

WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD INŻYNIERII BIAŁKA

ul. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław | Poland

tel. +48 71 375 28 89

www.biotech.uni.wroc.pl

Prof. Jacek Otlewski

Wrocław, 28 maja 2019 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr. inż. Radosława Dariusza Kitla zatytułowanej „Biophysical characterization of molecular mechanism of action nucleation by Spire and its binding partner Formin and discovery of small-molecule chemical probes impairing the Spire-FMN2 interaction”

Cytoskielet aktynowy jest kluczowo ważną strukturą, która zapewnia komórkom kształt i zdolność poruszania się. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu polimerów aktynowych prowadzą do poważnych schorzeń, w tym chorób nowotworowych. Jednym ze słabiej poznanych aspektów funkcjonowania aktyny jest mechanizm tworzenia zarodków polimeryzacji.

Rozprawa doktorska mgr inż. Radosława Kitla dotyczy właśnie białek regulujących powstawanie tych zarodków: białek Spire i forminy FMN2. Praca realizowana była w grupie Profesora Holaka, który posiada dorobek w postaci dwóch publikacji w PNAS (USA) dotyczących badań strukturalnych białka Spire, zrealizowanych we współpracy z zespołem Profesora Roberta Hubera.

Oceniana praca doktorska to napisany po angielsku maszynopis liczący 121 stron, podzielony na rozdziały *Summary*, *Streszczenie*, *Introduction*, *Aims of the work*, *Results*, *Discussion*, *Materials and Methods*, *Abbreviations*, *References*. Praca zawiera także rozdział *Supplementary Materials*, w którym znajduje się tabela określająca procentowy udział doktoranta w wykonaniu kolejnych doświadczeń rozprawy doktorskiej, co oceniam bardzo pozytywnie. Do pracy dołączono również płytę CD z czterema filmami pokazującymi powstawanie filamentów aktynowych zarejestrowanych za pomocą mikroskopii TIRF.

Rozdział *Introduction* liczy 20 stron i jest napisany w zwarty i treściwy sposób, dostarczając dużej ilości informacji na temat tworzenia cytoskieletu aktynowego, ze szczególnym uwzględnieniem inicjacji tego procesu i rolą białek Arp2/3, Spire, forminy w metastazie. Autor zestawia także informacje na temat niskocząsteczkowych związków interferujących z procesem polimeryzacji

aktyny. Ta część doktoratu napisana jest kompetentnie i zilustrowana rysunkami opracowanymi przez doktoranta.

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej można podzielić na dwie części. Pierwsza grupa dotyczy badań z wykorzystaniem technik mikroskopowych na poziomie pojedynczych cząsteczek i jest próbą określenia roli domen WH2 białka Spire w procesie nukleacji aktyny. Stosując techniki mikroskopii fluorescencyjnej na poziomie pojedynczych cząsteczek, autor pokazał, że sama obecność domen wiążących aktynę białka Spire nie jest wystarczająca do utworzenia stabilnego zarodka polimeryzacji aktyny. Jest to istotny i oryginalny wynik, który przeczy danym literatury, mówiącym, że białko Spire inicjuje proces polimeryzacji. Na podstawie uzyskanych wyników doktorant zaproponował własny model kooperacji między białkiem Spire a forminami w procesie nukleacji polimerów aktyny na powierzchni błony pęcherzyków. Opisywane wyniki były uzyskane w czasie półrocznego stażu na Uniwersytecie Ludwiga Maximiliana w laboratorium Profesora Lamba, które wyposażone jest w doskonałą aparaturę, umożliwiającą wykonanie doświadczeń metodami mikroskopii fluorescencyjnej.

Druga grupa wyników dotyczy poszukiwania związków, które zdolne są do oddziaływania z białkiem Spire i do blokowania tworzenia kompleksu z forminą FMN2. Ta część pracy została wykonana w macierzystym laboratorium kierowanym przez Profesora Holaka, który jest ekspertem w poszukiwaniu antagonistów oddziaływań białko-białko. Doktorant zastosowała w tym celu zarówno techniki obliczeniowe w postaci wirtualnego przeszukiwania biblioteki 22 mln związków, jak i kilka technik eksperymentalnych (głównie tzw. *thermal shift assay*, ale także NMR) w celu identyfikacji związków zdolnych do oddziaływania z białkiem Spire. Doktorant wyselekcjonował związek RK-4, który wiązał się słabo do domeny hKIND1 oraz związek A07, który oddziaływał z hKIND2. Oba związki oddziaływały słabo z białkami docelowymi. Mimo że doktorant nie zidentyfikował silnych antagonistów wymienionego oddziaływania, wykonał on istotny krok w tym kierunku, co należy odnotować jako sukces.

Moje uwagi do ocenianej rozprawy są natury redakcyjnej. Streszczenie w języku polskim zawiera liczne błędy literowe i żargon laboratoryjny. Podobnego typu błędy występują także w całym doktoracie. Język angielski rozprawy jest poprawny, ale nie określiłbym go jako dobry.

Chciałbym zaznaczyć, że doktorant w trakcie realizacji pracy zastosował liczne, odmienne techniki, w tym: produkcję białek w systemie bakteryjnym, biochemiczną charakterystykę białek, technikę *thermal shift assay*, techniki obliczeniowe i NMR, zaawansowane metody mikroskopii fluorescencyjnej oraz krystalizację białek. Na tym etapie rozwoju naukowego wykazał się więc należyłą wszechstronnością.

Podsumowując, stwierdzam, że moja ocena rozprawy doktorskiej mgr. Radosława Kitla zatytułowanej „Biophysical characterization of molecular mechanism of action nucleation by Spire and its binding partner Formin and discovery of small-molecule chemical probes impairing the Spire-FMN2 interaction” jest pozytywna, a opracowanie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim i ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Kitla do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

