

Prof. dr hab. Cezary Czaplewski
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk 12.10.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Olewniczaka
pt. „Mechanizm allosterycznej aktywacji białek Hsp70.”

Praca doktorska mgr inż. Michała Olewniczaka poświęcona jest badaniom teoretycznym nad mechanizmem allosterycznej aktywacji bakteryjnego białka DnaK należącego do rodziny białek szoku cieplnego Hsp70. Białka szoku cieplnego, nazywane też białkami opiekuńczymi pełnią bardzo ważną rolę w komórkach pomagając w prawidłowym zwijaniu nowo powstałych łańcuchów polipeptydowych i zapobiegając ich agregacji. Białka opiekuńcze uczestniczą też w naprawie nieprawidłowo zwiniętych białek. W rezultacie białka szoku cieplnego odpowiadają za utrzymanie homeostazy komórkowej i ochronę organizmu przed skutkami stresu. Ich produkcja gwałtownie rośnie w odpowiedzi na czynniki uszkodzające, takie jak wysoka temperatura, promieniowanie UV, toksyny, infekcje czy niedotlenienie. Nieprawidłowe działanie białek szoku termicznego lub ich nadmiar powiązany jest z chorobami neurodegeneracyjnymi, stanami zapalnymi oraz nowotworami. Białka Hsp70 (ang. Heat Shock Proteins o masie cząsteczkowej około 70 kDa) stanowią największą i stosunkowo najlepiej poznaną rodzinę białek szoku cieplnego. Mimo rozległych badań, zarówno teoretycznych jak i eksperymentalnych, szczegóły allosterycznego mechanizmu aktywacji Hsp70 na poziomie molekularnym pozostają niewyjaśnione. Poruszana w rozprawie problematyka należy do bardzo istotnych zagadnień chemii i biologii molekularnej. Badania przedstawione w pracy doktorskiej mają charakter badań podstawowych, jednak poznanie mechanizmu aktywacji białek Hsp70 ma znaczenie aplikacyjne. Zrozumienie tego mechanizmu może pozwolić na projektowanie nowych leków, które mogłyby zatrzymać lub cofnąć procesy neurodegeneracyjne. Badania nad aktywacją Hsp70 mogą też pomóc w opracowaniu

skuteczniejszych terapii onkologicznych w związku z nadaktywacją białek Hsp70 w komórkach nowotworowych.

Promotorem recenzowanej rozprawy jest prof. dr hab. inż. Jacek Czub kierownik Katedry Chemii Fizycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Tematyka recenzowanej rozprawy doktorskiej jest jednym z wielu wątków badań dotyczących molekularnych mechanizmów i sił napędowych procesów o istotnym znaczeniu biologicznym jakie są prowadzone w zespole Komputerowej Biofizyki Molekularnej kierowanym przez prof. Jacka Czuba.

Recenzowana rozprawa doktorska ma typowy układ prac doktorskich w dyscyplinie nauki chemiczne. Zawiera ona sześć głównych rozdziałów poprzedzonych spisem stosowanych skrótów i streszczeniem, a zakończonych załącznikiem z dodatkowymi tabelami i rysunkami oraz cytowaną literaturą (205 pozycji). Dodatkowo doktorant zaprezentował swój dorobek naukowy: listę publikacji i prezentacji na konferencjach naukowych.

Pierwszy rozdział zatytułowany *Wprowadzenie* (16 stron) zgodnie z tytułem wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy doktorskiej. W rozdziale tym zdefiniowano termin allosteria i krótko przedstawiono badania nad tym zjawiskiem. W dalszej części opisane są białka szoku cieplnego ze szczególnym uwzględnieniem białek Hsp70 oraz Hsp40, zarówno ich budowa jak i funkcje. Jako główny obiekt badań przedstawiono najlepiej poznany kompleks Hsp70-Hsp40: bakteryjne białka *E. coli* – DnaK i DnaJ oraz proponowany mechanizm aktywacji, w którym wiązanie DnaJ do DnaK stymuluje wiązanie substratu i wysoką aktywność ATP-azową.

Rozdział drugi formułuje cel i zakres pracy. Cel pracy został sformułowany jasno i obejmuje opisanie z rozdzielczością atomową mechanizmu allosterycznej komunikacji wewnątrz białek Hsp70 (DnaK) oraz z ich partnerami wiązania: substratem oraz współopiekuńczym białkiem DnaJ. Cel nadrzędny został podzielony na trzy zadania szczegółowe: opis zmian konformacyjnych DnaK indukowanych hydrolizą ATP, opis zmian konformacyjnych indukowanych związaniem domeny J oraz opis zmian konformacyjnych indukowanych obecnością substratu w domenie SBD białka DnaK.

Trzeci rozdział zatytułowany *Metodyka badań* (26 stron) przedstawia podstawy teoretyczne metod obliczeniowych stosowanych w badaniach prowadzonych w ramach rozprawy. Pewne fragmenty moim zdaniem nie są bezpośrednio związane z pracą, np. przedstawienie równania

Schrödingera tylko po to, żeby zaznaczyć, że w dynamice molekularnej rezygnuje się z rozwiązywania równania Schrödingera i stosuje pole siłowe składające się z wkładów o prostej matematycznie postaci. Przedstawiony opis pola siłowego jest bardzo ogólny, brakuje odniesienia bezpośrednio do wykorzystywanego w pracy pola siłowego CHARMM36m i modelu wody TIP3P. Np. opisano niestosowany w polu CHARMM36m potencjał Morse'a dla wkładu opisującego odchylenia od optymalnych długości wiązań, a brak jest opisu charakterystycznego dla tego pola siłowego wkładu CMAP (Cross-Term Map) bazującego na dwuwymiarowej siatce poprawek energetycznych zależnych od par kątów dwuściennych szkieletu białkowego. Jako przykład sposobów zwiększenia kroku całkowania w dynamice molekularnej podana jest implementacja hydrogen mass repartitioning, jednak w obliczeniach w pracy stosowano algorytm LINCS, który nie jest omówiony w metodyce badań. W opisie metody WHAM brakuje moim zdaniem przedstawienia metody bootstrap stosowanej w pracy do szacowania niepewności obliczeń energii swobodnej. Szczegółowo omówiono metody wzmocnionego próbkowania: umbrella sampling, metadynamikę oraz cykl termodynamiczny dla transformacji alchemicznych. Powinna zostać w tym miejscu omówiona metoda średnich bloków (ang. block average method) stosowana w pracy do oszacowania niepewności pomiaru otrzymanych profili energii swobodnej. Wpływ mutacji oszacowano przy użyciu narzędzia mCSM-PPI2 opartego o uczenie maszynowe i to narzędzie również nie zostało w żaden sposób omówione w rozdziale trzecim.

W czwartym rozdziale *Procedura symulacyjna* (9 stron) opisano protokoły obliczeniowe stosowane w pracy doktorskiej. Są one przedstawione szczegółowo i obejmują zarówno parametry symulacji dynamiki molekularnej, metod analizy trajektorii jak i metody wyznaczania profili energii swobodnej oraz symulacji metadynamiki. Jedyna uwaga do tego rozdziału to brak bardziej szczegółowej informacji o wykorzystaniu komputerów Centrum Informatycznego Trójmiejskiej Akademickiej Sieci Komputerowej (TASK). Czy symulacje prowadzono jedynie z wykorzystaniem CPU czy korzystano również z GPU na co pozwala wykorzystywany program GROMACS? Jak dużo czasu zajmowały prowadzone obliczenia dla poszczególnych symulowanych układów?

Wyniki przedstawione są w rozdziale piątym *Wyniki i dyskusja* na 37 stronach, który podzielony jest na trzy podrozdziały omawiające kolejno badania zmian konformacyjnych DnaK indukowane hydrolizą ATP do ADP, badania zmian konformacyjnych DnaK indukowane

związaniem domeny J oraz indukowane związaniem substratu przez SBD. Ostatni rozdział stanowi zwięzłe podsumowanie przeprowadzonych badań.

Głównym wynikiem symulacji prowadzonych w ramach pracy doktorskiej są wartości energii swobodnej w formie profilów energii swobodnej dla badanych przejść konformacyjnych w różnych układach (hydroliza ATP do ADP, obecność białka J, obecność peptydowego substratu, mutacje punktowe). Warto podkreślić, że analizie poddane są wartości energii swobodnej z uwzględnieniem oszacowania błędów jakimi obarczone są te wielkości. Wyniki symulacji zmian konformacyjnych DnaK indukowanych hydrolizą ATP jednoznacznie wskazują na to, że hydroliza ATP do ADP powoduje zmianę ułożenia płatów domeny wiążącej nukleotyd (NBD) oraz umożliwia większą mobilność łańcuchów bocznych, w szczególności reszt międzydomenowego łącznika. Dla NBD w konformacji otwartej i zamkniętej doktorant określił charakterystyczne kontakty wewnątrz domeny i pokazał, że przy obsadzeniu kieszeni wiążącej przez ATP przejście pomiędzy konformacją otwartą i zamkniętą nie zachodzi spontanicznie. Ponadto, doktorant udowodnił, że dysocjacja domeny wiążącej substrat (SBD β) z powierzchni NBD jest faworyzowana jedynie po hydrolizie ATP. Cenne są wyniki pokazujące wpływ mutacji punktowych w obrębie interfejsu NBD–SBD β w sprzęganiu obsadzenia NBD z powinowactwem między domenami. Podkreśliłbym tu szczególnie pokazanie znaczenia reszty Phe216, której mutacje nie były wcześniej badane eksperymentalnie. Analiza głównych składowych dla połączonych trajektorii DnaK z ATP i z ADP pokazuje korelację między wartościami pierwszej głównej składowej a kątem torsyjnym między płatami NBD. Czy doktorant analizował kolejne główne składowe i czy również można dla nich przypisać prosty parametr geometryczny opisujący ułożenie płatów NBD?

Symulacje zmian konformacyjnych DnaK, które prowadzą do aktywacji białka przez związanie domeny J pokazały, że obecność domeny J powoduje wzajemną rotację płatów NBD i faworyzuje przemieszczenie reszty Thr199 w kierunku terminalnego fosforanu ATP. Tu również mam pytanie o analizę kolejnych głównych składowych dla połączonych trajektorii DnaK oraz DnaK+JD. Pierwsza składowa, która jest skorelowana ze zmianą kąta torsyjnego między płatami NBD odpowiada jedynie za 28% całkowitej zmienności konformacyjnej. Doktorant określił dokładną rolę aminokwasów tworzących silnie zakonserwowany motyw HPD obecny w sekwencji białek J. Analiza wyników symulacji dla mutantów pokazała, że sygnalizacja allosteryczna w

obrębie wariantu kompensatorowego (R167A DnaK+D35N JD) pozostaje niezmienną względem natywnego kompleksu, co wyjaśnia zachowanie przez niego aktywności ATP-azowej w eksperymencie. Na podstawie uzyskanych wyników doktorant zaproponował mechanistyczne wyjaśnienie podłoża aktywacji DnaK przez domenę J, zgodnie z którym przebiega ona według mechanizmu indukowanego dopasowania. Zgodnie z tą hipotezą wiązaniu domeny J do DnaK towarzyszy steryczny nacisk, który odpowiada za rozluźnienie interfejsu NBD–SBD β , co umożliwia rotację płatów NBD. Jednocześnie propagacja sygnału allosterycznego w DnaK powoduje deformację β -nici w obrębie subdomeny IIA, która pozwala na utworzenie kontaktu między istotną katalitycznie resztą Thr199 i częścią ATP.

W dalszych badaniach doktorant scharakteryzował stan stymulowanego DnaK (stan S) przyjmowany w obecności substratu w SBD. Porównanie zmian konformacyjnych względem kompleksu DnaK-JD pokazało spójny obraz aktywacji DnaK pod wpływem czynników allosterycznych. Stan S charakteryzuje się rotacją płatów NBD, trwałymi kontaktami między Thr199 a terminalnym fosforanem ATP, koordynowaniem Thr199 przez grupę hydroksylową Tyr145 oraz naruszeniem struktury drugorzędowej regionu 198–206; 219–227. Pozwala to wyjaśnić synergistyczne działanie domeny J i białkowego substratu w stymulacji hydrolizy ATP.

Przedstawione w rozprawie wyniki jednoznacznie pokazują, że mgr inż. Michał Olewniczak zrealizował wszystkie postawione sobie cele badawcze. Zastosowanie dynamiki molekularnej i metod wzmocnionego próbkowania pozwoliło na uzupełnienie i wyjaśnienie dotychczasowych wyników badań eksperymentalnych nad DnaK. Przedstawione rezultaty analiz mogą być szczególnie interesujące dla dalszych badań nad Hsp70 jako celem terapeutycznym w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych czy nowotworów. Szczegółowa dyskusja osiągniętych wyników, precyzyjne wnioski znamionują osobę przygotowaną do prowadzenia tego typu badań naukowych. Recenzowana praca doktorska przygotowana została na wysokim poziomie merytorycznym, a zawarte w niej wyniki stanowią oryginalny i istotny wkład do nauki. Przedstawione powyżej uwagi mają charakter dyskusyjny i nie obniżają wartości naukowej rozprawy.

Efektom wykonywanej pracy doktorskiej jest publikacja: M. Olewniczak*, M. Pitek*, J. Czub, J. Marszałek, L. Nierzwicki, B. Tomiczek; Mechanism of Hsp70 activation: How J-domain proteins push for ATP hydrolysis. PLoS Comput. Biol. 2026, 22(3), e1014094. Ponadto doktorant

jest współautorem sześciu artykułów niezwiązanych bezpośrednio z tematyką rozprawy doktorskiej, a także czterech komunikatów konferencjach (komunikat na 15th European Biophysics Conference dotyczy tematu rozprawy).

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia formalne wymagania stawiane przez Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, z dnia 20 lipca 2018 r., jak i zwyczajowe warunki stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie mgr inż. Michała Olewniczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Cezary Czaplowski