



Politechnika
Śląska



UCZELNIA
BADAWCZA
inicjatywa doskonałości

Wydział Chemiczny
Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów

Dr hab. inż.
Monika Krasowska
prof. PŚ

Gliwice, 12.08.2024

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Michała Świątka
pt. „Computational modelling of neck linker’s polymeric properties
with comparison to mutated protein sequences
in the context of kinesin’s overall dynamical properties”
wykonanej pod kierunkiem dr. hab. Pawła F. Góry, prof. UJ
na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Tematyka rozprawy mgr. Michała Świątka dotyczy przemian strukturalnych biopolimerów w odpowiedzi na gwałtowne zaburzenia systemów biologicznych w których się znajdują. Będący przedmiotem badań łącznik szyjki (*neck linker*) to fragment kinezy, znajdujący się pomiędzy jej elementami zwanymi szyją i głową. Jest to ważna część tego białka motorycznego, która napędza transport aksonalny. Przeszczanie się kinezy wzdłuż mikrotubuli jest ściśle powiązane ze zmianą stanów konformacyjnych tego właśnie łącznika, którego własności odgrywają bardzo ważną rolę w przenoszeniu energii i informacji w motorze kinezynowym. Rozciąganie biopolimerów z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych lub pęsety optycznej prowadzi do rozwinięcia ich struktur, co można rozumieć jako zmianę między stanami konformacyjnymi. Różnica energii swobodnej pomiędzy tymi stanami może być uważana za istotną cechę danego biopolimeru. Celem rozprawy doktorskiej mgr. Michała Świątka było przeprowadzenie, z wykorzystaniem Dynamiki Molekularnej, symulacji eksperymentu rozciągania struktury łącznika szyjki kinezy, który ma odwzorowywać przekakiwanie pomiędzy stanami konformacyjnymi podczas krokowego ruchu kinezy, a następnie przeprowadzenie analogicznych eksperymentów dla kilku „zmutowanych” łańcuchów białek, i zbadanie, jaki wpływ na właściwości dynamiczne łącznika szyjki kinezy mogą mieć mutacje punktowe w jego strukturze. W celu sprawdzenia, które wielkości można powiązać z wybranymi podstawieniami aminokwasów w łączniku Doktorant oszacował różnicę energii swobodnej podczas zmiany stanów konformacyjnych z wykorzystaniem równania Jarzyńskiego. Zatem zakres badań prowadzonych w ramach tej pracy doktorskiej mieści się w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki fizyczne.

Politechnika Śląska
Wydział Chemiczny
Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów
ul. Strzody 9, pok. 202a, 44-100 Gliwice
+48 32 237 1427
monika.krasowska@polsl.pl



Praca doktorska mgr. Michała Świątka ma przede wszystkim charakter poznawczy, a wynikające z niej wnioski mogą znaleźć zastosowanie zarówno w dalszych badaniach teoretycznych, których kierunki proponuje w podsumowaniu Doktorant jak i stanowić inspirację do podjęcia badań eksperymentalnych.

Rozprawa, która została napisana w języku angielskim, składa się z pięciu rozdziałów poprzedzonych streszczeniami w języku angielskim i polskim oraz podaną na końcu bibliografią zawierającą 109 pozycji literaturowych, głównie artykułów naukowych.

Rozdział pierwszy rozprawy doktorskiej mgr. Michała Świątka to wprowadzenie do tematyki pracy w konwencji od ogółu do szczegółu czyli od opisania odkrycia białek motorycznych poprzez omówienie budowy, roli i modeli kinezyiny (wraz z omówieniem parametrów struktury tego białka zdeponowanej w banku PDB – *Protein Data Bank*) do opisu samego łącznika szyjki kinezyiny. Jako ostatnie zagadnienia krótko przedstawione zostały metody eksperymentalne badania właściwości elastycznych biopolimerów oraz wyznaczania różnicy energii swobodnej między stanami konformacyjnymi białka.

Rozdział drugi dotyczy dynamicznych właściwości struktury kinezyiny. Na podstawie wyników analizy drgań normalnych i analizy domenowej dla struktury łańcucha kinezyiny 3kin (która to struktura została uzyskana z banku PDB) zostały wyznaczone domeny o różnej sztywności. Opierając się na danych literaturowych oraz wynikach badań wstępnych, próg energii deformacji, który odróżnia region sztywny od elastycznego, został ustalony na 400 kJ/mol. Otrzymane przez Doktoranta w czasie analiz wartości energii deformacji dla łącznika szyjki pokazały, że jest to łańcuch aminokwasów, który w niektórych konfiguracjach może mieć dużo bardziej elastyczną strukturę w stosunku do innych struktur funkcjonalnych kinezyiny i dzięki temu wykazywać płynne ruchy, co wpływa na przemieszczanie się całego białka.

W rozdziale trzecim zapoznajemy się z pojęciami i metodami Dynamiki Molekularnej użytymi w protokole zastosowanym do przeprowadzenia symulacji rozciągania pięciu obiektów badań: struktury oryginalnego łącznika szyjki kinezyiny, struktury utworzonej z sekwencji polialaniny (oznaczonej w pracy jako *Ala-only*) oraz trzech „zmutowanych” łańcuchów białek. Oryginalna sekwencja aminokwasów łącznika szyjki została poddana modyfikacjom punktowym polegającym na zastąpieniu trzech typów aminokwasów

(asparaginy, lizyny i proliny) alaniną, żeby wyeliminować wpływ ich łańcuchów bocznych na strukturę natywną łącznika szyjki. W pracy starano się symulować zmiany w czasie w obrębie zamkniętego układu, gdzie wszystkie znaczące cząsteczki są reprezentowane w określony sposób, a właściwości termodynamiczne są utrzymywane na poziomach zbliżonych do fizjologicznych. W celu oceny właściwości mechanicznych mgr Michał Świątek przygotował nowy protokół symulacji szybkiego rozciągania, zachodzącego z dala od stanu równowagi, wykorzystując stałą siłę, która powoduje zmienną prędkość procesu. Dzięki prowadzonym tak symulacjom z wykorzystaniem oprogramowania GROMACS zostało zebrane kilka ogromnych zbiorów trajektorii punktów odpowiadających wszystkim elementom układu w stanie nierównowagowym. Pozwoliło to prześledzić, w trakcie całego procesu rozciągania, dynamiczne zmiany takich wielkości jak: energia potencjalna, potencjał Lennarda-Jonesa, promienia bezwładności itp.

Rozdział czwarty pokazuje możliwości szacowania różnicy energii swobodnej między początkowymi i końcowymi stanami konformacyjnymi rozciąganych peptydów na podstawie równania Jarzyńskiego i twierdzenia fluktuacyjnego Crooksa oraz innych estymatorów różnicy energii swobodnej np. estymatora Bennetta. Bardzo interesujące wyniki stanowią uzyskane profile różnicy energii swobodnej rozciągania. Wartości różnicy energii swobodnej eksperymentów rozciągania nierównowagowego są ściśle związane z szeregiem określonych i odrębnych substytucji danego typu aminokwasu w sekwencji białka. We wszystkich przypadkach istnieje wyraźna różnica w odpowiedzi „zmutowanych” peptydów na siły rozciągające w porównaniu z oryginalną, niezmodyfikowaną strukturą łącznika szyjki. Można zatem stwierdzić jak substytucja danego typu aminokwasów w sekwencji białka wpływa na profil energetyczny łącznika szyjki kinezy. Zaprezentowane wyniki pokazują wyraźnie znaczenie różnicy energii swobodnej pomiędzy stanami konformacyjnymi dla biologicznej funkcji łącznika szyjki.

Rozdział piąty to bardzo krótkie podsumowanie pracy ze szczególnym podkreśleniem oryginalnych wyników, które nie zostały dotychczas opublikowane. Ponadto Doktorant nakreślił jeden z kierunków dalszych badań, które mogłyby pokazać dalekosiężne skutki mutacji punktowych w sekwencji łącznika szyjki na wydajność mechanizmu ruchu kinezy.

Inspirując się podobieństwem pomiędzy zjawiskiem zmiany odpowiednich stanów konformacyjnych podczas ruchu kinezy, a eksperymentami rozciągania biopolimerów przy

użyciu mikroskopii sił atomowych czy też szczypiec optycznych mgr Michał Świątek przeprowadził symulacje Dynamiki Molekularnej pozwalające na wgląd i ocenę konsekwencji lokalnych modyfikacji struktury białka na jego elastyczność w odpowiedzi na zewnętrzne naprężenia mechaniczne. Najciekawszym i wartym podkreślenia rezultatem tej pracy jest pokazanie zależności pomiędzy obecnością mutacji punktowych w sekwencji łącznika szyjki kinezyiny a różnicą energii swobodnej konieczną do przekakiwania pomiędzy stanami konformacyjnymi.

Podczas lektury przedstawionej do recenzji pracy nasunęły mi się pytania do Autora, które wymienione są poniżej:

- Co było podstawą wyboru przez Doktoranta takich właśnie struktur „zmutowanych”?
- Jak bardzo „niedoskonałości” struktur białek zdeponowanych w bazie PDB (które zostały omówione w rozdziałach 1.4 i 2.2) wpływają na wyniki końcowe symulacji eksperymentów rozciągania, a w szczególności przedstawionych w tej pracy wyników? Czy istnieje jakaś inna możliwość pozwalająca na pozyskanie bardziej dokładnej struktury kinezyiny?
- Jakie praktyczne zastosowanie mogą znaleźć uzyskane w pracy wyniki?

Autor rozprawy nie ustrzegł się pewnych błędów edycyjnych np. w tabeli 1.1.: jednoliterowy symbol używany dla argininy to R (a nie A jak podano w tabeli); w bibliografii poz. 30 mamy inicjały pierwszego i drugiego imienia autora oraz nazwisko wielkimi literami (I.R. GIBBONS), a w kolejnej pozycji ten sam autor ma podane pełne pierwsze imię, inicjał drugiego i zwyczajowo podane nazwisko (Ian R. Gibbons). Warto byłoby ujednolicić sposób podawania danych bibliograficznych. Praca doktorska mogłaby zostać uzupełniona o spis stosowanych skrótów i symboli, co byłoby pomocne dla jej czytelników oraz może pozwoliło uniknąć stosowania w różnych miejscach takiego samego skrótu do różnych pojęć tj. na str. 29 skrót RMSD to Root Mean Square Deviation, natomiast na str. 33 to Root Mean Square Displacement. Jakość wykresów przedstawionych na większości rysunków (ich wielkość, zastosowane kolory i czcionki) są zdecydowanie słabym elementem tej rozprawy i nie stanowią dobrego uzupełnienia do opisu słownego uzyskanych wyników. Na rysunkach 3.3.1 i 3.3.2 można było zastosować jednakowy zakres wartości dla $P(dx)$ oraz pominąć dodanie krzywej Gaussa w przypadku niegaussowskich rozkładów. Wzmiankowane wyżej uwagi co do

formy prezentacji wyników w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej uzyskanych rezultatów i wniosków.

Niewielka część wyników pracy doktorskiej została opublikowana w dwóch pracach. Pierwsza z nich: B. Lisowski, M. Świątek, M. Żabicki, E. Gudowska-Nowak *Understanding operating principles and processivity of molecular motors*, Acta Phys. Pol. B, 43(5):1073 opublikowana była w roku 2012. Natomiast druga (M. Świątek, E. Gudowska-Nowak *Delineating elastic properties of kinesin linker and their sensitivity to point mutations*, Scientific Reports, 10(1):4832, 2020), w której mgr Michał Świątek jest pierwszym oraz korespondencyjnym autorem, opublikowana została 4 lata temu. Nie rozumiem zatem dlaczego Doktorant posiadając już doświadczenie w przygotowaniu publikacji naukowych nie włożył wysiłku, aby opublikować również pozostałe wyniki swoich badań.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie kryteria zwyczajowe i formalne stawiane rozprawom doktorskim. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie ciekawego i ważnego problemu naukowego wnosząc istotny wkład w badania dynamiki białek motorycznych. Mgr Michał Świątek pokazał, że posiada szeroką wiedzę z zakresu nauk fizycznych i pokrewnych, umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz krytycznego podejścia do uzyskanych wyników. Biorąc pod uwagę poziom merytoryczny pracy, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska „Computational modelling of neck linker’s polymeric properties with comparison to mutated protein sequences in the context of kinesin’s overall dynamical properties” spełnia kryteria stawiane kandydatom i określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r., poz. 85 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne o dopuszczenie mgr. Michała Świątka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Krawczyk