



# Politechnika Wroclawska

---

Wroclaw, 23.05.2019

Dr hab. Łukasz Berlicki  
Zakład Chemii Bioorganicznej  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Wroclawska  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27  
50-370 Wroclaw  
lukasz.berlicki@pwr.edu.pl

**Recenzja pracy doktorskiej mgr. inż. Radosława Kitel, pt.: "Biophysical characterization of molecular mechanism of actin nucleation by Spire and its binding partner Formin and discovery of small-molecule chemical probes impairing the Spire-FMN2 interaction"**

Recenzowana praca doktorska mgr. inż. Radosława Kitel została wykonana pod opieką prof. dr. Tadeusza Holaka i opisuje badania dotyczące roli białek Spire i forminy w nukleacji aktyny oraz poszukiwania niskocząsteczkowych inhibitorów oddziaływania Spire-formina FMN2. Analizowane oddziaływania białko-białko są związane z tworzeniem i dynamiką cytoszkieletu aktynowego a także z procesami przerzutowania nowotworów.

Do tej pory opisano znaczącą liczbę oddziaływań białko-białko, które są powiązane z rozwojem różnego rodzaju nowotworów. Skuteczność blokowanie wielu z tych celów molekularnych została potwierdzona poprzez wprowadzenie związków oddziałujących z nimi do badań klinicznych lub praktyki leczenia nowotworów. Jednakże oczywistym jest, że skuteczność znanych terapii w dalszym ciągu nie jest zadowalająca. Jednym z ważnych celów dla leków przeciwnowotworowych jest cytoszkielet komórki. Do tej pory udało się udowodnić niezwykle skuteczne działanie związków wiążących się z mikrotubulami – a w szczególności bardzo duży sukces odniósł taksol. Badania dotyczące cytoszkieletu

aktywnego są znacznie mniej zaawansowane, choć wydaje się, że potencjał celów molekularnych powiązanych z tworzeniem się tych struktur jest bardzo duży ze względu na ich udowodnione powiązanie z tworzeniem się przerzutów nowotworów, które są niezwykle trudne do leczenia. W tym kontekście praca doktorska mgr. inż. Radosława Kitel porusza zagadnienia o dużym znaczeniu dla rozwoju terapii przeciwnowotworowych. Jednocześnie należy zauważyć, że ze względu na duże skomplikowanie badanych procesów i niewystarczającą ich znajomość podjęty temat badawczy jest niezwykle ambitny.

Praca doktorska mgr. inż. Radosława Kitel liczy 106 stron i została napisana w języku angielskim z wyjątkiem jednostronicowego streszczenia w języku polskim. Praca jest podzielona w sposób klasyczny na wstęp, cel pracy, wyniki, dyskusję, materiały i metody oraz odnośniki literaturowe. Do pracy dołączono 15 stron materiałów dodatkowych oraz filmy zapisane na płycie CD. Ten ostatni element jest bardzo ciekawym i rzadko spotykanym dodatkiem do prac doktorskich. Co ważne, w materiałach dodatkowych znajduje się tabela jednoznacznie wyjaśniająca role wszystkich współpracowników w diskutowanym projekcie, co pozwala jednoznacznie wskazać zakres prac wykonanych przez Doktoranta.

Praca doktorska mgr. inż. Radosława Kitel jest zredagowana w sposób niezwykle staranny i opatrzona szeregiem dobrze przemyślanych i wysokiej jakości rysunków, które znacząco ułatwiają odbiór tekstu. Można wskazać tylko nieliczne uchybienia takie jak: a) Obrazy otrzymane techniką ZMW i przedstawione na rysunku 26b są praktycznie nieczytelne; b) na rysunku 38D związki opisane są jako 'Temperature [°C]' c) nie jest wskazany opis panelu D na związku 38.

Doktorant we wstępie zbiera dostępne w literaturze informacje na temat cytoszkieletu aktywnego, procesów jego powstawania i kontroli. Dodatkowo krótko omówiona jest rola cytoszkieletu aktywnego w powstawaniu przerzutów nowotworów i znalezione do tej pory związki chemiczne, które mogą kontrolować ten proces. Wstęp bardzo dobrze wprowadza w trudną tematykę doktoratu i jednoznacznie pokazuje, że niezbędne są dalsze badania.

Pierwsza część rozdziału 'Wyniki' opisuje otrzymanie kilkunastu konstruktów białkowych, które były konieczne do dalszych badań. Niewątpliwie, ta część badań wymagała znaczącego nakładu pracy eksperymentalnej, pomimo, że z punktu widzenia całego projektu może być uznawana za wstępne przygotowanie materiału do dalszych analiz. Następnie wybrane białka były odpowiednio znakowane a także podjęto próby ich dimeryzacji (nieudane). Tak otrzymane białka wstępnie przetestowano udowadniając, że wykazują one żądane funkcje.

Kolejny podrozdział przedstawia zastosowanie techniki ZMW do analizy nukleacji aktyny w czasie rzeczywistym. Wcześniej przygotowany konstrukt białkowy DB-dmABCD1 był immobilizowany na dnie dołków pomiarowych a następnie badano tworzenie oligomerów/polimerów aktyny. Wykazano, że filamenty aktyny nie tworzą jeżeli obecna jest jedynie domena WH2 białka SPIRE. Na tej podstawie zaproponowano mechanizm tworzenia filamentów aktynowych polegający na współdziałaniu białek SPIRE i FMN2. Jednakże warto zauważyć, że pełne potwierdzenie eksperymentalne zaproponowanego modelu wymagałoby znaczącej liczby dodatkowych eksperymentów.

Druga część pracy doktorskiej jest poświęcona poszukiwaniu niskocząsteczkowych związków, które hamowałyby oddziaływanie domeny KIND białka SPIRE z formą FMN2. Jest to dobrze przemyślany projekt naukowy wykorzystujący szereg współczesnych metod komputerowych i eksperymentalnych w celu skutecznego poszukiwania ligandów wybranego białka. Zaczynając od zbudowania odpowiedniego farmakoforu, poprzez przeszukiwanie bazy ZINC a następnie dokowanie wybranych związków do miejsca aktywnego zidentyfikowano szereg potencjalnych inhibitorów. 8 związków z tej grupy przetestowano eksperymentalnie poprzez analizę zmiany temperatury topnienia, oraz perturbacji widm 1D i 2D NMR. Ostatecznie potwierdzono wiązanie związku RK-4 do celu molekularnego. W tym miejscu należy zaznaczyć, że używanie podwójnych oznaczeń związków (RK i ZINC) utrudnia odbiór tekstu. Czy można oszacować stałą wiązania RK-4 do domeny KIND1?

Następnie przetestowano 14 pochodnych indolu względem domen KIND1 i KIND2 i wykazano, że związek A07 wiąże się do KIND2. Udało się wyznaczyć jego stałą wiązania względem KIND2 wynoszącą 4.2 mM. Czy na podstawie struktury wymodelowanego kompleksu związków RK-4 lub A07 z białkiem KIND można wskazać dalsze możliwe ścieżki optymalizacji struktury tych inhibitorów?

Drugim z zastosowanych podejść do poszukiwania ligandów domen KIND było użycie testu przesiewowego dla 120 fragmentów molekularnych, tj. związków chemicznych spełniających zasadę trzech. W tym przypadku także zmiana temperatury topnienia celu molekularnego była użyta jako metoda ewaluacji wiązania związków do białka. Jednakże, w tym teście jako rozpuszczalnika użyto D<sub>2</sub>O/0.9M mocznika – dlaczego użycie czynnika denaturującego zwiększa czułość tej metody? Ostatecznie potwierdzono wiązanie pięciu fragmentów do KIND1, z których F1 uznano za najbardziej obiecujący. Warto zauważyć, że związek F1 pasuje do farmakoforu określonego w poprzednich rozdziałach, co może sugerować jego sposób wiązania do białka. Ze względu na brak struktury krystalicznej

kompleksu F1/KIND1, warto byłoby wymodelować strukturę kompleksu tego liganda z KIND1.

Podsumowując, stwierdzam, że dzięki zastosowaniu szerokiego wachlarza technik komputerowych i eksperymentalnych recenzowana rozprawa doktorska zawiera znaczącą liczbę wartościowych wyników. Co ważne, stanowią one duży postęp w poszukiwaniach nowy terapii przeciwnowotworowych powiązanych z kontrolowaniem cytoszkieletu aktywnego. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr. inż. Radosława Kitel spełnia ustawowe i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr. inż. Radosława Kitel do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

*Juhon Berticchi*