



Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Pediatrie

Mgr. Zdeněk Škrott, vědecký pracovník Ústavu molekulární a translační medicíny, student prezenční formy doktorského studijního programu *Pediatrie* na LF UP

Téma práce: „**Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer treatment: the mechanism of action of drug disulfiram**“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 26. listopadu 2019 ve 12:30 hod.

Komise:

předseda: prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.přítomen.....

místopředseda: doc. MUDr. Jiřina Zapletalová, Ph.D.přítomna.....

členové: prof. MUDr. Dagmar Pospíšilová, Ph.D. ...přítomna.....

prof. MUDr. Zdeněk Doležel, CSc.omluven.....

prof. MUDr. František Kopřiva, Ph.D.přítomen.....

MUDr. Kateřina Bouchalová, Ph.D.přítomna.....

MUDr. Petr Müller, Ph.D.přítomen.....

MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.přítomen.....

Oponenti: prof. Simon Bekker-Jensen, Ph.D.omluven.....
Center for Healthy Aging, University of Copenhagen

MUDr. Petr Müller, Ph.D.přítomen.....
Masarykův onkologický ústav v Brně

Školitel: Mgr. Martin Mistrík, Ph.D.přítomen.....

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo ...7.... členů komise. Kladně hlasovalo ...7.... členů, záporně0... členů, neplatných lístků bylo odevzdáno ...0....

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **Mgr. Zdeněk Škrott** obhájil/~~neobhájil~~* disertační práci a doporučili/~~nedoporučili~~* udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.
předseda komise

* nehodící se škrtněte

Zápis o diskuzi z průběhu obhajoby disertační práce Mgr. Zdeňka Škrotta, Dětská klinika LF UP a FNOL, 26. 11. 2019.

Po představení uchazeče a členů komise, prezentoval Zdeněk Škrott stěžejní výsledky své disertační práce, poté byly předčteny posudky a následovala diskuze:

Otázky a komentáře oponenta MUDr. Petra Mullera, Ph.D.:

1. Pomocí HPLC-MS bylo prokázáno, že disulfiram je metabolizován na měďnatý komplex CuET. Lze odhadnout, jaká část z celkového disulfiramu je takto metabolizována? Byly v poslední době nalezeny nějaké další metabolity s obdobnou aktivitou jako CuET?

Odpověď: Z doposud naměřených dat je těžké přesně odhadnout, kolik disulfiramu se metabolizuje na CuET, ale je pravděpodobné, že se bude jednat o velmi malé procento. Při jednorázové aplikaci disulfiramu do laboratorní myši (50 mg disulfiramu / kg váhy zvířete, tedy 1 mg u 20 gramové myši) lze detekovat po několika hodinách koncentrace CuET v séru v řádech desítek ng na ml. Je pravděpodobné, že při přídávku mědi (např. glukonátem měďnatým) by koncentrace CuET byly vyšší. Je zajímavé, že v in vitro podmínkách v kultivačním medium používaném při experimentech s buněčnými kulturami se disulfiram v přítomnosti měďnatých ionů mění na CuET velmi efektivně (asi z 80 %). Žádný další metabolit disulfiramu podobný CuET objeven nebyl.

2. CuET podobně jako tunicamycin a thapsigargin vede k aktivaci UPR projevující se zejména ve zvýšení exprese proteinu ATF4. Inhibitor p97 NMS-873 však tak silnou odpověď nevyvolává, existuje pro toto pozorování nějaké vysvětlení? Našel jste nějaké další rozdíly v působení CuET a NMS-873?

Odpověď: Slabší indukce proteinu ATF4 po aplikaci NMS-873 může být dána jak použitou koncentrací látky, tak dobou působení. Najít přesné vysvětlení může být značně složité, neboť jak ukazují ve své práci Her et al. (Cell Chemical Biology, 2016) celá řada inhibitorů p97, které mají velmi podobný či zcela shodný mechanismus inhibice p97, má zároveň značně odlišný dopad na expresi proteinu ATF4, přestože jsou použity ve vhodných koncentracích. To potvrzuje, že odpověď buňky na látky inhibující stejný enzym může být značně odlišná. Rozdílů mezi NMS-873 a CuET je celá řada, přestože působí ve stejné dráze. Hlavní rozdíl je, že CuET indukuje imoagregaci proteinů, což vede např. k velmi silné indukci odpovědi na teplotní šok.

3. Autor několika na sobě nezávislými experimenty přesvědčivě ukazuje, že mechanismus působení CuET spočívá v agregaci proteinu NPL4. Nicméně pro

vysvětlení samotné molekulární podstaty agregace NPL4 po působení CuET by bylo zapotřebí učinit další experimenty s izolovaným proteinem NPL4. Byly v rámci projektu učiněny pokusy ukazující schopnost CuET agregovat purifikovaný NPL4? Co způsobí přidání CuET do buněčného lyzátu? Lze předpokládat, že povede k agregaci NPL4?

Odpověď: V rámci projektu jsme prokázali, že CuET interaguje s purifikovanou NPL4 pomocí metody isothermální kalorimetrie. Dále jsme prokázali, že pravděpodobně dochází i ke změně konformace NPL4 po interakci s CuET pomocí metody Drug-affinity responsive target stability. Samotnou agregaci izolované NPL4 nebo v lyzátu se ale prokázat nepodařilo, což naznačuje, že v procesu agregace NPL4 může být zapojen aktivní buněčný děj.

4. Spillier Q et al. v článku „Anti-alcohol abuse drug disulfiram inhibits human PHGDH via disruption of its active tetrameric form through a specific cysteine oxidation“ (Scientific Reports 2019) ukazují, že disulfiram může vést k modifikaci proteinových SH skupin cysteinu. Je možné, že i CuET vytváří podobné reakce? Ovlivňuje přidání cysteinu nebo acetylcysteinu účinek CuET?

Odpověď: Schopnost disulfiramu nebo dithiokarbamátu reagovat se SH skupinami je známá již dlouho a touto reakcí bylo i vysvětlováno působení disulfiramu na aldehyd dehydrogenázu (Vallari et al. Science, 1982). Jak se ale později ukázalo, mechanismus inhibice je jiný (Shen et al. Biochemical Pharmacology, 2001), a je tedy ukázkou, zda jsou tyto reakce relevantní z hlediska situace in vivo. Vyloučit tyto reakce u CuET nelze, ale disulfiram nebo dithiokarbamát by měl být z hlediska modifikací SH skupin reaktivnější. Je pravdou, že vysoký přídavek N-acetylcysteinu snižuje účinek CuET, ale bylo prokázáno, že se tak děje skrze snižování koncentrace CuET.

Otázky a komentáře oponenta prof. Simona Bekkera-Jensena, Ph.D.:

1. Všechny obrázky v části introduction byly převzaty z publikovaných prací. Toto musí být alespoň citováno v legendách obrázků!

Odpověď: Jak je uvedeno v metodice, odstavec „3.21 Figures preparation, data analysis, used software“, strana 45, všechny obrázky byly připraveny mnou s uvedením použitého softwaru.

2. V části 1.2, strana 4, je diskutován mechanismus aktivit různých tříd Ubiquitin E3 ligáz. Přestože jsou zvány jako ligázy, je důležité upozornit, že RING finger protein nejsou enzymy v pravém slova smyslu. Spíše pouze umožňují interakci mezi E2 enzymem a substrátem. Není tedy správné nazývat RING doménu jako katalytickou.

Odpověď: Je potřeba souhlasit s oponentem, že funkce RING E3 ligáz je chápána zejména tak, že umožňuje interakci mezi E2 a substrátem. Ovšem mnohé články, i recentní a

v respektovaných časopisech (Plechanovová et al. Nature. 2012, Plechanovová et al. Nature Structural and Molecular Biology. 2010, Metzger et al, Biochimica et Biophysica Acta. 2014.) jednoznačně hovoří o tom, že RING doména katalyzuje ubikvitinaci substrátu, má katalytickou roli a katalyzuje přímý přenos ubikvitinu z E2 na substrát. Nejedná se tedy o pasivní protein s pouhou podpůrnou funkcí. Z toho důvodu si myslím, že nazývání RING domény jako katalytické není chybné a je ve shodě s publikovanou literaturou.

3. Na straně 11: “ Activated PERK ... disassembles polysomes ...” Nesouhlasím příliš s tím tvrzením a není uvedena citace, která by potvrzovala toto tvrzení.

Odpověď: Celá věta zní: „Activated PERK phosphorylates translation initiation factor eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha), which in turn disassembles polysomes and decreases total protein synthesis...“. Fakt že PERK kináza fosforyluje eIF2 α , který následně snižuje celkovou proteosyntézu je znám a řádně ocitován. Citace konkrétně zmiňující rozpad polysomů skutečně chybí, ale jedná se o známý a akceptovaný fakt (Anderson et al, Trends in Biochemical Sciences, 2007.).

4. Na straně 13 jsou diskutovány jaderná stresová tělíska (Nuclear stress bodies) a jsou popsány, že jsou representovány navázáním proteinu HSF1 na DNA. Strukturně jsou tyto tělíska tvořeny ne DNA ale lncRNA HSATIII.

Odpověď: Celá věta zní: „HSF1 is activated leading to its oligomerization (formation of trimeric form), phosphorylation and translocation to nucleus, where it binds so called heat shock elements on DNA (after binding to DNA HSF1 can be detected as typical nuclear foci called as nuclear stress bodies).“ Jedná se zřejmě o nedorozumění, neboť struktura tělísek není nijak diskutována a je známo, že obsahují velké množství lncRNA transkriptů. Ale jak je uvedeno v literatuře (Biamonti et al, Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010), tělíska se vytváří díky přímé interakci HSF1 s pericentrickými tandemovými repeticemi DNA, které odpovídají aktivním transkripčním místům pro nekódující satelitní transkripty.

5. Na obrázku 19 je ukázáno, že účinek CuET do jisté míry kopíruje odpověď na teplotní šok. Na WB analýze se ovšem nezdá být příliš silná odpověď na teplotní šok. Je to dáno tím, že teplotní šok neproběhl správně? Toto by mělo být doplněno také imunofluorescenční analýzou na HSF1.

Odpověď: Teplotní šok byl proveden jen jako pozitivní kontrola pro srovnání s efektem CuET. Lze jednoznačně vidět nárůst proteinu HSP70 i posun migrace proteinu HSF1, což naznačuje jeho fosforylaci. To že je efekt na tyto protein po CuET výraznější jen dokazuje,

jak silnou odpověď CuET vyvolává. Teplotní šok byl proveden klasickým postupem, tedy 42 °C na 1 hodinu. Dodatečná mikroskopická detekce HSF1 proteinu by byla jistě vhodná.

6. WT NPL4 agregáty jasně kolokalizují s HSP70 a HSF1 po CuET. MUT NPL4 indukuje spontánní agregáty dokonce bez přítomnosti CuET, které ovšem nekolokalizují s HSF1 a HSP70. Znamená to tedy, že se jedná o částečně jiné struktury? Toto není nijak diskutováno a vhodná kvantifikace by umožnila lepší interpretaci výsledků.

Odpověď: Zde se jedná pravděpodobně o přehlédnutí oponenta, neboť jak je ukázáno na obrázku 19, jak WT NPL4 agregáty indukované CuET, tak spontánní MUT-NPL4 agregáty nekolokalizují s HSF1, a naopak oba typy kolokalizují s HSP70. Jsou tedy v tomto ohledu stejné, což naznačuje, že se jedná o velmi podobné struktury.

7. Na straně 85 je zmíněno, že enzym UBA1 je nutný pro všechny ubikvitinace v buňce. Jak je ale i zmíněno v kapitole introduction, savčí buňky mají ještě další E1 enzym, který je zodpovědný 5-10% ubikvitinací v buňce. A tento enzym není inhibován UBA1 inhibitorem.

Odpověď: Oponent má pravdu, že nelze napsat, že všechny ubikvitinace jsou závislé na UBA1 enzymu. Jak se uvádí v článku popisujícím použitý UBA1 inhibitor (Hyer et al. Nature Medicine, 2018), UBA1 enzym je zodpovědný za více než 99% buněčných ubikvitinací, a tedy by mělo být spíše napsáno, že téměř všechny ubikvitinace jsou na něm závislé.

Otázky členů komise a hostů:

1. Doc. Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.: Dochází k agregaci NPL4 pouze v jádře nebo také v cytoplazmě a jaký to má vliv na endoplasmatické retikulum? Jakou roli hrají HSF1 stresová tělíska?

Odpověď: K agregaci dochází jak v jádře, tak i v cytoplazmě, pouze charakter je agregátů je poněkud odlišný – zatímco v jádře vznikají větší jasně viditelné agregáty, v cytoplazmě se jedná o menší útvary, které jsou ale imobilní. To také vysvětluje, proč po CuET dochází k silnému stresu na endoplasmatickém retikulu.

Přesná úloha HSF1 stresových tělísek není objasněna. Přestože k jejich tvorbě dochází se stejnou kinetikou, s jakou dochází k vazbě HSF1 na tzv. heat-shock elementy, kde indukuje transkripci genů zapojených v odpovědi na teplotní šok (např. HSP70), HSF1 stresová tělíska nejsou místem, kde by probíhala transkripce klasických genů zapojených v odpovědi na

teplotní šok. Jedná se o heterochromatinové oblasti, kde HSF1 indukuje transkripci dlouhých nekódujících RNA.

2. MUDr. Kateřina Bouchalová, Ph.D.: Z jakého důvodu jste zvolili RPE1 linii? A proč jste se zaměřili primárně na rakovinu prsu?

Odpověď: RPE1 linii jsme zvolili jako model nenádorové epiteliální buněčné linie pro kontrolu účinku CuET na nenádorové buňky.

Zaměřili jsme se na rakovinu prsu zejména z toho důvodu, že již v literatuře existovala jistě zmínky o aktivitě disulfiram u této formy rakoviny, jednalo se zejména o případovou studii a klinický test metabolitu disulfiram, který se ukázal jako účinný při kombinaci se standardní chemoterapií. Zároveň preklinické modely rakoviny prsu byly silně responzivní na CuET.

3. Prof. MUDr. Dagmar Pospíšilová, Ph.D.: Myslíte, že by disulfiram mohl být účinný při léčbě pacientů s Diamond-Blackfan anemií trpících rakovinou, která se projevuje zvýšeným ribozomálním stresem?

Odpověď: To je těžké odhadnout. Mohlo by záležet na tom, jak se tento ribozomální stres projevuje. Pokud dochází ke zvýšené tvorbě chybně translatovaných nebo poskládaných proteinů, musí být tyto proteiny zdegradovány, na čemž se podílí p97/NPL4 proteiny. Při jejich inhibici by tedy docházelo k akumulaci těchto proteinů, což by mohlo vést k silnému buněčnému stresu. Naopak, pokud dochází k snížení translace proteinů, je možné, že by pak buňky nebyly na CuET nijak zvlášť citlivé. Je známo, že utlumení translace proteinů nízkou dávkou inhibitoru ribozomů dochází k částečné resistenci na inhibitory proteazomu, které mají do jisté míry podobný účinek jako CuET.