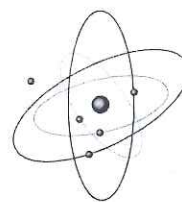




AGH

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
IM. STANISŁAWA STASZICA
W KRAKOWIE



Prof. dr hab. Květoslava Burda

Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
30-059 Kraków, ul. Reymonta 19

Kraków, 31.08.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr. Michała Świątka

Pan mgr Michał Świątek przygotował pracę doktorską zatytułowaną „*Computational modelling of neck linker's polymeric properties with comparison to mutated protein sequences in the context of kinesin's overall dynamical properties*” w Zakładzie Fizyki Statystycznej na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem dr. hab. Pawła F. Góry, prof. UJ. Badania rozpoczynał przy współpracy z prof. dr hab. Ewą Gudowską-Nowak.

Pan M. Świątek podjął się badania *in silico* własności elastycznych peptydu składającego się z sekwencji 19 aminokwasów, które występują powszechnie w łączniku pomiędzy głową a szyją kinezyń typu 2, który w języku angielskim określa się terminem „neck linker”. W szczególności w swoich modelach wykorzystał dostępne dane strukturalne białka KIF3B i zastosował dynamikę molekularną do zbadania wpływu własności łącznika kinezyń na funkcjonalność tego białka. Oprócz badań własności mechanicznych i dynamicznych *łącznika* przeprowadził badania porównawcze tych własności dla peptydów powstałych przez zastąpienie aminokwasów alaniną. W pierwszym z nich wszystkie aminokwasy zostały zastąpione przez alaninę. Tak otrzymany łańcuch peptydowy składał się więc z dziewiętnastu alanin i został oznaczony w pracy jako *Ala-only*. W drugim zastąpiono wszystkie asparaginy występujące w łączniku alaniną. Otrzymany łańcuch peptydowy oznaczono jako *no-Asparagine*. W trzecim zastąpiono wszystkie lizyny alaniną. Otrzymany łańcuch peptydowy oznaczono jako *no-Lysine*. W czwartym zastąpiono wszystkie proliny alaniną. Otrzymany łańcuch peptydowy oznaczono jako *no-Proline*. Badania łańcuchów przeprowadzono głównie za pomocą dynamiki molekularnej przy użyciu oprogramowania GROMACS oraz metod fizyki statystycznej i fizyki polimerów. Główny nacisk położono na analizę statystyk łańcuchów poddanych naciąganiu przez zewnętrzną siłę przyłożoną do końców łańcucha. Oprócz standardowych statystyk, wyznaczono również zmiany energii swobodnej łańcuchów pod wpływem naciągania. Do tego celu wykorzystano metodę opartą na twierdzeniu fluktuacyjnym Crooks'a.

Podjęta tematyka w niniejszej rozprawie doktorskiej jest bardzo ważna, gdyż wpisuje się w szerszy kontekst poznawania działania bio-nanomaszyn, a konkretniej tzw. silników molekularnych. Są to, najczęściej, kompleksy białkowe aktywowane ATPazą lub GTPazą. W wyniku hydrolizy cząsteczek wysokoenergetycznych ATP/GTP uwalniana jest energia, która stymuluje ruch np. organelli czy białek w całej objętości komórek. Układy te odgrywają kluczową rolę między innymi w ukierunkowanym transporcie wewnątrz-komórkowym wzdłuż struktur cytoszkieletowych, podziale komórek, transporcie jąder, skurczu mięśni czy transdukcji mechaniczno-chemicznej. Wyróżnia się trzy rodziny tego typu silników molekularnych: kinezy, dyneiny i miozyny. Kinezy, które znalazły się w kręgu zainteresowań Doktoranta odpowiedzialne są za transport molekuł często znacznie przekraczających ich masę i wielkość. Transport odbywa się wzdłuż spolaryzowanych mikrotubuli. Polaryzacja mikrotubuli decyduje o tym, że kinezy prowadzą aktywny transport molekuł do wnętrza komórki. Niektóre mechanizmy związane są z procesami mitozy i mejozy. U ludzi odkryto obecnie 45 różnych kinezyn. Różnorodność ta wynika z ich szczególnych funkcji. Kinezy różnią się między sobą budową, ale w obrębie jednostki motorycznej wspomnianego *łącznika* występuje duża analogia pomiędzy nimi. Poznanie własności mechanicznych i dynamicznych jednostki motorycznej kinezy, a więc także *łącznika*, który odgrywa istotną rolę przy przemieszczaniu się dwóch główek kinezy poruszających się wzdłuż mikrotubuli jest bardzo ważne. Przede wszystkim będzie można zrozumieć, selekcję poszczególnych *łączników* w wyniku ewolucji do „zadań specjalnych”, w których uczestniczą kinezy, a co za tym idzie budować własne maszyny molekularne, które będą mogły być sterowane określonymi bodźcami transportu ukierunkowanego wybranych molekuł w obrębie komórek. W ten sposób będzie można modyfikować odpowiedzi komórek – wzmacniać lub osłabiać ich odporność i aktywność. Osłabianie może znaleźć zastosowanie np. w zwalczaniu komórek nowotworowych lub w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Do tej pory udało się poznać wpływ hydrolizy ATP na przyłączenie się główek kinezyn do mikrotubul, ale sam mechanizm ich przemieszczania się nie został jeszcze wyjaśniony. Dlatego pytanie, jak własności mechaniczne i termodynamiczne *łączników* mogą wpływać na szybkość transportu w zadanych warunkach i w obecności określonego dostępu do ATP, pozostaje wciąż aktualne.

Rozprawa doktorska p. Michała Świątko została napisana w języku angielskim. Liczy 70 stron. Poza stroną tytułową, podziękowaniami, streszczeniem w języku angielskim i polskim, oświadczeniem o opublikowaniu części prezentowanych w rozprawie wyników i spisem treści, praca zawiera pięć rozdziałów, a na jej końcu umieszczony jest spis literatury obejmujący 109 pozycji. Na siedem podrozdziałów rozdziału 1, będącego wstępem, składają się: omówienie celów pracy, wprowadzenie do białek motorycznych, opis funkcji kinezyn w transporcie wewnątrzkomórkowym neuronów, opis modeli teoretycznych ukierunkowanego ruchu kinezyn wzdłuż mikrotubuli, budowa kinezyn, dane dotyczące sekwencji aminokwasów w obrębie *łącznika*, wprowadzenie do mechanicznego opisu łańcuchów biopolimerów oraz koncepcja badania zmiany energii swobodnej wynikającej ze zmian konformacyjnych peptydu podczas rozciągania. W rozdziale drugim, zatytułowanym „*Dynamical properties of kinesin structure*” Doktorant podzielił materiał na dwie części. Pierwsza stanowi wstęp teoretyczny do analizy drgań normalnych i analizy domenowej wykorzystanej do wyodrębnienia sztywnych struktur w obrębie białka, a druga zawiera uzyskane wyniki za pomocą analizy domenowej i ich dyskusję. Trzeci rozdział „*Neck linker stretching*” podzielony jest na trzy podrozdziały, w których omówione zostały metody, protokoły symulacji i wyniki. Główną metodą badawczą użytą do badań zachowania się *łącznika* pod wpływem siły rozciągającej była metoda dynamiki molekularnej. Autor przypomina podstawy tej metody oraz podaje szczegóły dotyczące

potencjałów użytych do opisu oddziaływań w obrębie łącznika oraz przybliżeń użytych do opisu oddziaływań z otoczeniem. W podrozdziale przypomniano również narzędzia dotyczące analizy statystycznej rozkładu położeń łańcucha, używanej później do śledzenia trajektorii łącznika oraz innych metod numerycznych i protokołów wykorzystanych w dalszej części pracy. Drugi podrozdział zawiera opis łańcuchów peptydowych poddanych badaniom *in silico*. W trzecim przedstawiono porównawcze wyniki eksperymentów numerycznych przeprowadzonych dla łącznika występującego w kinezyne, oraz wspomnianych zmodyfikowanych peptydów: *Ala-only*, *no-Asparagine*, *no-Lysine* oraz *no-Proline*. Najpierw przedstawiono wyniki analizy statystycznej rozkładu odległości pomiędzy końcami łańcucha peptydowego w stanie równowagi z otoczeniem. Wyniki te były punktem wyjścia do przeprowadzonej następnie analizy uśrednionych odległości pomiędzy elementami łańcucha peptydowego pod wpływem różnych sił rozciągających, przyłożonych do jego końców. Rozdział czwarty pt. „*Free energy difference estimation on the basis of Jarzynski equality and Crooks fluctuation theorem*” poświęcony jest analizie zmiany energii swobodnej łańcucha peptydowego pod wpływem rozciągania. Najpierw zostały przypomniane podstawy teoretyczne, a w szczególności relacja Jarzynskiego, która wyraża zmianę energii swobodnej pomiędzy stanami, poprzez średnią statystyczną z eksponenty z pracy wykonanej przy przejściu pomiędzy tymi stanami. Równanie Jarzynskiego jest trudne do zastosowania wprost do wyliczania zmian energii swobodnej. Na jego podstawie powstały jednak metody praktyczne, które wykorzystują pewne uproszczenia pojawiające się w równaniach, gdy bada się jednocześnie pracę wykonaną przy przejściu pomiędzy pierwszym a drugi stanem, jak i pracę w procesie odwrotnym, to znaczy pomiędzy drugim a pierwszym stanem. Metody oparte są na twierdzeniu fluktuacyjnym Crooks’a. Dwie metody używane w literaturze przedmiotu wynikające z tego twierdzenia nazywane są metodą Crooks’a i metodą Bennett’a. Obie zostały wspomniane w pracy doktorskiej. W odniesieniu do badań łańcuchów peptydowych, zastosowanie tych metod sprowadza się do wyznaczenia rozkładu nakładu pracy potrzebnego do naciągnięcia łańcucha ze stanu równowagi i pracy wykonanej przez łańcuch przy powrocie ze stanu naciągniętego do stanu równowagi. Ostatni rozdział podsumowuje uzyskane wyniki, przypomina najważniejsze wnioski dyskutowane w poprzednich rozdziałach i wskazuje potencjalne kierunki mogące stanowić kontynuację badań.

W pracy zostały scharakteryzowane mechaniczne i termodynamiczne własności natywnego łącznika kinezyiny typu 2 i wskazane jego szczególne własności w porównaniu do innych łańcuchów o zmienionym składzie aminokwasów. Jako ekstremalnym przykładem, w swojej analizie, Doktorant posłużył się peptydem składającym się wyłącznie z najprostszego (najmniejszego i hydrofobowego) aminokwasu – alaniny. Ten układ wykazywał największą odległość między końcami w stanie równowagi i najsilniejsze zmiany średniego odchylenia kwadratowego i promienia żyracyjnego pod wpływem przykładanych sił rozciągających w porównaniu do wszystkich badanych układów. Dla czasu początkowego promień żyracyjny jest mniejszy dla tej próbki, a najmniejszy dla *no-Lysine*, co wynikało z rozciągłości badanych łańcuchów peptydowych wyznaczonych dla stanu równowagi. Jednak zmiany w czasie promienia żyracyjnego są najmniejsze w przypadku *no-Lysine*, gdy stosowane są siły ≥ 1160 pN, ale większe dla dwóch mniejszych sił niż obserwowano to dla pozostałych peptydów, wyłączając *Ala-only* przypadek. Porównanie zmian odległości, w trakcie naciągania, pomiędzy czwartym aminokwasem a kolejnymi bardziej odległymi aminokwasami w łańcuchu peptydowym dla *Ala-only* i natywnego łącznika, wykazało, że są one znacznie bardziej zróżnicowane nawet dla najbliższych sąsiadów w tym drugim przypadku, ale jak można było się spodziewać w przypadku *Ala-only* peptydu dla trzech najbardziej odległych aminokwasów

odległości te są znacznie większe i narastają już dla znacznie krótszych czasów naciągania. Zmiany energii potencjalnej w czasie dla *Ala-only* były nieznaczne dla dwóch najmniejszych przyłożonych sił, natomiast wraz z rosnącą siłą i czasem energia potencjalna malała, podobnie jak w pozostałych układach. Jednak zawsze pozostawała znacząco wyższa niż w innych przypadkach. Choć zmienność oscylacyjna energii potencjalnej w czasie występuje we wszystkich zmodyfikowanych przez podstawienie alaniny *łącznikach*, to są one odmienne od przypadku natywnego *łącznika*, dla którego energia potencjalna wykazuje zawsze najmniejsze wartości w porównaniu do pozostałych układów dla danej stosowanej siły rozciągającej. Potencjał Lenarda-Jones'a w czasie wykazuje oscylacyjne zmiany dla wszystkich badanych łańcuchów peptydowych, ale są one różne dla różnych próbek. Największe wartości potencjału ten wykazuje dla łańcucha natywnego *łącznika*, a najmniejsze dla *Ala-only*. Analiza zmiany liczby wiązań wodorowych w czasie pod wpływem określonej siły dla tak krótkich łańcuchów peptydów jest ograniczona, jak zauważa Doktorant. Jednak na pewno mógł stwierdzić znacząco wyższą ilość wiązań wodorowych zrywanych dla krótkich czasów trwania siły dla peptydu *no-Lysine*, a dla długich czasów w przypadku peptydu *no-Proline* w porównaniu do pozostałych próbek. Dodatkowo, badając liczbę wiązań w pobliżu Ca przy 10-tym aminokwasie mógł stwierdzić, że w przypadku peptydu *no-Lysine* jego końce są bardziej zwinięte. Ma to swoje odzwierciedlenie także w zmniejszonych fluktuacjach granicznych atomów tego łańcucha nawet pod działaniem najwyższej przyłożonej siły, podczas gdy w pozostałych przypadkach są one znaczące w porównaniu do wielkości fluktuacji wewnętrznych atomów. Tego jednak nie dyskutuje Doktorant w swojej pracy. Opierając się na wynikach dotyczących zmian energii swobodnej pod wpływem naciągania, otrzymanych na podstawie metody Crooks'a Doktorant mógł stwierdzić, że peptyd *no-Lysine* jest najbardziej sztywną strukturą spośród wszystkich badanych łańcuchów. Współczynnik krzywej parabolicznej opisującej tę zmienność jest ok. 4.5 raza większy od uzyskanego dla natywnego *łącznika* (kolejnego najbardziej sztywnego spośród badanych układu, do którego zbliżone parametry wykazywała próbka *no-Asparagine*), a w porównaniu do peptydu *Ala-only* prawie 10-krotnie większy. Na podstawie tych danych Doktorant zauważa, że choć z jednej strony łańcuch peptydowy *no-Lysine*, jako najbardziej sztywna „sprężyna” wśród sztucznie zmodyfikowanych łańcuchów peptydowych mogłaby wydawać się lepszym „łącznikiem”, to musi istnieć powód, dla którego w rzeczywistych układach lizyna jest obecna. Należy dodać, że jest to najliczniej występujący aminokwas w strukturze natywnej i jedyny spośród podstawianych aminokwasów znajdujący się także w pobliżu końca C natywnego *łącznika*.

Praca stanowi logiczną całość i do samego jej układu nie mam zastrzeżeń. Natomiast sposób przedstawienia danych wymagałby poprawy. Pomijając małą czcionkę, którą Doktorant użył przy pisaniu, to skale na rysunkach 33.6 – 3.3.14 są praktycznie nieczytelne, a dodatkowo bardzo cienkie linie na rysunkach 3.3.12 i 3.3.13 utrudniają odczyt przebiegu krzywych. Choć rysunki opatrzone są w legendy, niekiedy dość obszerne, to zamiast pisać lewy, prawy panel, u dołu, u góry, lepiej byłoby u góry paneli uzupełnić rysunek o dodatkowy podpis. Dla łatwiejszego zobaczenia ewentualnych różnic pomiędzy poszczególnymi danymi skale powinny być lepiej dobrane. Na przykład na rys. 3.3.8 i 3.3.9 skala powinna być rozciągnięta do wartości 0.7, a więc dwukrotnie. Skale na rysunkach 3.3.6 i 3.3.7 powinny być ujednolicone, aby uwidocznienie różnic wartości energii, a tylko w przypadku nachodzących na siebie krzywych wstawić wykresy w rozszerzonej skali. Na rysunku 3.3.14 wskazane byłoby dodanie u góry każdego wykresu dodatkowej osi odciętych, która przedstawiałaby kolejne numery aminokwasów w peptydach. To pozwoliłoby na ustalenie środka łańcucha i pełniejsze porównanie danych dla poszczególnych próbek, co przy numeracji atomów jest niemożliwe ze

względu na różnice w budowie aminokwasów. Rysunek 1.5.1 w wersji drukowanej w kolumnach zaznaczonych na niebiesko jest nieczytelny. W tekście pojawiły się nieliczne drobne błędy językowe. W Tabeli 1.1 arginina błędnie ma przypisane oznaczenie A, powinno być R. Wspomniane niedociągnięcia redakcyjne utrudniały czytanie pracy i weryfikację podawanych danych. Dobrze byłoby w pracy zamieścić spis użytych skrótów i symboli. Pozwoliłoby to uniknąć pewnych niekonsekwencji, które dotyczą oznaczeń. Na przykład symbol gradientu w równaniu (3.2) jest inaczej oznaczany niż gradient w równaniu (3.16). Wielkości wektorowe oznaczane są czasami ze strzałką, jak np. w równaniu (3.16) i (3.18), a czasami bez jak na przykład w równaniach (3.9), (3.24). Podobna uwaga dotyczy symbolu wektora r_i we wzorze (3.17), który oznacza względny wektor położenia sąsiednich elementów (mas) łańcucha, a dokładnie ten sam symbol w równaniu (3.20) oznacza odległość elementu (masy) od środka ciężkości łańcucha. Tego typu niekonsekwencji jest znacznie więcej. Wygląda to tak, jakby Autor czerpał z różnych źródeł i nie ustalił wspólnej notacji w swojej pracy doktorskiej, która powinna być spójna.

Pomimo tych niedociągnięć oceniam pracę pozytywnie. Mam jednak kilka uwag i pytań. Prosiłabym Doktoranta o ustosunkowanie się do nich:

- 1) Jak przyjęty model *Simple Point Charge* wpływa na uzyskane wyniki?
- 2) Dla jakiego pH była prowadzona symulacja w przypadku Pana badań? Jak uwzględnia się zmiany pH otoczenia?
- 3) Dlaczego badane były „mutacje łącznika” dla tak szerokiego zakresu zmian wielu aminokwasów na raz? Jaka była podstawa do wybrania tych konkretnych mutacji?
- 4) Jakie przewidywalne konsekwencje niesie ze sobą wprowadzenie alaniny w miejsce konkretnych zmienianych aminokwasów? Czy są one zgodne z uzyskanymi wynikami?
- 5) W tabeli 4.1, w trzeciej kolumnie Doktorant podaje, że metoda Crooks’a nie radzi sobie z przypadkiem *Ala-only* i *no-Lysine*, zgodne z tym co również widać na rysunkach 4.2.1 i 4.2.2, gdzie stosowne histogramy nie przekrywają się. Z drugiej strony, w czwartej kolumnie podano wyniki otrzymane za pomocą metody Bennett’a, która dobrze sobie radzi w tych przypadkach. Dlaczego więc na rysunku 4.2.5 użyto wyników z metody Crooks’a, a nie metody Bennett’a? Dlaczego nie omówiono szczegółów zastosowania metody Bennett’a, skoro użyto ją w Tabeli 4.1 i stwierdzono, że jest stabilniejsza?

Pan mgr Michał Świątek wykazał się umiejętnością zastosowania metod fizyki statystycznej i komputerowej do badania układów biologicznych. Praca doktorska ma więc charakter interdyscyplinarny. Uzyskane przez Doktoranta wyniki stanowią ważny przyczynek do lepszego poznania własności mechanicznych i termodynamicznych *łącznika* występującego w kinezynach typu 2. Poglębianie tych badań może pozwolić w przyszłości zrozumieć, jak fragmenty białkowe kinezyiny regulują te własności; np. jaki wpływ mają budowa i struktura *łącznika* na oddziaływania głowy kinezyiny w czasie jej przylegania do mikrotubuli. Kierunki dalszych badań wskazane przez Doktoranta są naturalną konsekwencją uzyskanych przez niego wyników. Mogą być ważne w projektowaniu silników molekularnych o szerokim potencjalnym zastosowaniu w rozwijających się bio-nanotechnologiach, a w szczególności bio-nanomedycynie, jak już wcześniej wspomniałam. Należy tu podkreślić, iż efektywność funkcjonowania kinezyin w układach naturalnych sięga 60%, a więc bionika tych struktur jest bardzo pożądana.

Pan M. Świątek jest autorem czterech publikacji, trzech o zasięgu międzynarodowym. W dwóch spośród nich zawarł część wyników zwartych w niniejszej rozprawie. W jednej z prac jest pierwszym autorem.

Uważam, że przedstawiona praca spełnia kryteria stawiane kandydatom w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym, Dz.U. z 2016 r. poz. 882, i w związku z tym wnioskuję o dopuszczenie pana mgr. Michała Świątka do dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab. Květoslava Burda