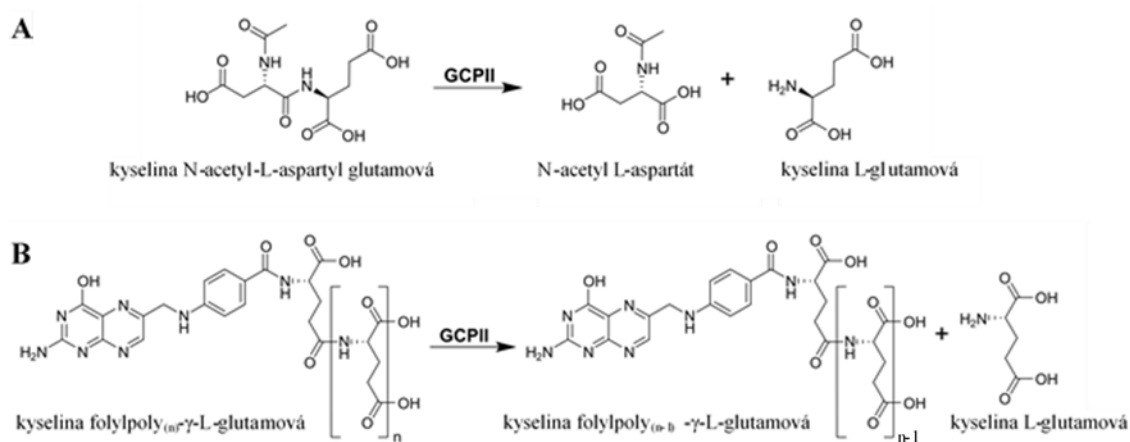
ÚVOD

Hydrolasy závislé na zinku

Hydrolasy závislé na zinku patří do třídy metaloenzymů, pro které jsou ionty zinku nutné při katalýse hydrolytických reakcí. Tato práce předkládá podrobnou studii dvou hydrolas závislých na zinku: GCPII a HDAC6. Zaměřili jsme se na návrh nových inhibitorů GCPII, založený na jeho struktuře a objasnili interakce mezi HDAC6 a jeho přirozeným substrátem tubulinem.

GCPII

Lidská glutamátcarboxypeptidasa II je na zinku závislá membránová C-terminální exopeptidasa [1]. V tenkém střevě tento enzym odštěpuje glutamát z folyl-poly- γ -glutamátů přijatých stravou, což umožňuje jeho vstřebání do krevního oběhu [2]. V nervovém systému funguje GCPII jako NAALADasa a hydrolyticky štěpí neuropeptid N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG). GCPII hydrolyticky inaktivuje NAAG, a to vede k uvolňování N-acetyl-L-aspartátu (NAA) a kyseliny glutamové [3]. Vysoká koncentrace glutamátu v synaptickém prostoru je považována za neurotoxickou a souvisí s neurologickými poruchami, jako je mrtvice, amyotrofická laterální skleróza a Alzheimerova choroba. Funkce GCPII ve zdravé prostatě není jasná, ale vysoké hladiny exprese byly pozorovány



Obrázek 1: Schéma reakcí katalyzovaných GCPII

A) GCPII štěpí NAAG na NAA a kyselinu glutamovou. B) GCPII hydrolyzuje foláty z potravy a tím umožňuje jejich absorpci v tenkém střevě

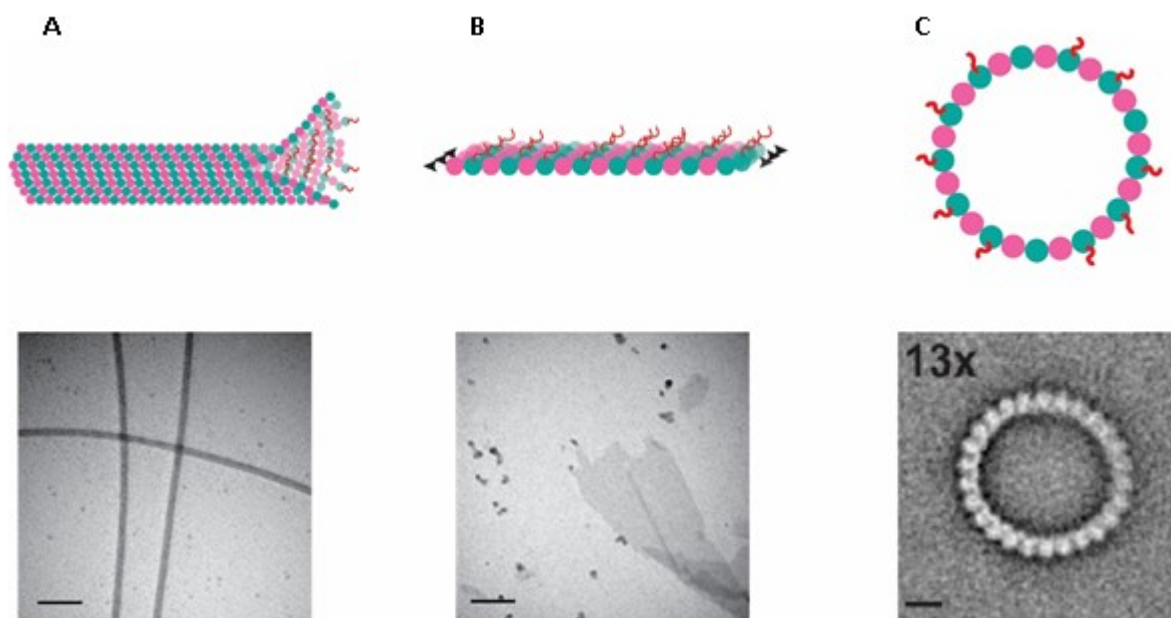
u karcinomu prostaty. Velký rozdíl v hladinách exprese mezi zdravou a rakovinnou prostatickou tkání činí z GCPII významný marker rakoviny prostaty. Obecně se inhibitory GCPII skládají z skupiny vázající zinek (ZBG) a částí směřující inhibitor do S1' místa enzymu (obvykle glutamátové skupiny nebo jejího isosteru). Inhibitory GCPII používané v současnosti lze rozdělit do čtyř skupin založených na povaze skupiny vázající zinek: 1) inhibitory na bázi fosforu (na bázi fosfonátu, fosfátu a fosforamidu) 2) sloučeniny na bázi močoviny 3) thioly a 4) hydroxamáty. Mezi nejúčinnější inhibitory GCPII patří 2-fosfonomethylpentandiová kyselina (2-PMPA) ($K_i = 0,3 \text{ nM}$) na bázi fosfonátu a DCIBzL na bázi močoviny ($K_i = 0,01 \text{ nM}$). Role GCPII v některých poruchách centrálního nervového systému (CNS) z něj činí atraktivní cíl pro syntézu vysoce lipofilních inhibitorů. Schopnost překonat hematoencefalickou bariéru je základním požadavkem na léky s účinkem v CNS. Ve většině vysoce afinitních inhibitorů GCPII je v poloze P1' glutamát nebo jeho mimetikum, protože S1' farmakoforová kapsa je optimalizována pro vazbu glutamátu a proto jeho použití v poloze P1' výrazně zvyšuje inhibiční účinnost dané sloučeniny. Nicméně přítomnost glutamátu/glutarátu v poloze P1' negativně ovlivňuje lipofilní povahu inhibitorů GCPII [4].

HDAC6

HDAC6 patří do rodiny histon deacetylas, které katalyzují hydrolytické odštěpení acetylové skupiny z ϵ -aminoskupiny lysinu. Mezi 18 členy rodiny deacetylas lidských histonů je HDAC6 jediným zástupcem s plně duplikovanou deacetylační doménou [5].

I když bylo identifikováno více než 20 substrátů HDAC6, vyniká mezi nimi tubulin jakožto nejhojnější a nejdůležitější substrát. α - a β -tubuliny jsou globulární proteiny, které tvoří 110 kDa heterodimer. Dimer slouží jako stavební prvek tubulinových polymerů. α/β podjednotky se vážou od hlavy k ocasu a vytvářejí protofilamenty. Tyto následně interagují laterálně za vzniku různých

typů polymerů, které jsou stabilizovány bočními a podélnými interakcemi mezi podjednotkami. Podélné vazby jsou mezi dvěma následujícími podjednotkami a propojují je do lineárního protofilamentu. Boční interakce spojují protofilamenty vedle sebe, aby vytvořily list nebo mikrotubul. Během depolymerizace mikrotubulů dochází k oslabení bočních interakcí mezi protofilamenty, a ty se začnou vytáčet směrem ven. Takto zakřivené se buď rozpadnou, nebo uzavřou za vzniku tubulinových kroužků. V přítomnosti dolastatinu-10 se vytvoří tubulinové kroužky s jedním kruhem, které napodobují tyto depolymerizační produkty (obrázek 2C) [6].



Obrázek 2: Tubulinové polymery

Přidání některých sloučnin má za následek polymerizaci tubulinu. Schémata doprovázejí obrázky z mikroskopu. (A) Přidání GTP vyvolává tvorbu mikrotubulů. (B) Ve vysokých koncentracích zinku polymerizuje tubulin za vzniku zinkových listů s protofilamenty v antiparalelní orientaci. (C) Dolastatin-10 nutí tubulinová filamenta aby se zkroutily za vzniku kruhů z 13 - 15 tubulinových podjednotek. Čáry v (A) a (B) = 200 nm, v (C) = 40 nm. α - a β - tubulin znázorněn jako růžové a zelené kuličky, acetylace jako červená křivka, černé šipky naznačují orientaci protofilamentů. Autorka LS, obrázky dolastatinových kruhů z mikroskopu Moores & Milligan, 2008.

Zinek při koncentracích vyšších než 50 μM a při pH 5,5-5,8 indukuje tvorbu zinkových listů o šířce až 2 μm . Tyto se podobně jako MT skládají z protofilament, i když v antiparalelní orientaci (obr. 2B) [7].

Mikrotubuly jsou tvořeny 11-15 protofilamenty stejné orientace uspořádaných vedle sebe (obrázek 2A).

Bylo prokázáno, že acetylace se podílí na mechanické stabilizaci mikrotubulů a chrání je před mechanickým stárnutím [8]. Snížení acetylace tubulinu bylo pozorováno při Alzheimerově a Huntingtonově nemoci. α TAT1 (α -tubulin N-acetyltransferáza 1) a HDAC6 se považují za hlavní tubulin acetyltransferasu a deacetylasu v buňkách savců [9,10]. Tubulin acetyltransferasa acetyluje mikrotubuly 4-6 krát rychleji než tubulínové dimery a bylo prokázáno, že pro optimální aktivitu jsou vyžadovány laterální interakce. Tubulin byl identifikován jako substrát pro HDAC6 v roce 2002, ale doposud chyběla kvantifikace substrátové preference izolovaného lidského HDAC6 s úplnou sekvencí. Cílem naší zprávy je vyplnění této mezery.

CÍLE PRÁCE

- Návrh nových lipofilních sloučenin na základě struktury GCPII
- Purifikace HDAC6 divokého typu, jeho charakterizace jako deacetylasu tubulinu a kvantifikace jeho substrátové specifity

MATERÁL A METODIKA

Varianty lidského GCPII byly heterologně exprimovány v Schneiderových S2 buňkách a purifikovány kombinací afinitní a gelové permeační chromatografie. Substráty a inhibitory byly syntetizovány v partnerských laboratořích. GCPII byl ko-krytalován se substráty nebo inhibitory a rentgenové struktury komplexů byly vyřešeny molekulární záměnou. Kinetické konstanty nových substrátů a inhibiční konstanty nových inhibitorů byly stanoveny použitím vysokotlaké kapalinové chromatografie. *In vivo* studie byly provedeny za využití xenograftů karcinomu prostaty v myším modelu. Čtyři týdny po indukci růstu nádoru injekcí CWR22Rv1 PSMA⁽⁺⁾ buňek, byly myším podány [¹⁸F] **4**, [¹⁸F] **5** a [¹⁸F] **6** a bylo

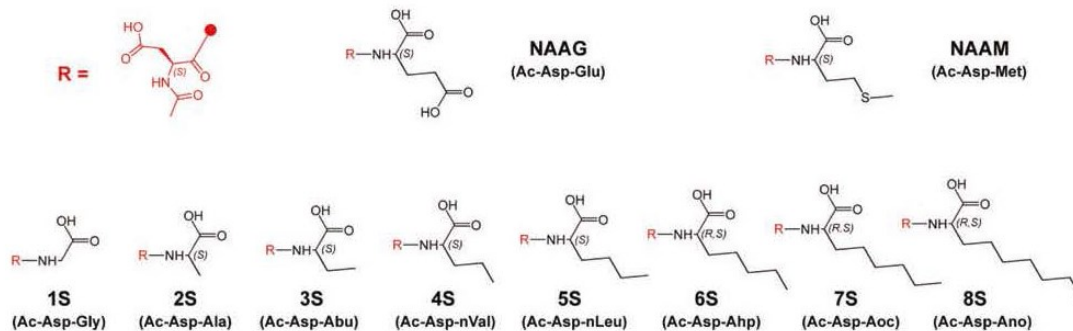
provedeno zobrazování PET. Za účelem stanovení biodistribuce a internalizace byly orgány a krev zabitých myši změřeny pomocí γ - počítadla.

Lidský HDAC6 byl heterologně exprimován v buňkách HEK-293-T17 a čištěn kombinací afinitní a gelové permeační chromatografie. LC-MS / MS byla použita pro stanovení možných posttranslačních modifikací HDAC6 a hladiny acetylace tubulinu izolovaného z prasečích mozků. Aktivita a citlivost na inhibitory byla hodnocena pomocí fluorometrických *in vitro* deacetylačních testů s peptidovými substráty značenými aminometylkumarinem. Rychlost deacetylace volných tubulinových dimerů a tubulinových polymerů byla stanovena kvantifikací z Western přenosu. Tubulinové polymery byly připraveny inkubací tubulinu s GMP / GMPCPP (MT), Zn^{2+} (zinkové listy) nebo Dolastatinem-10 (dolastatinové kruhy) a stabilizovány taxolem. Míry deacetylace fluorescenčně značených tubulinových peptidů odvozených od sekvence kolem α AcLys40 byla stanovena kvantifikací *in vitro* na základě HPLC. Vizualizace vazby HDAC6 a deacetylace MT byla provedena TIRF a nepřímou imunofluorescenční mikroskopií za použití fluorescenčně značeného HDAC6 a MTs.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Inhibitory se zvýšenou lipofilicitou

V práci Plechanovová a kol., publikujeme výsledky studie substrátů, u kterých byl v NAAG substrátu zaměněn tradiční P1' glutamátový zbytek nevětvenými neproteinogenními aminokyselinami (alifatické řetězce 0-7 atomů uhlíku - viz obr. 3). Zjistili jsme, že katalytická účinnost přímo úměrná rostoucí délce alifatického řetězce, počínaje alaninem. Neschopnost GCPII rozeznat Ac-Asp-Gly jako substrát naznačuje nutnou přítomnost postranního řetězce v poloze P1'. Krystalové struktury neaktivního mutantu GCPII E424A v komplexu se substráty Ac-Asp-Met (NAAM), Ac-Asp-Aoc a Ac-Asp-Ano ukázaly, že celková trojrozměrná struktura enzymu zůstává nezměněna (ve srovnání se strukturou GCPII E424A s NAAG). Zpozorovali jsme však ztrátu dvou vodíkových vazeb,

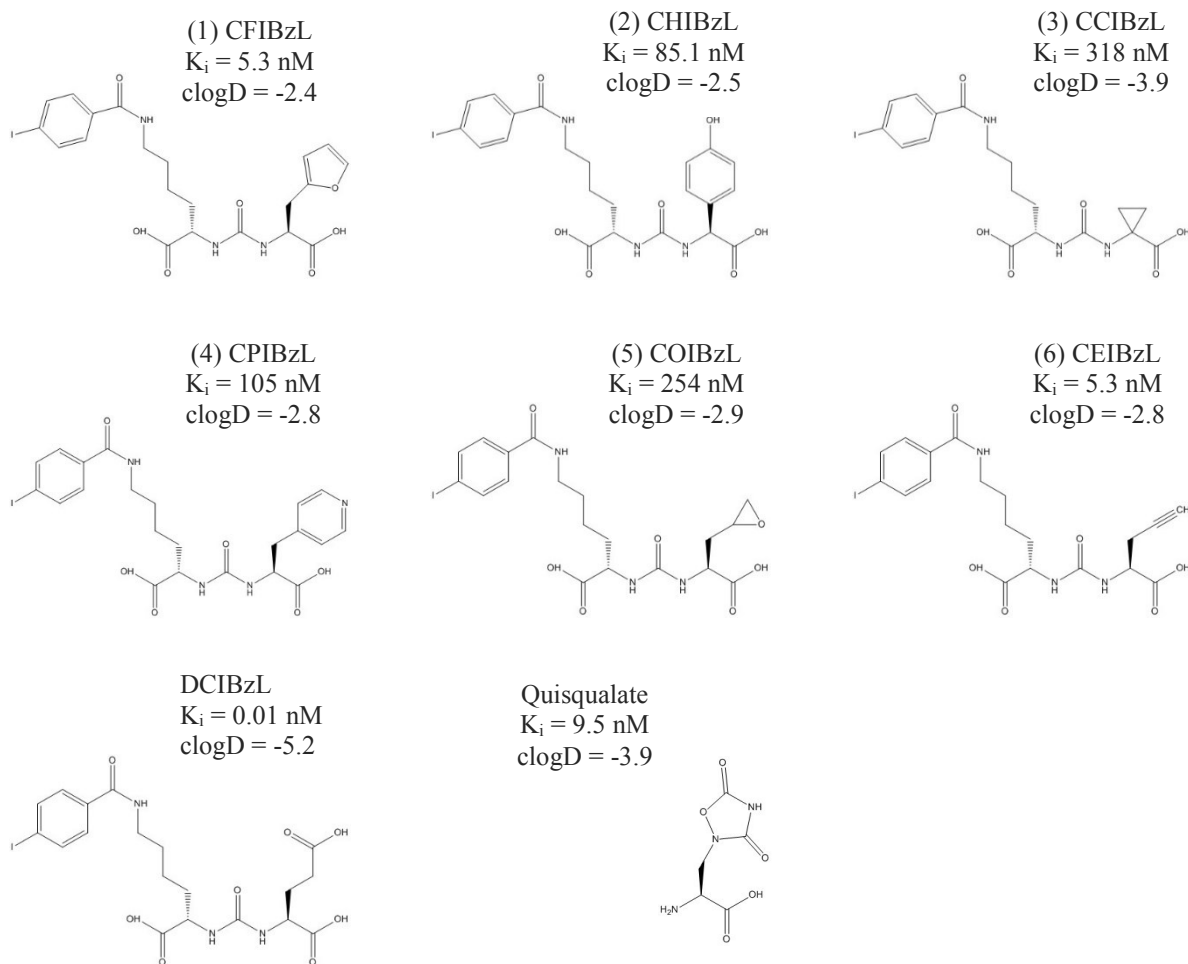


Obrázek 3: Sloučeniny studované v Plechanovova a kol., 2011

kteřé původně existovaly mezi γ -karboxylátem glutamátu a postranními řetězci Asn257 a Lys699. Substráty s nepolárními postranními řetězci byly stabilizovány v aktivním místě nepolárními vazbami s postranními řetězci Phe209, Asn257, Leu428, Lys699 a hlavními řetězci Gly427 a Gly517. Substráty s velmi dlouhými alifatickými řetězci (se 7 a 8 atomy uhlíku) indukovaly dosud nepozorovanou flexibilitu S1' místa. Amin skupina postranního řetězce Lys699 glutarátového sensoru byla posunuta o 3,9 Å, aby se zabránilo střetu s C-koncovým postranním řetězcem inhibitoru **8S**. To vedlo k rozpínání S1' kapsy. Nové inhibitory byly syntetizovány na základě biochemických a strukturních dat substrátů s alifatickými řetězci. Ac-Asp zbytek byl nahrazen 4-jodobenzylaminohexanovou skupinou a peptidová vazba nehydrolyzovatelným močovinným linkerem. V poloze P1' byly použity alifatické nerozvětvené boční řetězce a methionin. Inhibiční konstanty klesaly se zvyšující se délkou řetězce, ale inhibiční konstanty i těch nejlepších inhibitorů (**8I** $K_i = 29$ nM a NAAM $K_i = 23$ nM) byly o tři řády nižší než u DCIBzL [11]. Avšak prodloužení alifatického řetězce vedlo ke zvýšení hydrofobicity a inhibitor s nejdelším řetězcem měl distribuční koeficient ClogD = -0,23 (ClogD DCIBzL je -5,16). Analýza krystalografických dat ukazuje, že substráty a inhibitory s odpovídající délkou řetězce se do farmakoforové kapsy váží stejným způsobem.

K návrhu inhibitorů se zvýšenou lipofilitou jsme se vrátili v publikaci Pavlíček a kol., 2014. Tento článek je doplňující studií k Wang a kol., [12] kde využili

DCIBzL molekulu a na základě známé struktury připravili sérii nových inhibitorů s dosud netestovanými funkčními skupinami nahrazujícími tradiční P1' glutamát. Naším cílem bylo porozumět interakci šesti z těchto inhibitorů s GCPII. Struktury,



Obrázek 4: Sloučeniny studované v Pavlíček a kol., 2014

názvy a fyzikálně-chemické vlastnosti studovaných inhibitorů jsou shrnuty na obr. 4.

Celková trojrozměrná struktura proteinu zůstala prakticky stejná. Nicméně byl upozorován rozdíl oproti dříve popsaným komplexům GCPII s inhibitory na bázi močoviny a to ve způsobu interakce s S1' kapsou. Největší rozdíly byly v komplexu GCPII s inhibitorem (6). Vazba propargylové skupiny v S1' kapse vyvolává její zmenšení v důsledku posunu aminokyselinové smyčky Leu259-Gly263 (s Ca Leu261 jako referenčním bodem) o 3,1 Å. Aby nedošlo ke kolizi s Leu261, je Lys699 nucen posunout se o 7,3 Å (referenční bod N ζ) podobně jak

bylo popsáno Wang a kol., 2010 pro vazbu alylového isosteru. Tyto posuny naznačují, že S1' kapsa se vyznačuje dosud nepopsanou flexibilitou.

Dalším objevem byla rozdílná orientace isosterů P1' tvořených pěti- nebo šestičlennými kruhy. Rovina pyridinového kruhu inhibitoru (**4**) je pootočena o 70° vzhledem k oxadiazolidinovému kruhu quisqualátu, který leží prakticky kolmo vůči stěnám S1' kapsy, které jsou tvořené postranními řetězci Phe209 a Leu428. Tato rotace vede k posunu Phe209 a Leu428 o 1 Å a rozšíření kapsy S1'. Kruhy inhibitorů (**1**) a (**2**) rotují v menší míře a jejich orientace nemá vliv na rozměry S1' kapsy a ty tak zůstávají stejné jako při vazbě quisqualátu.

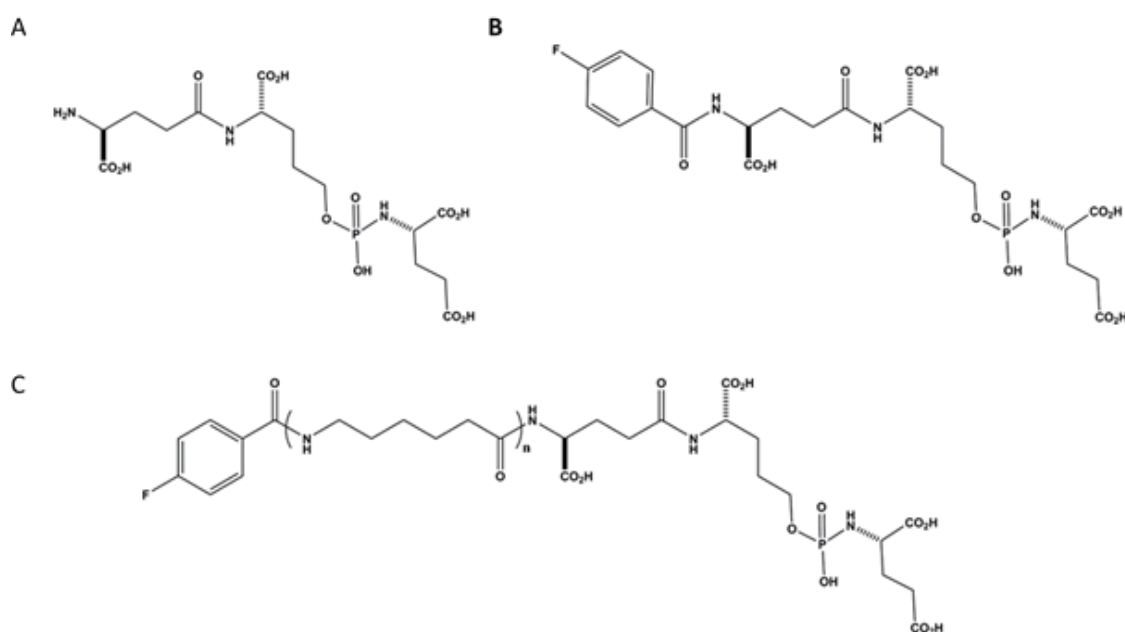
Ze šesti sloučenin zkoumaných v této publikaci jsou dvě (**1** a **5**) stejně účinnými inhibitory s nanomolární inhibiční konstantou. Tyto dvě sloučeniny jsou o dva řády slabšími inhibitory než původní DCIBzL, jsou ale o poznání hydrofobnější.

Fosforamidátové deriváty jako farmaka pro PET zobrazování

V publikaci Dannoon a kol., jsme se zaměřili na - malé molekuly vázající GCPII, které jsou odvozené od radiofarmaka 4-¹⁸F-fluorobenzamido-fosforamidát ($K_i = 0,68$ nM) [13], a využitelné jako ligandy pro PET (pozitronovou emisní tomografii). Při modifikaci této molekuly byl objeven ireverzibilní inhibitor (**5**) s podobnou účinností ($K_i = 0,4$ nM), ale rychlejší absorpcí ($2,35 \pm 0,91$ % ID / g za 1 hodinu) a retencí ($2,33 \pm 0,50$ % ID/g za 4 hodiny) a vysokým poměrem specifické aktivity v nádoru v porovnání s krví (265: 1, 4 hodiny po injekci).

Za účelem studia vlivu délky řetězce AH na vazbu ke GCPII byla fosforamidová kostra modifikována odstraněním (u inhibitoru **4**, CTT1056) nebo přidáním dalšího (**6**) aminohexanového linkeru (AH) k dříve popsanému inhibitoru (**5**, CTT1057). Inhibiční účinnosti nových sloučenin byly třikrát (**4**, $IC_{50} = 1,3$ nM) a dvakrát (**6**, $IC_{50} = 0,9$ nM) nižší než u původní molekuly (**5**, $IC_{50} = 0,4$ nM). Všechny tři molekuly inhibují GCPII ireversibilně, což je důležité pro zobrazovací farmaka. Celková trojrozměrná struktura komplexů GCPII s fosforamidy **4**, **5** a **6** byla nezměněná u všech tří komplexů. Ovšem zatímco je

elektronová hustota F_o-F_c pro inhibitory (4) a (5) dobře definovaná, distální část (6) obsahující P2 zbytek, lipofilní linker a fluorobenzylovou skupinu není vidět. To naznačuje, že tyto části inhibitoru jsou flexibilní a neinteragují s GCPII. Na rozdíl od (4) a (6), ve kterých P1 karboxylát přímo váže Arg534 a Arg536 v oblasti bohaté na argininy je P1 karboxylát inhibitoru (5) posunut o 1,1 Å a interaguje pouze s Arg536. Rozdílná délka linkerů inhibitorů [(4, 13 Å), (5, 20 Å) a (6, 28 Å)] je hlavní příčinou odlišného způsobu umístění jejich distální části. Fluorobenzylový kruh (4) se váže slabými π -vazbami do vazebného místa pro areny a je paralelní ke guanidinové skupině Arg463. Atomy 20 Å linkeru v (5)



Obrázek 5: Fosforamidátové inhibitory

A) Fosforamidát ($IC_{50}=14$ nM) B) 4-Fluorobenzamidofosforamid ($IC_{50}=1,4$ nM) C) Sloučenina (4) $n=0$ ($IC_{50}=1,3$ nM); Sloučenina (5) $n=1$ ($IC_{50}=0,4$ nM), Sloučenina (6) $n=2$ ($IC_{50}=0,9$ nM)

dosáhnou do vazebného místa pro areny a karbonylem hlavního řetězce interagují s guanidinovou skupinou Arg463 [14]. Rovina fluorobenzylového kruhu je prakticky paralelní s indolovou skupinou Trp541 a guanidinovou skupinou Arg511. Podobná orientace vzhledem k Trp541 a Arg511 byla popsána pro pteridinový kruh substrátu FolGlu₂ [15]. Pro distální část (6) není pozorovatelné

elektronová hustota. Všechna tři farmaka jsou specifická a detekovatelná pouze v PSMA⁺ buňkách. Studie, v níž byl AH linker vložen do jiné zobrazovací molekuly pro PET (Affibody proti HER2 s DOTA -Z_{HER2-342} derivátu) ukazuje, že přidání alifatického linkeru může vést ke zlepšení distribuce v organismu [16]. Naše výsledky jsou v souladu s touto studií, protože poměr specifické aktivity farmaka v nádoru k poměru v krvi a absorpce *in vitro* byly u [¹⁸F](6) významně vyšší než u [¹⁸F](4) a [¹⁸F](5). Naše výsledky rovněž ukazují, že prodloužení AH linkeru (jak je patrné z výsledků pro [¹⁸F] (6)) vede ke zvýšení lipofilicity a následnému snížení absorpce a renální eliminace ve srovnání s [¹⁸F] (5). Tato studie zkoumala rozdíl ve způsobu vazby těchto malých molekul odvozených od fosforamidu se zvyšující se lipofilicitou, posoudila jejich význam jakožto PET farmak a označila [¹⁸F](5) a [¹⁸F](6) jako možné kandidáty pro PET zobrazování.

Charakterizace HDAC6 jako deacetylasy tubulinu

V publikaci Škultétyová a kol., předkládáme podrobnou kinetickou studii deacetylase tubulinu a interakce HDAC6 s mikrotubuly, protože stávající informace o preferenci enzymu HDAC6 vůči různým tubulinovým formám jsou neuspokojivé.

Literatura uvádí, že aktivita a lokalizace HDAC6 je regulována posttranslačními modifikacemi (PTM). Abychom zjistili, zda je protein, který jsme purifikovali modifikován, podrobili jsme jej LC-MS/MS analýze. Vzhledem k tomu, že námi izolovaný HDAC6 nevykazuje žádné posttranslační modifikace, považujeme naměřenou aktivitu za bazální. Stanovili jsme enzymatickou aktivitu HDAC6 a porovnali s aktivitou uváděnou v literatuře. K_m na dříve popsáných substrátech byly 3,7 μM pro substrát Fluor de Lys, 4 μM pro Boc-K(Ac)-AMC, 9,1 μM pro (Ac)GAK(Ac)-AMC a 11,3 μM pro Fluor de Lys SIR. Srovnání s hodnotami popsány v publikacích Zou a kol., Miyake a kol., a Schultz a kol., byly hodnoty K_m podobné, ale hodnoty katalytické aktivity enzymu byly o řád vyšší. Proto předpokládáme, že náš HDAC6 obsahuje více katalyticky aktivních molekul

enzymu na mol, než tomu bylo u HDAC6 popsaného jinými skupinami. Inhibiční konstanty (IC_{50}) pro tři známé inhibitory SAHA (5 nM), trichostatin A (TSA, 1,2 nM) a Nexturastat A (5,2 nM) byly shodné s těmi, které jsou uváděny v literatuře [17,18].

Doposud nebylo úplně jasné, zda HDAC6 přednostně deacetyluje volné tubulinové dimery nebo mikrotubuly. Vzhledem k tomu, že acetylace je reverzibilní modifikace, bylo by logické, aby substrátová preference HDAC6 byla opačná než substrátová preference hlavní tubulinové acetyltransferasy α TAT1. α TAT1 přednostně acetyluje mikrotubuly, i když malou rychlostí. Zjistili jsme, že námi purifikovaný HDAC6 vykazuje při deacetylaci 1500-násobnou preferenci vůči dimerům v porovnání s mikrotubuly. Rychlost deacetylace byla stanovena na $0,6 \text{ s}^{-1}$ pro tubulinové dimery a $0,0004 \text{ s}^{-1}$ pro stabilizované MT. Abychom vyloučili možnou interferenci stabilizačního činidla, testovali jsme se stejným výsledkem mikrotubuly stabilizované jak taxolem, tak i GMPCPP. Miyake a kol., minulý rok popsali 2,5 násobnou preferenci dimerů za použití duplikované katalytické domény HDAC6 z *D. rerio*. Kdyby tyto výsledky platily i pro lidský HDAC6 plné délky, byla by rychlost deacetylace pro mikrotubuly rovna $0,24 \text{ s}^{-1}$. Jelikož bylo zjištěno, že rychlost acetylace α TAT1 je $0,00044 \text{ s}^{-1}$, znamenalo by to, že mikrotubuly existují pouze v deacetylovaném stavu. Rozdíl mezi našimi výsledky a výsledky Miyake a kol., ukazuje, že pro rozpoznání dimerů a mikrotubulů jako substrátů jsou potřebné aminokyseliny mimo DD1/DD2 katalytické jádro. Podobná mikrotubuly vážící doména byla predikována u α TAT1. Výrazný rozdíl v rychlosti deacetylace mezi dimerním tubulinem a mikrotubuly podporuje hypotézu (vytvořenou Skogem a kol., 2014 a Miyakem a kol., 2016), že acetylace a deacetylace tubulinu jsou výsledkem protichůdných substrátových preferencí mezi HDAC6 a α TAT1 [19,20].

Vzhledem k tomu, že α AcLys40 leží v lumen mikrotubulu, je jeho přístupnost problematická. Tubulinové dimery včleněné do mikrotubulů mají velkou část svého povrchu nepřístupnou pro interakci s MAP (proteiny vážícími

mikrotubuly). Abychom zjistili, jestli je substrátová preference výsledkem omezené dostupnosti α AcLys40 nebo je-li výsledkem suboptimální vazby na povrch tubulinu, zkoumali jsme míru deacetylace jiných polymerních tubulinových forem. Porovnali jsme rychlost deacetylace mikrotubulů, zinkových listů a dolastatinových kruhů s tubulinovými dimery. Rychlost deacetylace dolastatinových kruhů a zinkových listů je 100- a 750-násobně pomalejší než u volného tubulinu. Naše zjištění ukazují, že přístupnost není rychlost omezujícím faktorem. S největší pravděpodobností jsou pro optimální deacetylaci substrátu katalyzovanou HDAC6 rozhodující boční interakce.

Lys40 leží v poměrně flexibilní smyčce tvořené 20 aminokyselinami počínající Gln31 a končící Asn50, přičemž aminokyseliny 37 až 42 jsou vysoce konzervované. To vyvolává následující otázky: 1) postačuje sekvence smyčky obsahující α Lys40 k rozeznání substrátu HDAC6, 2) jestli je konzervováno jenom 6 aminokyselin, jak dlouhá sekvence je potřebná pro optimální deacetylaci pomocí HDAC6, 3) je rozdíl v rychlostech deacetylace mezi smyčkou obsahující α Lys40 ve formě volného peptidu a v α/β -tubulinovém dimeru? Porovnali jsme rychlost deacetylace α/β tubulinového dimeru (kvantifikace Western přenosem) a tri- až nonadekamerického peptidu (kvantifikováno pomocí HPLC) odvozeného od sekvence kolem Lys40.

Naše výsledky ukazují, že s rostoucí délkou peptidu se rychlost deacetylace peptidu snižuje. Zatímco rychlost pro tubulinový peptid T3 (Abz-D[AcK]T-NH₂) je 2,0 s⁻¹, rychlost postupně klesá na 0,1 s⁻¹ pro peptidy T17 (Abz-PDGQMPSD[AcK]TIGGGDDS-NH₂) a T19 (Abz-QPDGQMPSD[AcK]TIGGGDDSF-NH₂). Přestože je tripeptid substrátem s nejvyšší rychlostí deacetylace, je α/β -tubulinový dimer deacetylován 12 krát rychleji. To naznačuje, že pro optimální rozpoznávání substrátu a jeho deacetylaci jsou potřebné interakce mimo aktivní místo. Tuto hypotézu také podporují hodnoty K_m pro deacetylaci peptidů, které jsou v mikromolárních hodnotách (88 μ M pro T9 a až 328 μ M pro T15). Tyto hodnoty ukazují relativně nízkou afinitu

HDAC6 k peptidovým sekvencím z okolí α Lys40. K_m pro tubulinový dimer je 0,23 μ M, a tak je afinita k volnému tubulinu téměř 400x vyšší než u peptidového substrátu T3. Naše výsledky naznačují, že pro maximální deacetylaci tubulinu je nezbytná interakce s bočními a podélnými povrchy tubulinu, jak prokázala deacetylace tubulinových polymerů, kde jsou tyto povrchy nepřístupné uvnitř polymerních mřížek.

Jednou z hlavních otázek ohledně deacetylace tubulinu je to, jak deacetylasy a acetyltransferasa dosáhnou na α Lys40, pokud se tento nachází v lumen mikrotubulu. Mezi jednotlivé možnosti patří: vstup do lumen od konců, přístup k smyčce přes zlomy existující uvnitř mikrotubulové mřížky nebo přístup zvenčí. Zvýšená dostupnost mikrotubulového lumen může být způsobena ohýbáním mikrotubulů, což způsobuje mechanické namáhání vedoucí ke zkroucení a následným defektům v mřížce mikrotubulů [21]. Taktéž spoje mezi dvěma sousedními protofilamenty nejsou těsné, ale je mezi nimi mezera. Smyčka α Lys40 leží pod takovou mezerou a může být de/acetylována. Výsledky ale naznačují, že by v mikrotubulech musela proběhnout masivní reorganizace, aby mohly modifikující enzymy proniknout k α Lys40. Szyk a kol., ukázali, že acetylace mikrotubulů *in vitro* je rovnoměrně rozložena bez zvýhodnění konců mikrotubulů [22]. To je pravděpodobně způsobeno náhodnou, ale rovnoměrnou difúzí α TAT1 v lumen mikrotubulu. Použití TIRF mikroskopie s imobilizovanými mikrotubuly značenými rodaminem nám umožnilo sledovat, že HDAC6 se váže na mikrotubuly rychle a bez preference vůči jejich koncům. Dynamika těchto interakcí poukazuje spíše na vazbu HDAC6 na povrch mikrotubulů, nežli na vstup do lumen mikrotubulů od jejich konců.

ZÁVĚRY

1. Připravili jsme nové inhibitory GCPII a pomocí rentgenostrukturní analýzy jsme prostudovali jejich interakci s GCPII. Nové inhibitory navržené pro klinické aplikace vykazovaly vyšší hydrofobicitu než původní molekuly.

2. Úspěšně jsme zavedli expresi HDAC6 v savčích buňkách a purifikovali enzym v téměř 100% čistotě. Naše výsledky jednoznačně určily tubulinové dimery jako preferovaný substrát a tato preference byla kvantifikována. Použitím různých tubulinových polymerů jsme dokázali, že přístupnost α AcLys40 není určujícím faktorem pro rychlost deacetylace, a že účinná deacetylace tubulinu vyžaduje kromě přímých interakcí s aminokyselinami v okolí α AcLys40 také další interakce.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Robinson, M.B., Blakely, R.D., Couto, R., Coyle, J.T. (1987) Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain. *J Biol Chem* **262**, 14498–506.
2. Pinto, J.T., Suffoletto, B.P., Berzin, T.M., Qiao, C.H., Lin, S., Tong, W.P., May, F., Mukherjee, B., Heston, W.D. (1996) Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **2**, 1445–51.
3. Bacich, D.J., Ramadan, E., O’Keefe, D.S., Bukhari, N., Wegorzewska, I., Ojeifo, O., Olszewski, R., Wrenn, C.C., Bzdega, T., Wroblewska, B., Heston, W.D., Neale, J.H. (2002) Deletion of the glutamate carboxypeptidase II gene in mice reveals a second enzyme activity that hydrolyzes N-acetylaspartylglutamate. *J Neurochem* **83**, 20–29.
4. Jackson, P.F., Tays, K.L., Maclin, K.M., Ko, Y.S., Li, W., Vitharana, D., Tsukamoto, T., Stoermer, D., Lu, X.C., Wozniak, K., Slusher, B.S. (2001) Design and pharmacological activity of phosphinic acid based NAALADase inhibitors. *J Med Chem* **44**, 4170–75.
5. Chen, H.P., Zhao, Y.T., Zhao, T.C. (2015) Histone deacetylases and mechanisms of regulation of gene expression. *Crit Rev Oncog* **20**, 35–47.
6. Boukari, H., Sackett, D.L., Schuck, P., Nossal, R.J. (2007) Single-walled tubulin ring polymers. *Biopolymers* **86**, 424–36.
7. Wolf, S.G., Mosser, G., Downing, K.H. (1993) Tubulin conformation in zinc-induced sheets and microtubes. *J Struct Biol* **111**, 190–99.
8. Xu, Z., Schaedel, L., Portran, D., Aguilar, A., Gaillard, J., Marinkovich, M.P., Thery, M., Nachury, M.V. (2017) Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science* **356**, 328–32.
9. 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.
10. Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H.L., Chua, K., Lombard, D., Mizeracki, A., Matthias, G., Alt, F.W., Khochbin, S., Matthias, P. (2008) Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol* **28**, 1688–1701.
11. Barinka, C., Byun, Y., Dusich, C.L., Banerjee, S.R., Chen, Y., Castanares, M., Kozikowski, A.P., Mease, R.C., Pomper, M.G., Lubkowski, J. (2008)

- Interactions between human glutamate carboxypeptidase II and urea-based inhibitors: structural characterization. *J Med Chem* **51**, 7737–43.
12. Wang, H., Byun, Y., Barinka, C., Pullambhatla, M., Bhang, H.E., Fox, J.J., Lubkowski, J., Mease, R.C., Pomper, M.G. (2010) Bioisosterism of urea-based GCPII inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 392–97.
 13. Mallari, J.P., Choy, C.J., Hu, Y., Martinez, A.R., Hosaka, M., Toriyabe, Y., Maung, J., Blecha, J.E., Pavkovic, S.F., Berkman, C.E. (2004) Stereoselective inhibition of glutamate carboxypeptidase by organophosphorus derivatives of glutamic acid. *Bioorg Med Chem* **12**, 6011–20.
 14. Ganguly, T., Dannon, S., Hopkins, M.R., Murphy, S., Cahaya, H., Blecha, J.E., Jivan, S., Drake, C.R., Barinka, C., Jones, E.F., VanBrocklin, H.F., Berkman, C.E. (2015) A high-affinity [(18)F]-labeled phosphoramidate peptidomimetic PSMA-targeted inhibitor for PET imaging of prostate cancer. *Nucl Med Biol* **42**, 780–87.
 15. Navratil, M., Ptacek, J., Sacha, P., Starkova, J., Lubkowski, J., Barinka, C., Konvalinka, J. (2014) Structural and biochemical characterization of the folyl-poly-gamma-l-glutamate hydrolyzing activity of human glutamate carboxypeptidase II. *FEBS J* **281**, 3228–42.
 16. Tolmachev, V., Feldwisch, J., Lindborg, M., Baastrup, B., Sandstrom, M., Orlova, A. (2011) Influence of an aliphatic linker between DOTA and synthetic Z(HER2:342) Affibody molecule on targeting properties of the (111)In-labeled conjugate. *Nucl Med Biol* **38**, 697–706.
 17. Wagner, F.F., Olson, D.E., Gale, J.P., Kaya, T., Weiwer, M., Aidoud, N., Thomas, M., Davoine, E.L., Lemercier, B.C., Zhang, Y.L., Holson, E.B. (2013) Potent and selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) does not require a surface-binding motif. *J Med Chem* **56**, 1772–76.
 18. Bergman, J.A., Woan, K., Perez-Villarroel, P., Villagra, A., Sotomayor, E.M., Kozikowski, A.P. (2012) Selective histone deacetylase 6 inhibitors bearing substituted urea linkers inhibit melanoma cell growth. *J Med Chem* **55**, 9891–99.
 19. Skoge, R.H., Dolle, C., Ziegler, M. (2014) Regulation of SIRT2-dependent alpha-tubulin deacetylation by cellular NAD levels. *DNA Repair Amst* **23**, 33–38.
 20. Miyake, Y., Keusch, J.J., Wang, L., Saito, M., Hess, D., Wang, X., Melancon, B.J., Helquist, P., Gut, H., Matthias, P. (2016) Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. *Nat Chem Biol* **12**, 748–54.

21. Schaedel, L., John, K., Gaillard, J., Nachury, M.V., Blanchoin, L., Thery, M. (2015) Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat Mater* **14**, 1156–63.
22. Szyk, A., Deaconescu, A.M., Spector, J., Goodman, B., Valenstein, M.L., Ziolkowska, N.E., Kormendi, V., Grigorieff, N., Roll-Mecak, A. (2014) Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. *Cell* **157**, 1405–15.

ŽIVOTOPIS

Mgr. Ľubica Škultétyová

Narozena: Námestovo, Slovenská republika, 18.3.1979

Zaměstnání:

- 2008 – trvá: odborný pracovník VŠ, Biotechnologický ústav AV ČR, Praha
- 2006 – 2007: odborný pracovník VŠ, Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha

Vzdělání:

- 2011 – nyní: Doktorské studium (biochemie), Studijní obor: Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova universita v Praze.
- 2004-2006: Magisterské studium (biochemie). Studijní obor: Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave. Diplomová práce: Charakterizace a částečná purifikace enzymů účastnících se regulace topologie mitochondriální DNA v kvasince *Candida parapsilosis*.
- 2001-2004: Bakalářské studium (chemie). Studijní obor: Chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave. Studium ukončeno pouze státní zkouškou.

Konference:

Molecular Life Sciences 2013, Frankfurt, Německo

XXIV. Biochemický zjazd SSBMB a ČSBMB, 2014, Bratislava, Slovenská Republika

XXV. Biochemický sjezd SSBMB a ČSBMB, Praha, Česká Republika

Certifikáty:

- Cambridge ESOL certifikát - First Certificate in English

Granty:

- 2013-2015 GAUK: Strukturní a funkční charakterizace histon deacetylasy 10 (HDAC10)

Seznam publikací:

1. Plechanovova, A., Byun, Y., Alquicer, G., Skultetyova, L., Mlcochova, P., Nemcova, A., Kim, H. J., Navratil, M., Mease, R., Lubkowski, J., Pomper, M., Konvalinka, J., Rulisek, L., Barinka, C. 2011. Novel substrate-based inhibitors of human glutamate carboxypeptidase II with enhanced lipophilicity. *J Med Chem* 54:7535-7546.
2. Pavlicek, J., Ptacek, J., Cerny, J., Byun, Y., Skultetyova, L., Pomper, M. G., Lubkowski, J., Barinka, C. 2014. Structural characterization of P1'-diversified urea-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II. *Bioorg Med Chem Lett* 24:2340-2345.
3. Dannoos, S., Ganguly, T., Cahaya, H., Geruntho, J. J., Galliher, M. S., Beyer, S. K., Choy, C.J., Hopkins, M.R., Regan, M., Blecha, J. E., Skultetyova, L., Drake, C.R., Jivan, S., Barinka, C., Jones, E. F., Berkman, C. E., VanBrocklin, H. F. 2016. Structure-Activity Relationship of (18)F-Labeled Phosphoramidate Peptidomimetic Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeted Inhibitor Analogues for PET Imaging of Prostate Cancer. *J Med Chem* 59:5684-5694.
4. Skultetyova, L., Ustinova, K., Kutil, Z., Novakova, Z., Pavlicek, J., Mikesova, J., Trapl, D., Baranova, P., Havlinova, B., Hubalek, M., Lansky, Z., Barinka, C. 2017. Human histone deacetylase 6 shows strong preference for tubulin dimers over assembled microtubules. *Sci Rep* 7:11547

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Ph.D. study program: Biochemistry

Summary of the Ph.D. Thesis



Zinc-Dependent Hydrolases: Structure-Function Study of Glutamate
Carboxypeptidase II and Histone Deacetylase 6

Ľubica Škultétyová

Supervisor: RNDr. Cyril Bařinka, Ph.D.

Prague, February 19, 2018

ABSTRACT

Zinc-binding proteins represent approximately one tenth of the proteome and a good portion of them are zinc-dependent hydrolases. This thesis focuses on biochemical and structural characterization of glutamate carboxypeptidase II (GCPII) and histone deacetylase 6 (HDAC6), two members of the zinc-dependent metallohydrolase superfamily. We describe here their interactions with natural substrates and inhibitors.

GCPII is a homodimeric membrane protease catalyzing hydrolytic cleavage of glutamate from the neurotransmitter N-acetylaspartylglutamate (NAAG) and dietary folates in the central and peripheral nervous systems and small intestine, respectively. This enzyme is associated with several neurological disorders and also presents an ideal target for imaging and treatment of prostate cancer. GCPII inhibitors typically consist of a zinc-binding group (ZBG) linked to an S1' docking moiety (a glutamate moiety or its isostere). As such, these compounds are highly hydrophilic molecules therefore unable to cross the blood-brain barrier and this hampers targeting GCPII to the central nervous system. Different approaches are adopted to alter the S1' docking moiety of the existing inhibitors. As a part of this thesis, we present different strategies relying on replacement of the canonical P1' glutamate residue with unbranched non-natural amino acids and glutamate bioisosteres. We also study the effect of introduction of an aminohexanoate linker on affinity and biological properties of phosphoramidate-based inhibitors. Analysis of crystal structures of GCPII in the complex with these novel inhibitors identified unprecedented plasticity of the S1' site that enables GCPII to accommodate bulky residues. We have succeeded in identifying compounds with increased hydrophobicity. These molecules, although not strong inhibitors, represent promising scaffolds for further rational design of new inhibitors.

Acetylation of Lys40 of α -tubulin protects the microtubules from mechanical ageing and plays role in cell motility, axonal branching, and growth and maintenance of neuronal processes. HDAC6 is the major tubulin deacetylase and it is emerging as a possible treatment target in cancer and neurodegenerative diseases. A better understanding of its interaction with the tubulin substrate is therefore needed. We show here that HDAC6 deacetylates the tubulin dimers at a rate 1500-fold higher than the microtubules. Our data indicates that amino acids beyond the P₁ and P₋₁ within the Lys40 loop contribute minimally to the substrate recognition and that efficient deacetylation requires complex longitudinal and lateral interactions with tubulin dimer.

INTRODUCTION

Zinc dependent hydrolases

Zinc-dependent hydrolases are a class of metalloenzymes, where zinc ions are critical for the enzyme to catalyze hydrolytic reactions. This thesis presents a detailed study of two zinc hydrolases: GCPII and HDAC6. We addressed structure-assisted design of new GCPII inhibitors and elucidated interactions between HDAC6 and tubulin, its natural substrate.

GCPII

Human glutamate carboxypeptidase II is a membrane bound zinc-dependent C-terminal exopeptidase [1]. In the small intestine the enzyme cleaves the γ -linked glutamates from dietary folyl-poly- γ -glutamates, allowing their absorption into the blood stream [2]. In the nervous system, GCPII functions as NAALADase and hydrolyzes the neuropeptide *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG). GCPII inactivates NAAG by hydrolyzing it, resulting in *N*-acetyl-L-aspartate (NAA) and

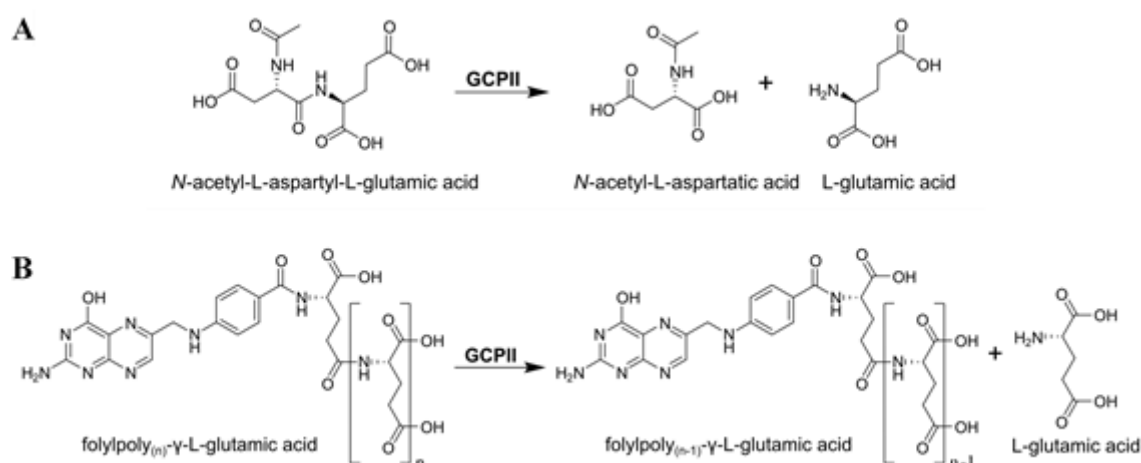


Figure 1: Scheme of reactions catalyzed by GCPII

A) GCPII cleaves the NAAG substrate into NAA and glutamic acid. B) GCPII hydrolyzes dietary folates thus enabling their absorption in small intestine ($n=5-7$)

glutamic acid release [3]. High amounts of glutamate in the synaptic space are considered neurotoxic and are associated with neurological disorders such as stroke, amyotrophic lateral sclerosis, and Alzheimer's disease. The function of GCPII in a healthy prostate is unclear but high expression levels were observed

in prostate cancer. The vast difference in the expression levels between healthy and cancerous prostate tissue makes GCPII a great prostate cancer marker.

In general, the GCPII inhibitors consist of a zinc-binding group (ZBG) and an S1' binding group (usually a glutamate moiety or glutamate isostere). Currently used GCPII inhibitors can be divided into four groups based on the nature of the zinc-binding group: 1) phosphorous based inhibitors (phosphonate-, phosphate-, and phosphoramidate-based), 2) urea-based compounds, 3) thiols, and 4) hydroxamates. Among the most potent are 2-phosphonomethylpentanedioic acid (2-PMPA) ($K_i = 0.3$ nM), a potent phosphonate based GCPII inhibitor, and urea-based DCIBzL ($K_i = 0.01$ nM).

Involvement of GCPII in several CNS disorders necessitates synthesis of highly lipophilic inhibitors (or inhibitor prodrugs) that have ability to cross the blood brain barrier. Majority of the most potent inhibitors has either glutamate or its mimetic at the P1' position as the S1' pharmacophore pocket is optimized for glutamate binding [4] and its use at the P1' position markedly increases inhibitory potency of a given compound. However, it is the presence of glutamate/glutarate at the P1' that negatively affects lipophilicity of GCPII inhibitors.

HDAC6

HDAC6 belongs to the histone deacetylase family of enzymes catalyzing hydrolytic removal of the acetyl group from the ϵ -amino group of lysine. Among the 18 members of the human histone deacetylase family is the only HDAC6 with fully duplicated deacetylase domain [5].

While more than 20 HDAC6 substrates were identified, tubulin stands out as the most abundant and the most important. α - and β -tubulins are globular proteins and they form a 110 kDa heterodimer. The dimer serves as the building block of

tubulin polymers. The α/β -subunits bind head to tail to form protofilaments. Then they join side by side to form different polymers that are maintained by lateral and longitudinal interactions between the subunits. Longitudinal bonds are between two adjoining subunits, linking them into a linear protofilament. Lateral interactions unite protofilaments side by side to form a sheet or a microtubule. During depolymerization of microtubules, the lateral interactions between the

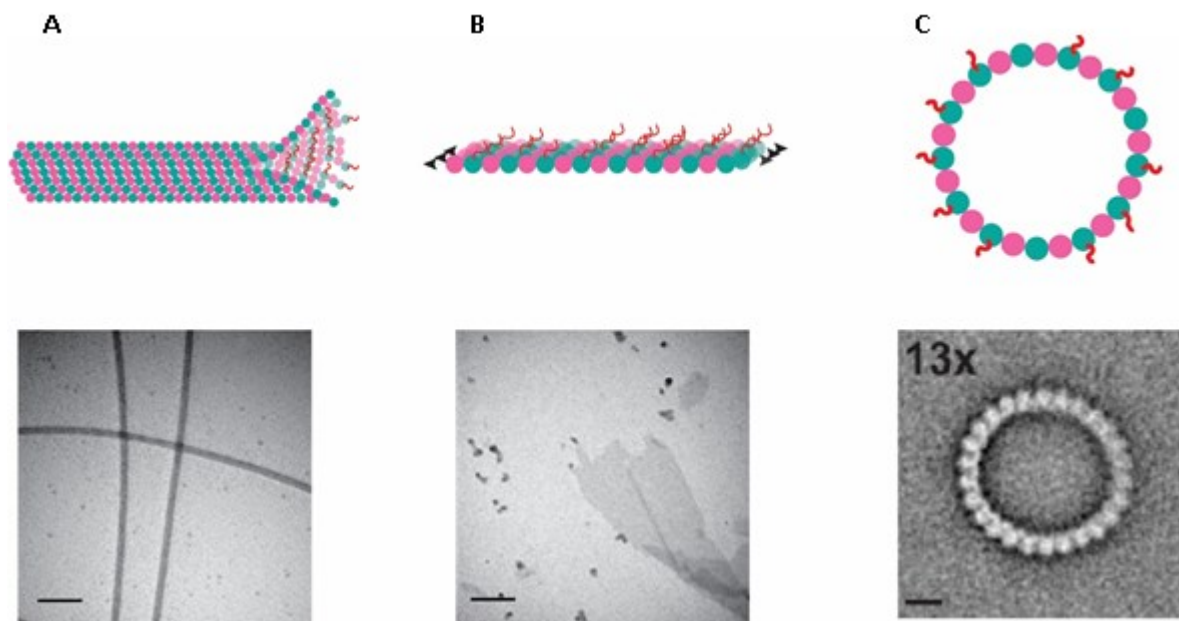


Figure 2: Tubulin polymers

Addition of various substances results in tubulin polymerization. Schemes supplemented with electron micrographs. (A) Addition of GTP induces formation of microtubules. (B) In high concentrations of zinc ions, tubulin polymerizes into zinc-sheets with protofilaments in antiparallel orientation. (C) Dolastatin-10 forces tubulin filaments to curve, resulting in rings formed of 13 - 15 tubulin dimers. Bars in (A) and (B) = 200 nm in (C) = 40 nm. α - and β - tubulin depicted as pink and green circle, respectively, acetylation as red curved line, black arrows indicate orientation of protofilaments. Scheme by LS, electron micrograph of dolastatin-10 ring by Moores & Milligan, 2008.

protofilaments weaken and they start to curve outwardly. These curvatures either disassemble or close and form tubulin rings. In presence of dolastatin-10 single walled tubulin rings are formed, mimicking these depolymerization products (Figure 2C) [6].

Zinc at concentrations higher than 50 μM and at pH 5.5-5.8 induces formation of zinc-sheets of up to 2 μm in width. Similarly to MTs they consist of protofilaments albeit in antiparallel orientation (Figure 2B) [7].

Microtubules are formed of 11-15 protofilaments of the same orientation, arranged side by side (Figure 2A).

It has been shown that acetylation is involved in mechanical stabilization of microtubules and protects them from mechanical ageing [8]. Decrease in tubulin acetylation was observed in Alzheimer's and Huntington diseases. αTAT1 (α -tubulin N-acetyltransferase) and HDAC6 are considered to be the major tubulin acetylase and deacetylase, respectively in mammalian cells [9,10]. The tubulin acetyltransferase acetylates microtubules 4-6 times faster than tubulin dimers and it has been shown that lateral lattice interactions are required for its optimal activity. Tubulin was identified as HDAC6 substrate in 2002, but the data quantifying the substrate preference of the purified full length human HDAC6 has been missing. Our report aims to fill this gap.

AIMS OF THE STUDY

- Structure-assisted design of new lipophilic compounds binding to GCPII
- Purification of full length HDAC6, characterization of HDAC6 as tubulin deacetylase, and quantification of its substrate preference

MATERIAL AND METHODS

Variants of human GCPII were heterologously expressed using Schneider's S2 cells and purified by a combination of affinity and size-exclusion chromatography. Substrates and inhibitors were synthesized by collaborating laboratories. GCPII was co-crystallized with substrates or inhibitors and the X-

ray structures of the complexes were solved by difference Fourier methods. Kinetic constants on novel substrates and inhibitory constants on novel inhibitors were determined using the high-pressure liquid chromatography. *In vivo* studies were performed using prostate cancer xenograft models. Four weeks after tumor growth induction in mice by injection of CWR22Rv1 PSMA (+) cells, [¹⁸F]4, [¹⁸F]5, and [¹⁸F]6 were administered and the PET imaging was performed. For the biodistribution and internalization studies the organs and blood of euthanized mice were counted using a γ counter.

Human HDAC6 was heterologously expressed in HEK-293-T17 cells and purified by a combination of affinity and size exclusion chromatography. LC-MS/MS was used to determine possible PTMs of HDAC6 and acetylation levels of tubulin isolated from porcine brains. Activity and sensitivity to inhibitors was assessed using fluorometric *in vitro* deacetylation assays with AMC labeled peptide substrates. Deacetylation rates of free tubulin dimers and tubulin polymers were determined by Western blot quantification. Tubulin polymers were prepared by incubation of tubulin with GMP/GMPCPP (MT), Zn²⁺ (zinc sheets), or Dolastatin-10 (dolastatin rings) and stabilized by taxol. Deacetylation rates of fluorophore tubulin peptides derived from α AcLys40 loop were determined by HPLC-based quantification of *in vitro* deacetylation assays. Visualization of HDAC6 binding and deacetylation of MTs was done by TIRF and indirect immunofluorescence microscopy using fluorescently labeled HDAC6 and MTs.

RESULTS AND DISCUSSION

Inhibitors with enhanced lipophilicity

In Plechanovova *et al.*, 2011, we present a study of substrates, where the canonical P1' glutamate moiety of NAAG was substituted by unbranched non-natural amino acids (aliphatic chains of 0-7 carbon atoms – see Figure 3). We observed that catalytic efficiency increased in direct proportion to increasing aliphatic chain

length, starting from alanine. The observed inability of GCPII to recognize Ac-Asp-Gly as a substrate indicated the necessity of a side chain at the P1' position. Crystal structures of inactive mutant GCPII E424A in complex with substrates Ac-Asp-Met (NAAM), Ac-Asp-Aoc, and Ac-Asp-Ano revealed that the overall fold of the enzyme was unchanged (compared to structure of GCPII E424A with NAAG). We observed, however, a loss of two hydrogen bonds originally existing between the glutamate γ -carboxylate and side chains of Asn257 and Lys699. The substrates with non-polar side chains were stabilized within the active site by non-polar contacts with the side chains of Phe209, Asn257, Leu428, Lys699, and main chains of Gly427 and Gly517. The use of substrates with very long aliphatic chains (with 7 and 8 carbon atoms) forced the S1' site to adopt a previously unseen

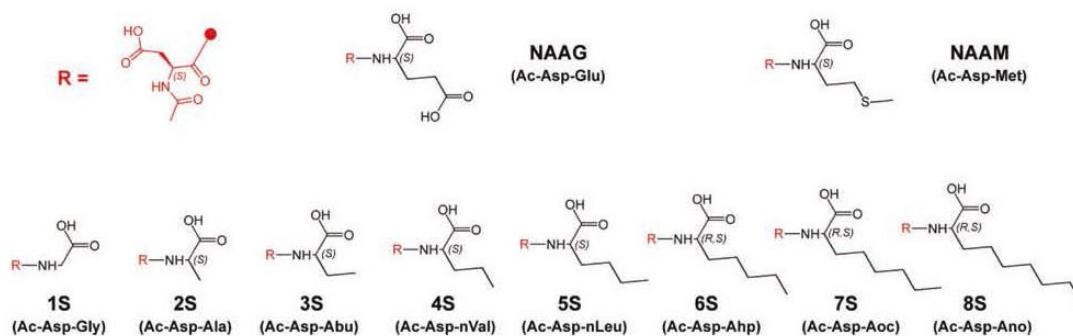


Figure 3: Compounds studied in Plechanovova *et al.*, 2011

plasticity. The N ζ of Lys699 within the glutarate sensing hairpin was forced to shift by 3.9 Å in order to avoid clashing with the C-terminal side chain of the 8S inhibitor. This led to a stretching of the S1' pocket. New inhibitors were synthesized based on the biochemical/structural data on the substrates with aliphatic chains. Here, the Ac-Asp moiety and the peptide bond were replaced by (4-iodo-benzoylamino)hexanoyl group and a non-hydrolysable ureido linker, respectively. At the P1' position aliphatic unbranched side chains and methionine were used. Inhibitory constants decreased with increasing chain length, yet the inhibitory potency of the best of the inhibitors (8I, $K_i=29$ nM and NAAM, $K_i=23$ nM) was still three orders of magnitude lower than the DCIBzL molecule [11]. However, the elongation of the aliphatic chain also resulted in an increase in

lipophilicity and the inhibitor with the longest chain had distribution coefficient $\text{ClogD} = -0.23$ (ClogD of DCIBzL is -5.16). Analysis of crystallographic data shows that the substrates and inhibitors of the corresponding chain length bind into the pharmacophore pocket in the same manner.

We have returned to the design of inhibitors with improved lipophilicity again in Pavlicek *et al.*, 2014. This article is a follow-up study to Wang *et al.*, [12] who used the DCIBzL scaffold and, adopting a structure-assisted drug design approach, prepared a series of new inhibitors with yet untested moieties replacing the canonical P1' glutamate. Our goal was to understand the interaction of six of these inhibitors with GCPII. Structures, names, and physicochemical characteristics of studied inhibitors are summed in picture 4.

The overall structural arrangement of the protein remained virtually identical. However, there is a difference from the previously characterized GCPII/urea based inhibitor complexes in the interaction pattern within the S1' pocket. The most profound changes are observed in the GCPII/(**6**) complex. Binding of the propargylic moiety within the S1' pocket elicits its compaction due to a 3.1 \AA shift of the Leu259-Gly263 amino acid loop (the $\text{C}\alpha$ of Leu261 as the reference point). Consequently, to not collide with the Leu261, the Lys699 is forced to shift by 7.3 \AA (the $\text{N}\zeta$ atom), in a manner similar to the binding mode of the allylic isostere described by Wang *et al.*, 2010 [12]. Taken together, these shifts indicate that the S1' pocket possesses a plasticity never described before.

Another new discovery was the variable orientation of the P1' isosteres consisting of five or six membered rings. The plane of the pyridine ring of inhibitor (**4**) was rotated 70° in regard to the oxadiazolidine ring of the quisqualate, that lays practically perpendicular to the sides of the S1' pocket defined by side chains of Phe209 and Leu428. This rotation results in a widening of the S1' pocket by shifting the Phe209 and the Leu428 by 1 \AA . The rings of the other two inhibitors (**1**) and (**2**) are rotated to a lesser degree and their orientations have no effect on the S1' pocket that remains as compact as with bound quisqualate.

Of the six compounds studied in this report, two (**1** and **5**) have identical inhibitory

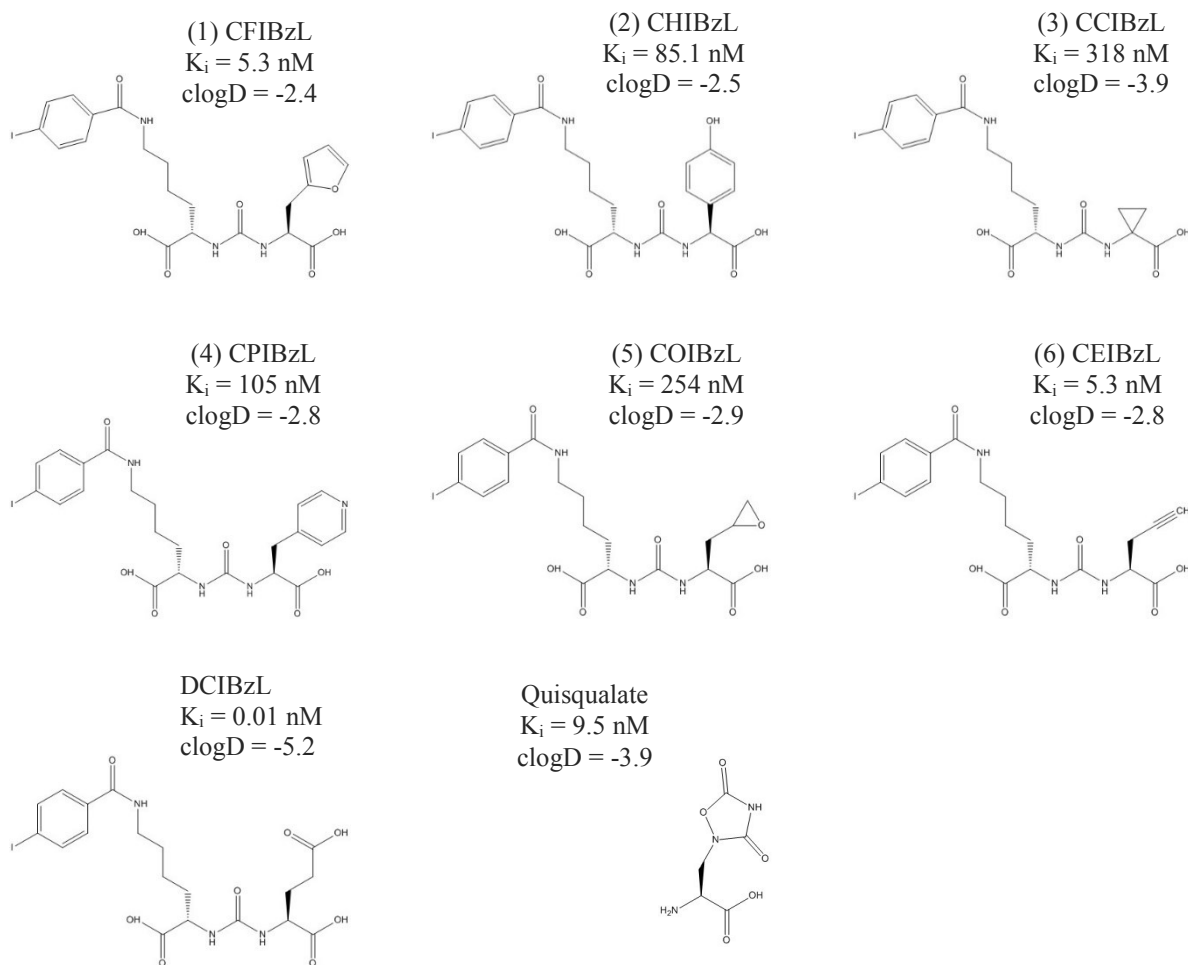


Figure 4: Compounds studied in Pavlicek *et al.*, 2014

potency in low nanomolar range. These two inhibitors are weaker than the parental DCIBzL by two orders of magnitude, however they are significantly more hydrophobic.

Phosphoramidate derivatives as PET biotracers

In Dannoon *et al.*, we looked at GCPII-targeting small molecules derived from radiotracer 4-¹⁸F-fluorobenzamido-phosphoramidate ($K_i = 0.68 \text{ nM}$) [13] as possible PET (positron emission tomography) imaging molecules. Modification of the P1 serine/P1' glutamate phosphoramidate scaffold with 2-(3-hydroxypropyl)glycine, aminohexanoate, and fluorobenzoyl moieties yielded an irreversible inhibitor (**5**) with similar potency ($K_i=0.4 \text{ nM}$), but a more

rapid uptake (2.35 ± 0.91 % ID/g at 1 h) and retention (2.33 ± 0.50 % ID/g at 4 h) and high tumor-to-blood ratio (265:1 at 4 hours after injection).

To assess the effect of the AH chain length on binding, the phosphoramidate scaffold was modified by removing (**4**, CTT1056) or adding (**6**) an extra aminohexanoate (AH) linker to the previously identified inhibitor (**5**, CTT1057)¹⁶. The inhibitory potencies of the new compounds were three (**4**, $IC_{50} = 1.3$ nM) and two fold (**6**, $IC_{50} = 0.9$ nM) lower than that of the parental molecule (**5**, $IC_{50} = 0.4$ nM). All three molecules inhibit GCPII irreversibly which is favorable for imaging tracers. The overall fold of crystal structures of GCPII in complex with the phosphoramidates **4**, **5**, and **6** was nearly invariant for all three complexes. However, while the $F_o - F_c$ density for the whole of (**4**) and (**5**) is visible, the distal part of (**6**) with the P2 residue, the lipophilic linker and the fluorobenzoyl group cannot be seen, indicating these portions of inhibitor are flexible and do not interact with GCPII. Unlike (**4**) and (**6**), where the P1 carboxylate interacts

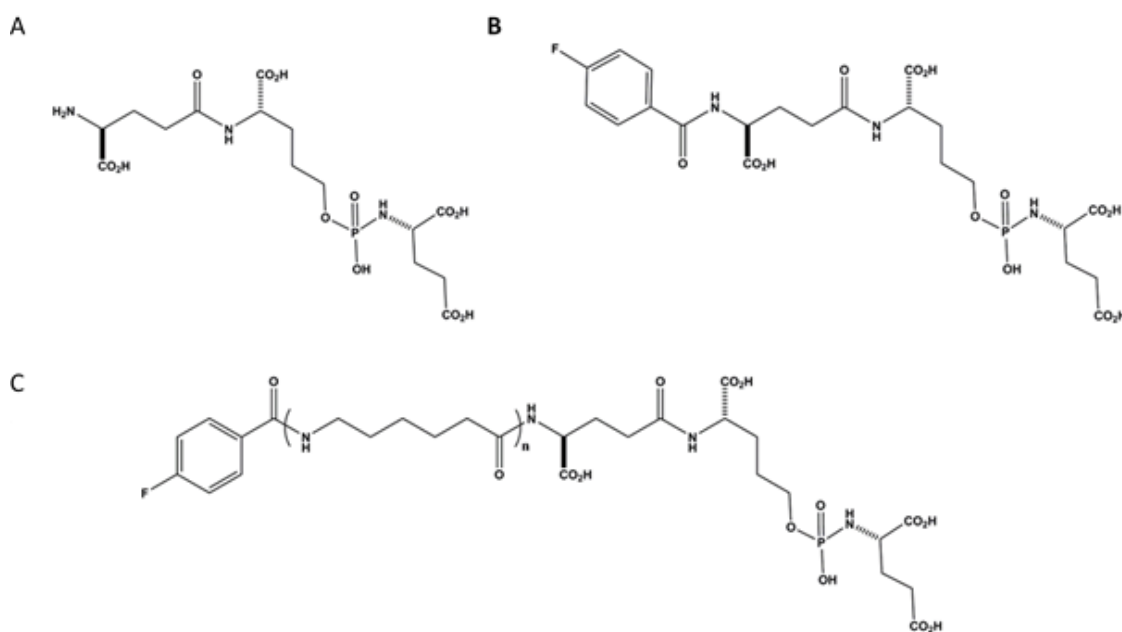


Figure 5: Phosphoramidate inhibitors

A) Phosphoramidate ($IC_{50}=14$ nM) B) 4-Fluorobenzamidophosphoramidate ($IC_{50}=1.4$ nM) C) Compound (**4**) $n=0$ ($IC_{50}=1.3$ nM); Compound (**5**) $n=1$ ($IC_{50}=0.4$ nM), Compound (**6**) $n=2$ ($IC_{50}=0.9$ nM)

directly with the arginine patch Arg534 and Arg536, the P1 carboxylate of (5) is shifted by 1.1 Å and interacts with Arg536 only. The difference in the length of the linkers (13, 20, and 28 Å for (4), (5), and (6) respectively) is the main cause for the different way of positioning of the distal parts of the inhibitors. The fluorobenzoyl ring of (4) forms weak π -cation interactions with the arene binding site and is parallel to the guanidinium group of Arg463. The atoms of the 20 Å linker in (5) reach into the arene binding site with the main-chain carbonyl accepting the hydrogen bond from the guanidinium group of Arg463. The fluorobenzoyl ring plane is virtually parallel to both indole and guanidinium groups of Trp541 and Arg511 of the arene-binding cleft, respectively [14]. A very similar orientation towards Trp541 and Arg511 had previously been described for the pteridine ring of FolGlu₂ [15]. There is no detectable electron density for the distal part of (6). All three tracers are specific and are detectable in PSMA⁺ cells only. A study in which the AH linker was inserted into another PET imaging agent (a DOTA-containing Affibody against HER2- a derivative of Z_{HER2-342}) indicates that the aliphatic linker addition might have a potential in improving the biodistribution pattern [16]. Our results are in good agreement with this study, as the tumor to blood ratios and *in vitro* uptake were significantly higher for [¹⁸F](6) compared to those of [¹⁸F](4) and [¹⁸F](5). However our results also indicate that elongation of the AH linker (as seen in [¹⁸F](6)) results in an increase in lipophilicity leading to decrease in renal clearance and tumor uptake compared to [¹⁸F](5). This study has analyzed the difference in binding of this small series of phosphoramidate derivatives with increasing lipophilicity, evaluated them as PET imaging agents and identified [¹⁸F](5) and [¹⁸F](6) as promising candidates.

Characterization of HDAC6 as tubulin deacetylase

In Skultetyova *et al.*, we perform a detailed kinetic analysis of tubulin deacetylation and a study of HDAC6/microtubule interactions, as the existing information on HDAC6 preference for different tubulin forms is unsatisfactory.

It has been reported that HDAC6 activity and localization is regulated by PTMs. To see if the protein we purified is modified we submitted it to analysis by LC-MS/MS. Since our preparation of HDAC6 displays no posttranslational modifications the activity observed for the protein we purified was considered to be the basal level of activity. We determined the enzymatic activity of our HDAC6 preparation to that described in literature. K_m values on previously described substrates were determined as 3.7, 4, 9.1, and 11.3 μM for Fluor de Lys, Boc-K(Ac)-AMC, (Ac)GAK(Ac)-AMC, and Fluor de Lys SIR substrates, respectively. When compared to values reported by Zou *et al.*, Miyake *et al.*, and Schultz *et al.*, we have concluded that while the K_m values are in good accord with the literature, the turnover numbers of our protein for Fluor de Lys and (Ac)GAK(Ac) substrates are one order of magnitude higher than previously described. We surmise that our HDAC6 preparation therefore contains more catalytically active molecules of enzyme per mol than those characterized elsewhere. The inhibition constants for three known inhibitors SAHA (5 nM), trichostatin A (TSA, 1.2 nM) and Nexturastat A (5.2 nM) were in the same range as previously described [17,18].

A lot of controversy exists concerning whether HDAC6 preferentially deacetylates free tubulin dimers or microtubules. Given that acetylation is a reversible modification it would be logical that HDAC6 preferred the substrate disfavored by the major tubulin acetyltransferase αTAT1 . The acetylase had been reported to preferentially deacetylate microtubules, albeit at a very slow rate. With the full length wild type HDAC6 from our preparation we see that the enzyme shows 1,500-fold preference for dimers over microtubules. The deacetylation rates are 0.6 s^{-1} and 0.0004 s^{-1} for tubulin dimers and stabilized MTs, respectively. To exclude possible interference from the stabilization agent we tested both taxol and GMPCPP stabilized microtubules with the same result. Last year Miyake *et al.*, when using the catalytic core of zebrafish HDAC6 observed 2.5-fold preference for dimers over microtubules. If this was true for the full length human

HDAC6, the deacetylation rate for microtubules would be 0.24 s^{-1} . Since the acetylation rate of α TAT1 has been determined to be 0.00044 s^{-1} this would have meant that microtubules existed in the deacetylated state only. The difference in our results compared to the results of Miyake *et al.*, indicates that residues outside the DD1/DD2 core are required for recognition of dimers and microtubules as a substrate. A similar microtubule sensing domain has been suggested for α TAT1. The pronounced difference in the turnover rate between dimeric tubulin and microtubules supports the hypothesis (formed by Skoge *et al.*, 2014 and Miyake *et al.*, 2016), that acetylation and deacetylation of tubulin are a result of opposing substrate preferences between HDAC6 and α TAT1 [19,20].

As the α AcLys40 lies within the microtubule lumen, accessibility is a challenge. Tubulin dimers integrated into microtubule also have a large portion of their surface inaccessible for interaction with MAPs. To see if the substrate preference stems from the limited accessibility of the α AcLys40 loop or if it is a result of suboptimal binding to tubulin surface we looked at deacetylation rates of other polymeric tubulin forms. We have compared microtubules, zinc sheets, and dolastatin-10 rings to tubulin dimers. The deacetylation rates of Dolastatin-10 rings and Zn-sheets are 100- and 750-fold slower than free tubulin. Our findings indicate that accessibility is not the rate limiting factor. Rather, the longitudinal and lateral interactions are important for optimal turnover of the substrate by HDAC6.

The Lys40 residue is located in a rather flexible loop formed by 20 amino acids from Gln31 to Asn50, with residues 37 – 42 being highly conserved across tubulins from various species. This raises the following questions: 1) is the sequence of the α Lys40 loop sufficient to be recognized as a substrate by HDAC6 2) If only 6 amino acids are conserved across the species how long a sequence is required for the optimal deacetylation by HDAC6 3) Is there a difference in the deacetylation rates between the α Lys40 loop in the form of a free peptide and within the context of $\alpha\beta$ -tubulin dimer? Using HPLC we compared the

deacetylation rates of α/β tubulin dimer and tri- to nonadecameric peptides derived of amino acids surrounding the central lysine of the α Lys40 loop to the deacetylation rate of dimers (quantification from Western blots). Our results show that with the increasing length of the peptide the rate of peptide conversion is decreasing. While the rate is 2.0 s^{-1} for the T3 (Abz-D[AcK]T-NH₂) tubulin peptide, it gradually decreases to 0.1 s^{-1} for peptides T17 (Abz-PDGQMPSD[AcK]TIGGGDDS-NH₂) and T19 (Abz-QPDGQMPSD[AcK]TIGGGDDSF-NH₂). Although this makes the tripeptide the substrate with the highest deacetylation rate, the α/β tubulin substrate is still deacetylated 12-fold faster. The difference in deacetylation rates indicates that interactions beyond the active site are necessary for optimal substrate turnover and recognition. This is further supported by K_m values for the peptides which are in the high micromolar range ($88 \text{ }\mu\text{M}$ to $328 \text{ }\mu\text{M}$ for T9 and T15, respectively), and indicate relatively low affinity of HDAC6 for the isolated α Lys40 sequences. The K_m value for tubulin dimer is $0.23 \text{ }\mu\text{M}$ and therefore the affinity towards free tubulin is nearly 400 x higher than for the best tubulin-derived peptide substrate. In case of tubulin, interaction with lateral and/or longitudinal interfaces seems to be required for maximum activity as indicated by these experiments and the deacetylation of tubulin polymers, where these surfaces are buried within the polymeric lattices.

One of the big questions of tubulin de/acetylation is how the deacetylases and acetyl transferase access the α Lys40 in microtubules, if it is buried in the lumen. The possibilities considered are: entering the lumen from the tips, accessing the loop through breaks existing within the microtubule lattice, or accessing it from the outside. Increased accessibility of the microtubule lumen might be caused by the bending of microtubules, which causes mechanical stress leading to torsion and consecutive defects in the microtubule lattice [21]. Also junctions between two neighboring protofilaments are not tight, but a gap forms between two adjacent dimers. The α Lys40 loop lies beneath this opening and can be modified,

but data suggests that a massive reorganization would have to take place in the microtubule for modifying enzymes to be able to access α Lys40. Szyk *et al.*, have shown that *in vitro* acetylation of microtubules is evenly distributed without bias for ends and this is probably due to stochastic but uniform diffusion of α TAT1 in the lumen [22]. Use of TIRF microscopy with immobilized rhodamine labeled microtubules permitted us to see that HDAC6 binds microtubules fast and without preference for ends. The dynamics of this interactions points towards HDAC6 binding the microtubule surface rather than entering from tips.

CONCLUSIONS

1. We have prepared new GCPII inhibitors and using X-ray crystallography studied their interaction with GCPII. The inhibitors, as clinically applicable agents, exhibited higher hydrophobicity than the parent molecules.
2. We have successfully established expression of HDAC6 in mammalian cells and purified the enzyme to near 100% homogeneity. We have unequivocally identified tubulin dimers as its preferred substrate and quantified the preference. Using different tubulin polymers, we have shown that accessibility of the α AcLys40 is not the rate determining factor and that efficiency of the tubulin deacetylation enzyme requires interactions additional to those with amino acids within the α AcLys40.

REFERENCES

1. Robinson, M.B., Blakely, R.D., Couto, R., Coyle, J.T. (1987) Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain. *J Biol Chem* **262**, 14498–506.
2. Pinto, J.T., Suffoletto, B.P., Berzin, T.M., Qiao, C.H., Lin, S., Tong, W.P., May, F., Mukherjee, B., Heston, W.D. (1996) Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **2**, 1445–51.
3. Bacich, D.J., Ramadan, E., O’Keefe, D.S., Bukhari, N., Wegorzewska, I., Ojeifo, O., Olszewski, R., Wrenn, C.C., Bzdega, T., Wroblewska, B., Heston, W.D., Neale, J.H. (2002) Deletion of the glutamate carboxypeptidase II gene in mice reveals a second enzyme activity that hydrolyzes N-acetylaspartylglutamate. *J Neurochem* **83**, 20–29.
4. Jackson, P.F., Tays, K.L., Maclin, K.M., Ko, Y.S., Li, W., Vitharana, D., Tsukamoto, T., Stoermer, D., Lu, X.C., Wozniak, K., Slusher, B.S. (2001) Design and pharmacological activity of phosphinic acid based NAALADase inhibitors. *J Med Chem* **44**, 4170–75.
5. Chen, H.P., Zhao, Y.T., Zhao, T.C. (2015) Histone deacetylases and mechanisms of regulation of gene expression. *Crit Rev Oncog* **20**, 35–47.
6. Boukari, H., Sackett, D.L., Schuck, P., Nossal, R.J. (2007) Single-walled tubulin ring polymers. *Biopolymers* **86**, 424–36.
7. Wolf, S.G., Mosser, G., Downing, K.H. (1993) Tubulin conformation in zinc-induced sheets and microtubes. *J Struct Biol* **111**, 190–99.
8. Xu, Z., Schaedel, L., Portran, D., Aguilar, A., Gaillard, J., Marinkovich, M.P., Thery, M., Nachury, M.V. (2017) Microtubules acquire resistance from mechanical breakage through intraluminal acetylation. *Science* **356**, 328–32.
9. 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.
10. Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H.L., Chua, K., Lombard, D., Mizeracki, A., Matthias, G., Alt, F.W., Khochbin, S., Matthias, P. (2008) Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol* **28**, 1688–1701.
11. Barinka, C., Byun, Y., Dusich, C.L., Banerjee, S.R., Chen, Y., Castanares, M., Kozikowski, A.P., Mease, R.C., Pomper, M.G., Lubkowski, J. (2008)

- Interactions between human glutamate carboxypeptidase II and urea-based inhibitors: structural characterization. *J Med Chem* **51**, 7737–43.
12. Wang, H., Byun, Y., Barinka, C., Pullambhatla, M., Bhang, H.E., Fox, J.J., Lubkowski, J., Mease, R.C., Pomper, M.G. (2010) Bioisosterism of urea-based GCPII inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 392–97.
 13. Mallari, J.P., Choy, C.J., Hu, Y., Martinez, A.R., Hosaka, M., Toriyabe, Y., Maung, J., Blecha, J.E., Pavkovic, S.F., Berkman, C.E. (2004) Stereoselective inhibition of glutamate carboxypeptidase by organophosphorus derivatives of glutamic acid. *Bioorg Med Chem* **12**, 6011–20.
 14. Ganguly, T., Danno, S., Hopkins, M.R., Murphy, S., Cahaya, H., Blecha, J.E., Jivan, S., Drake, C.R., Barinka, C., Jones, E.F., VanBrocklin, H.F., Berkman, C.E. (2015) A high-affinity [(18)F]-labeled phosphoramidate peptidomimetic PSMA-targeted inhibitor for PET imaging of prostate cancer. *Nucl Med Biol* **42**, 780–87.
 15. Navratil, M., Ptacek, J., Sacha, P., Starkova, J., Lubkowski, J., Barinka, C., Konvalinka, J. (2014) Structural and biochemical characterization of the folyl-poly-gamma-l-glutamate hydrolyzing activity of human glutamate carboxypeptidase II. *FEBS J* **281**, 3228–42.
 16. Tolmachev, V., Feldwisch, J., Lindborg, M., Baastrup, B., Sandstrom, M., Orlova, A. (2011) Influence of an aliphatic linker between DOTA and synthetic Z(HER2:342) Affibody molecule on targeting properties of the (111)In-labeled conjugate. *Nucl Med Biol* **38**, 697–706.
 17. Wagner, F.F., Olson, D.E., Gale, J.P., Kaya, T., Weiwer, M., Aidoud, N., Thomas, M., Davoine, E.L., Lemercier, B.C., Zhang, Y.L., Holson, E.B. (2013) Potent and selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) does not require a surface-binding motif. *J Med Chem* **56**, 1772–76.
 18. Bergman, J.A., Woan, K., Perez-Villarroel, P., Villagra, A., Sotomayor, E.M., Kozikowski, A.P. (2012) Selective histone deacetylase 6 inhibitors bearing substituted urea linkers inhibit melanoma cell growth. *J Med Chem* **55**, 9891–99.
 19. Skoge, R.H., Dolle, C., Ziegler, M. (2014) Regulation of SIRT2-dependent alpha-tubulin deacetylation by cellular NAD levels. *DNA Repair Amst* **23**, 33–38.
 20. Miyake, Y., Keusch, J.J., Wang, L., Saito, M., Hess, D., Wang, X., Melancon, B.J., Helquist, P., Gut, H., Matthias, P. (2016) Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. *Nat Chem Biol* **12**, 748–54.

21. Schaedel, L., John, K., Gaillard, J., Nachury, M.V., Blanchoin, L., Thery, M. (2015) Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat Mater* **14**, 1156–63.
22. Szyk, A., Deaconescu, A.M., Spector, J., Goodman, B., Valenstein, M.L., Ziolkowska, N.E., Kormendi, V., Grigorieff, N., Roll-Mecak, A. (2014) Molecular basis for age-dependent microtubule acetylation by tubulin acetyltransferase. *Cell* **157**, 1405–15.

CURRICULUM VITAE

Lubica Škultétyová, MSc.

Place of birth: Námestovo, Slovak Republic, 18.3.1979

Employment:

- 2008 – ongoing: research assistant, Institute of Biotechnology CAS, Prague/Vestec
- 2006 – 2007: research assistant, Institute of Molecular Genetics of the ASCR, Prague

Education:

- 2011 – ongoing: Doctor's program - Biochemistry, Faculty of Science Charles University in Prague.
- 2004-2006: Master's program - Biochemistry, Faculty of Natural Sciences of the Comenius University in Bratislava. Diploma thesis: Characterization and Partial Purification of Enzymes Involved in Regulation of Mitochondrial DNA Topology in *Candida parapsilosis*
- 2001-2004: Bachelor's program - Chemistry, Faculty of Natural Sciences of the Comenius University in Bratislava.

Conferences:

Molecular Life Sciences 2013, Frankfurt, Germany

XXIV. Biochemický zjazd SSBMB a ČSBMB, 2014, Bratislava, Slovak Republic

XXV. Biochemický sjezd SSBMB a ČSBMB, Prague, Slovak Republic

Certificates:

- Cambridge ESOL certificate - First Certificate in English

Grants:

- 2013-2015 GAUK: Structure-function characterization of Histone deacetylase 10 (HDAC10)

LIST OF PUBLICATIONS:

5. Plechanovova, A., Byun, Y., Alquicer, G., Skultetyova, L., Mlcochova, P., Nemcova, A., Kim, H. J., Navratil, M., Mease, R., Lubkowski, J., Pomper, M., Konvalinka, J., Rulisek, L., Barinka, C. 2011. Novel substrate-based inhibitors of human glutamate carboxypeptidase II with enhanced lipophilicity. *J Med Chem* 54:7535-7546.
6. Pavlicek, J., Ptacek, J., Cerny, J., Byun, Y., Skultetyova, L., Pomper, M. G., Lubkowski, J., Barinka, C. 2014. Structural characterization of P1'-diversified urea-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II. *Bioorg Med Chem Lett* 24:2340-2345.
7. Dannoos, S., Ganguly, T., Cahaya, H., Geruntho, J. J., Galliher, M. S., Beyer, S. K., Choy, C.J., Hopkins, M.R., Regan, M., Blecha, J. E., Skultetyova, L., Drake, C.R., Jivan, S., Barinka, C., Jones, E. F., Berkman, C. E., VanBrocklin, H. F. 2016. Structure-Activity Relationship of (18)F-Labeled Phosphoramidate Peptidomimetic Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeted Inhibitor Analogues for PET Imaging of Prostate Cancer. *J Med Chem* 59:5684-5694.
8. Skultetyova, L., Ustinova, K., Kutil, Z., Novakova, Z., Pavlicek, J., Mikesova, J., Trapl, D., Baranova, P., Havlinova, B., Hubalek, M., Lansky, Z., Barinka, C. 2017. Human histone deacetylase 6 shows strong preference for tubulin dimers over assembled microtubules. *Sci Rep* 7:11547