

Evaluation of PhD dissertation by Zdenek Skrott

In his thesis, Zdenek Skrott investigates the mechanism of action and potential of drug repurposing for the old anti-alcoholism compound disulfiram. He manages to establish that the known anti-cancer activity is due to the formation of a complex between a metabolite of disulfiram and copper ions; CuET. He also manages to uncover a very plausible mechanism for the cytotoxic activity of CuET, namely the binding and inactivation of the p97 adaptor, NPL4. Part of the work was published in Nature with Zdenek as a first author, which is a very impressive feat.

Overall, the thesis is rather poorly written, indicating that scientific writing is not his strong side. Scientifically, however, the thesis and the underlying work is very impressive. It is based on a large body of experiments using a wide range of techniques, and the student has managed to elucidate the basic problem from many different angles. The student has also been a prolific author, not just publishing in Nature, but also writing a review and co-authored a number of publications.

Introduction

In the introduction, Zdenek covers a wide range of subjects, all of which are relevant to the context of the work. It is constructed in a highly logical sense, dealing first with the role and mechanisms of protein degradation, ubiquitin as a posttranslational modifier and the workings of the proteasome. This is followed by more specific chapters on protein quality control and the biology behind the ubiquitin-dependent segregase 97 and its many co-factors. Finally, these pathways are looked at in the context of cancer, before the disulfiram compound is introduced.

The text as a whole suffers from the presence of many grammatical errors and linguistic mistakes. Words like “the” and “a” are very often missing in sentences and words are also often shifted around. From the one-page “Introduction paragraph” (1) I counted no less than 18 such mistakes! The language also appears un-scientific and too informal at places. A good example is the long paragraph on the development of the first proteasome inhibitors for clinical use (page 24). This is written in a much too passionate and informal style for a scientific publication. In sum, it appears that English and scientific writing is not the student’s strongest style. I understand of course that his English language skills may not be perfectly developed, and overall it does not represent a problem for the understanding by the reader.

Specific points:

All figures in the introduction are borrowed from published articles. This must at least be referenced in the figure legend!

In section 1.2 on page 4, the mechanism of action of different classes of E3 ubiquitin ligases is discussed. Even though they are all called ligases, it is important to notice that RING finger proteins are not enzymes in the classical sense. They rather mediate interaction between E2 enzymes with their substrates. Thus, it is incorrect to call the RING domain “catalytic”.

Page 11: “Activated PERK ... disassembles polysomes ...” I do not quite agree with this statement and there is no reference to support the claim.

Page 13: Nuclear stress bodies are discussed, and explained to represent proteins like HSF1 binding to DNA. The structural scaffold of these bodies is however not DNA but the lncRNA HSATIII.

Results

As mentioned above, the results section of the thesis is very impressive and clearly demonstrates the student's ability to perform a large number of coherent experiments using a wide range of techniques. Results are presented in a logical order and described comprehensively. The writing style is still not fantastic, and often the reader could benefit from more information in the figure legends – like the kinds of cells being used, meaning of abbreviations etc., these things are not consistently mentioned. Figure labelling is also missing in some places – like X-axis legends in Figure 9.

There are a lot of immunofluorescence data in the thesis, and they all appear to be of a high quality. Only some of these experiments have been quantified with respect to (co-)localization, which would have been useful.

In figure 19, the cellular response to CuET is shown to bear some resemblance to the heat shock response. In the western blots in 19b, there does not appear to be a strong response to heat shock itself, suggesting that the treatment did not work properly? This could also have been validated by immunostaining for HSF1. WT NPL4 aggregates clearly co-localize with HSF1 and HSP70 upon CuET treatment (19a,c). Mut-NPL4 induces similar aggregates even in the absence of CuET (19 d), but these structures do not appear to co-localize with HSF1 and HSP70. Does this imply that it is a different kind of structure? It is not really discussed in the text and a proper quantification of these stainings would have helped the interpretation.

Besides these few issues, I maintain that the results section is very convincing and that full credit should be given to the student for an excellent piece of experimental work.

Discussion

This section is very good and the student touches on a number of important subjects. He discusses the balance between known side effects of disulfiram and the benefits of the drug for cancer patients. He also discusses the suitability of different inhibitors of the ubiquitin-proteasome system – just to mention a few. It is clear that the student manages to bring a lot of context to his results and define the best way forward. I only have one little objection to this section: At the bottom of page 85 it is mentioned that the UBA1 enzyme is indispensable for all ubiquitination. However, as is even mentioned in the Introductory chapter, mammalian cells have an additional ubiquitin E1 enzyme, responsible for 5-10% of cellular ubiquitination. And this enzyme is not targeted by the UBA1 inhibitors.

Recommendation / Conclusion

In conclusion, it is my pleasure to **recommend this dissertation for defence. After a successful defence, the candidate should be conferred the academic title „doctor“ (Ph.D.), in accordance with paragraph 47 of the Higher Education Act No. 111/98 Coll.**

With kind regards,

Simon Bekker-Jensen, Professor, PhD
University of Copenhagen
Center for Healthy Aging
Blegdamsvej 3B
2200 Copenhagen N
DENMARK

+45 20204993
sbj@sund.ku.dk

Brno 20. října 2019

prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.
předseda oborové rady DSP Pediatrie
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Hněvotínská 3 | 779 00 Olomouc

Posudek oponenta disertační práce

Autor práce: Mgr. Zdeněk Škrott

Název práce: Targeting the ubiquitin-proteasome system for cancer treatment:
the mechanism of action of drug disulfiram

Oponent: MUDr. Petr Müller, Ph.D.
Regionální centrum aplikované molekulární onkologie (RECAMO)
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7 | 65653 Brno
Email: muller@mou.cz Tel.: 725 820 881, 543133301

Autor se ve své disertační práci zabývá mechanismem protinádorového účinku disulfiramu, látky původně určené kléčbě závislosti na alkoholu. Disertační práce si kladla tyto cíle: 1) identifikovat aktivní metabolit disulfiramu zodpovědný za protirakovinový účinek. 2) Odhalit mechanismus jeho působení v nádorových buňkách, zejména ve vztahu k degradaci proteinů. 3) Nalézt potenciální molekulární cíl určující jeho protinádorovou aktivitu. 4) Popsat fenotypy spojené s inhibicí cílového proteinu.

V průběhu celé práce se autor věnuje stanoveným cílům, dílčí výsledky na sebe logicky navazují a čtenář tak může získat ucelený obraz o postupném získávání poznatků a jejich verifikaci. Na práci oceňuji i prezentaci negativních výsledků jako je například testování inhibice proteasomu nebo deubiquitináz, jejichž kritické vyhodnocení umožnilo odhalit úlohu proteinu p97 a NPL4 při působení měďnatého dithiokarbamatového komplexu (CuET). Díky systematické vědecké práci, kritickému přístupu k získaným výsledkům a využití široké škály metodických přístupů se autorovi podařilo dosáhnout několika klíčových poznatků, které lze shrnout v následujících bodech. 1) Pomocí nově vyvinuté analytické metody založené na HPLC MS se autorovi podařilo prokázat, že disulfiram je *in vivo* konvertován na aktivní metabolit CuET. 2) Autor ukázal, že CuET nevede k přímé inhibici proteasomu nebo deubiquitináz, přestože v buňce dochází k akumulaci polyubikvitinovaných agregátů. 3) Podařilo se mu identifikovat protein NPL4, který v důsledku působení CuET agreguje a znemožňuje fungování segregázy p97. 4) Práce popsala mechanismy vedoucí k narušení proteinové homeostázy a aktivaci stresové odpovědi v důsledku inhibice NPL4 a p97.

MUDr. Petr Müller Ph.D.
Tel. +420 543 13 3301
E-mail: muller@mou.cz

O kvalitách disertační práce svědčí zejména to, že prezentované výsledky tvoří podklad pro publikaci „Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4“, která byla uveřejněna v časopise Nature (IF 43) v roce 2017 a Zdeněk Škroť je zde hlavním autorem. Další významnou prvoautorskou publikací týkající se tématu disertační práce je recentní publikace „Disulfiram's anti-cancer activity reflects targeting NPL4, not inhibition of aldehyde dehydrogenase“ uveřejněné v roce 2019 v časopise Oncogene (IF 6,8). Vedle těchto publikací je Zdeněk Škroť spoluautorem na řadě dalších publikací přesahujících rámec jeho disertační práce.

Formální stránka práce

Předložená práce je sepsána v anglickém jazyce, čítá celkem 118 standardních stran a působí vyrovnaným a kompaktním dojmem. Práce má klasické členění zahrnující: Abstrakt, úvod, cíle, metody, výsledky diskuze, souhrn, citace a přílohy. Text obsahuje více jak 200 citací, jejichž podrobný výčet uvedený na konci práce svědčí o autorově důkladném studiu tématu. Na práci rovněž oceňuji použití původních citací, které zejména v úvodu práce dobře ilustrují historický vývoj studované problematiky. Úvodní část je vhodně doplněna o názorná schémata vysvětlující studovanou problematiku. Výsledková část je pak doplněna o původní obrázky. Všechny obrázky a schémata jsou velmi kvalitní jak po grafické, tak i obsahové stránce.

Závěr a Diskuze

Diskuze svědčí o autorově schopnosti kritického hodnocení výsledků a důkladném studiu odborných článků. Diskuze není pouhým souhrnem získaných výsledků a umožňuje tak práci zařadit do širšího kontextu týkající se regulace proteinové homeostázy. Závěry této práce jsou využitelné i v aplikovaném výzkumu. Získané výsledky ukazují, že aktivní metabolit disulfiramu CuET může být použit jako výchozí molekula pro klinické testování. Objev molekulárního cíle pro CuET může vést k lepšímu výběru pacientů odpovídajících na tento typ terapie. Nalezení NPL4 a p97 jako cíle protinádorové terapie pak otevírá nové možnosti pro hledání dalších nízkomolekulárních látek zasahujících do proteinové homeostázy u nádorů.

Předložená práce je důkazem toho, že se autor intenzivně věnoval jak experimentální, tak i teoretické stránce a splňuje tak veškerá kritéria nutná k její obhajobě. Disertační práci proto doporučuji k obhajobě a hodnotím jako výbornou.

MUDr. Petr Müller Ph.D.



V souvislosti s obhajobou disertační práce mám k autorovi několik otázek:

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?
2. CuET podobně jako tunicamycin a thapsigargin vedou 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?
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?
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?