



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

CeNT CENTRUM
NOWYCH
TECHNOLOGII

27 lipca, 2026

Prof. dr hab. Joanna Trylska
e-mail: joanna@cent.uw.edu.pl

Przewodniczący Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne
dr hab. inż. Marek Tobiszewski, prof. uczelni
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Olewniczaka

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Michała Olewniczaka jest zatytułowana „Mechanizm allosterycznej aktywacji białek Hsp70” (ang. „*Mechanism of allosteric activation of Hsp70s*”). Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. inż. Jacek Czub z Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Rozprawa została przygotowana w dyscyplinie nauki chemiczne.

Tematyka rozprawy dotyczy molekularnego mechanizmu allosterycznej aktywacji białek opiekuńczych z rodziny Hsp70. Białka Hsp70 należą do najliczniejszych i najbardziej zakonserwowanych rodzin białek w komórce. Uczestniczą one w zwijaniu nowo powstających łańcuchów polipeptydowych oraz w ponownym zwijaniu białek. Ich działanie opiera się na cyklu, w którym wiązanie i hydroliza ATP w domenie wiążącej nukleotyd (*nucleotide binding domain*, NBD) reguluje powinowactwo drugiej domeny, wiążącej substrat (*substrate binding domain*, SBD), oraz wzajemne ułożenie obu domen. Cały cykl jest koordynowany przez białka J (Hsp40), które dostarczają substrat i stymulują aktywność ATPazową Hsp70. Mimo licznych badań, mechanizm tej allosterycznej aktywacji na poziomie atomowym pozostawał niejasny. Pan Michał Olewniczak podjął się jego wyjaśnienia, wykorzystując pełnoatomowe symulacje dynamiki molekularnej wspierane metodami wzmocnionego próbkowania przestrzeni konformacyjnej, na przykładzie najlepiej poznanej pary białek bakteryjnych o nazwach DnaK (Hsp70) i DnaJ (Hsp40).

Efektom badań stanowiących trzon rozprawy jest praca opublikowana w czasopiśmie *PLoS Computational Biology* (M. Olewniczak i wsp., „*Mechanism of Hsp70 activation: How J-domain proteins push for ATP hydrolysis*”, 2026, 22(3), e1014094), w której pan Olewniczak jest pierwszym autorem o równym wkładzie z drugim współautorem. Na dorobek naukowy doktoranta składa się ponadto szereg współautorskich publikacji w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach (m.in. *Carbohydrate Polymers* w roku 2020, *Scientific Reports* w roku 2021, *Microbiology Spectrum* w roku 2022, *Journal of Molecular Liquids* w 2023, *Journal of Colloid and Interface Science* w roku 2024 oraz *Journal of Physical Chemistry B* w roku 2025) oraz doniesienia konferencyjne. Tematyka pozostałych prac nie jest ściśle związana z rozprawą doktorską. Dorobek naukowy pana Michała Olewniczaka oceniam jako wartościowy i świadczący o dojrzałości naukowej autora.

Rozprawa mgr inż. Michała Olewniczaka ma klasyczny format monografii, jest napisana w języku polskim i zawiera streszczenie w językach polskim i angielskim. Całość liczy ponad 110 stron. Praca jest podzielona na sześć rozdziałów i uzupełniona o załącznik oraz bibliografię (zawierającą ponad 200 pozycji), a także wykaz dorobku naukowego. Układ pracy jest klarowny i logiczny. Po wprowadzeniu i sformułowaniu celów następuje opis metodyki i procedury symulacji, a następnie autor opisuje wyniki wraz z dyskusją. Na zakończenie wprowadza podsumowanie rozprawy.

W rozdziale pierwszym (Wprowadzenie) autor wprowadza czytelnika w pojęcie allosterii oraz zjawisko odpowiedzi na szok cieplny, a następnie szczegółowo omawia budowę i funkcje białek Hsp70, domenę wiążącą nukleotyd (ATP lub ADP) i domenę wiążącą substrat peptydowy, wraz z ich cyklem katalitycznym. Pan Olewniczak opisuje także budowę i funkcje białek J (Hsp40), w tym mechanizm autoinhibicji białek J klasy B, oraz koncepcję tzw. *entropic pulling*. Rozdział zamyka charakterystyka modelowej pary białek DnaK i DnaJ oraz opis hydrolizy ATP przez DnaK. Wprowadzenie jest napisane rzeczowo i kompetentnie, dobrze się je czyta i dobrze przygotowuje czytelnika do części Wyniki.

W rozdziale drugim (Cele i zakres pracy) autor formułuje nadrzędny cel rozprawy. Celem był opis z rozdzielczością na poziomie pojedynczych atomów mechanizmu allosterycznej komunikacji w obrębie Hsp70 oraz z jego partnerami wiązania. Cel główny autor pracy realizował poprzez trzy zadania szczegółowe, odpowiadające różnym etapom cyklu katalitycznego. Po pierwsze badał zmiany konformacyjne indukowane hydrolizą ATP, po drugie indukowane związaniem domeny J oraz po trzecie indukowane wiązaniem substratu peptydowego. Cele są jasno postawione i dobrze umotywowane oraz powiązane z danymi doświadczalnymi dla zmutowanych białek Hsp70.

Rozdział trzeci (Metodyka badań) zawiera wprowadzenie do termodynamiki statystycznej, podstaw mechaniki kwantowej oraz dynamiki molekularnej i pól siłowych, wraz z algorytmem Verleta, periodycznymi warunkami brzegowymi i sumowaniem Ewalda. Autor opisuje zastosowane metody wzmocnionego próbkowania (*umbrella sampling*, metadynamika), transformacje alchemiczne i cykl termodynamiczny, a także narzędzia analizy. Zestaw metod jest dobrany trafnie i adekwatnie do postawionych celów.

Na uznanie zasługuje szczegółowy opis metodyki badawczej. Przy wprowadzeniu termodynamiki statystycznej, autor wychodzi od rozkładu Boltzmanna, poprzez definicję entropii i średnich po zespole. Opisuje też równanie Schrödingera, potem przechodzi do dynamiki molekularnej i szczegółowo opisuje równania związane z polem siłowym. Następnie opisuje jak zdefiniowana jest temperatura w symulacjach dynamiki molekularnej oraz ciśnienie. Przechodzi potem do opisu całkowania równań ruchu i algorytmu Verleta, następnie periodycznych warunków brzegowych i sumowania Ewalda do obliczeń elektrostatyki. Po tym obszernym wstępie przechodzi do metod wzmocnionego próbkowania i opisuje te, których używał w rozprawie. Posiłkuje się także licznymi rysunkami, zwłaszcza przy wyjaśnianiu metod wzmocnionego próbkowania. Ułatwia to odbiór metod. Myślę, że taki szczegółowy opis metodologii będzie przydatny dla innych młodszych badaczy, którzy będą chcieli dogłębnie zrozumieć metody symulacji w kontekście dynamiki molekularnej.

Rozdział czwarty (Procedura symulacyjna) dokumentuje przygotowanie trzech układów badawczych oraz protokoły symulacji równowagowych, analizy trajektorii i wyznaczania profili energii swobodnej, w tym symulacje metadynamiki w wariancie OPES. Rozdział ten jest napisany w formie publikacyjnej, ale uważam, że poziom szczegółowości jest wystarczający, aby odtworzyć obliczenia.

Rozdział piąty (Wyniki i dyskusja) stanowi rdzeń rozprawy i jest podzielony zgodnie z trzema zadaniami opisanymi w części Cele i zakres pracy. W pierwszej części autor scharakteryzował zmiany strukturalne zachodzące w domenie wiążącej nukleotyd po hydrolizie ATP oraz zbadał, w jaki sposób obsadzenie tej domeny wpływa na jej powinowactwo do domeny wiążącej substrat. W drugiej części przeanalizował zmiany konformacyjne wywołane związaniem domeny J, prześledził drogę sygnału allosterycznego prowadzącą do centrum katalitycznego oraz określił rolę poszczególnych reszt zakonserwowanego motywu odpowiedzialnego za aktywację. Pokazał, że obecność domeny J faworyzuje przemieszczenie Thr199 w kierunku końcowego fosforanu ATP, umożliwiając utworzenie kluczowego kontaktu między Thr199 a ATP. W trzeciej części porównał te obserwacje ze zmianami wywołanymi obecnością substratu, sprawdzając, czy oba czynniki aktywują białko w podobny sposób. Do tych analiz autor wykorzystał symulacje równowagowe dynamiki molekularnej oraz metody wzmocnionego próbkowania, uzupełnione analizą trajektorii i wyznaczaniem profili energii swobodnej. Tę część rozprawy czyta się z zainteresowaniem, a wyniki są dobrze zilustrowane.

W rozdziale szóstym (Podsumowanie) autor krótko podsumowuje uzyskane wyniki i przedstawia zaproponowany mechanizm aktywacji białka DnaK przez domenę J, w tym zaproponowany mechanizm aktywacji na drodze indukowanego dopasowania. Autor pokazuje, w jaki sposób związanie domeny J uruchamia zmiany konformacyjne przenoszone przez cząsteczkę aż do jej centrum katalitycznego, prowadząc do stanu, który umożliwia hydrolizę ATP. Podsumowanie dobrze porządkuje wnioski płynące z poszczególnych części pracy i osadza je w szerszym kontekście działania tej rodziny białek.

Po przeczytaniu rozprawy nasunęło mi się kilka pytań, które przedstawiam poniżej. Nie umniejszają one jej wartości, lecz mogą stać się przedmiotem dyskusji podczas obrony.

Model domeny NBD z ADP autor zbudował na podstawie dostępnej struktury bez nukleotydu, wobec braku struktury krystalicznej NBD zawierającej ADP (rozdz. 5.1.1). Czy nie było problemów z przygotowaniem tego układu? Jestem też ciekawa, w jakim stopniu to mogło wpłynąć na wnioskowanie o „zamkniętej” konformacji NBD po hydrolizie.

Autor podaje, że niepewności profili US wyznaczył metodą bootstrap (str. 45). Czy zastosowany wariant bootstrap uwzględniał autokorelację danych w oknach.

Czy odrzucenie pierwszych 100 ns (okna SBD β) i 250 ns (okna NBD) było wystarczające i jak zdecydowano o tym, ile ns odrzucić przy równoważeniu?

Do opisu białka, jonów oraz kompleksu Mg-ATP autor stosował pole siłowe CHARMM36m. Nie był dla mnie jasny sposób ustalenia stanów protonacji i tautomerów reszt histydynowych (zwłaszcza His33) oraz protonacji reszt tworzących mostki solne (np. Asp35-Arg167). Czy autor przyjął wartości domyślne w CHARMM-GUI, czy inaczej je weryfikował? Na ile te wybory mogły wpływać na obserwowane tworzenie kontaktu Thr199-ATP (rozdz. 5.2.2)?

Wpływ mutacji alanin na powierzchni oddziaływania NBD/SBD β został określany różnymi metodami obliczeniowymi (Tabele 3–5 w załączniku). Czy te przewidywania udałoby się może odnieść do danych eksperymentalnych, na przykład do pomiarów aktywności ATPazowej lub powinowactwa międzydomenowego dla kluczowych reszt (rozdz. 5.1.2)?

Znalazłam także kilka drobnych literówek i błędów gramatycznych, które nie wpływają na wartość merytoryczną rozprawy, ale je wymieniam z obowiązku recenzenta.

str. 7, powinno być „osiągnięcie”
str. 20, powinno być „pomiędzy”
str. 25, powinno być „znajdujących się”
str. 38, powinno być „transformacje”
str. 50, powinno być „zdefiniowanej”
str. 55, powinno być „NBD”
str. 71, podpis Rysunku 5.2.8, powinno być „Zaburzenie struktury β -nici”
str. 43, powinno być „macierz D, której element”
str. 51, powinno być „profile ... zostały obliczone”
str. 52, powinno być „Odległość ... była zdefiniowana”

Uważam, że pan Michał Olewniczak podjął się zbadania trudnego problemu allosterycznej aktywacji białek Hsp70. Jest to układ, w którym wolne zmiany konformacyjne były trudne do próbkowania. Autor trafnie dobrał i połączył metody dynamiki molekularnej ze wzmocnionym próbkowaniem. Uzyskane wyniki mają charakter oryginalny, są spójne z danymi biochemicznymi i wnoszą istotny wkład w zrozumienie mechanizmu aktywacji i działania tej ważnej rodziny białek. Cele rozprawy zostały jasno sformułowane i co ważne w pełni zrealizowane.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Michała Olewniczaka przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza wiedzę teoretyczną mgr inż. Michała Olewniczaka w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne, oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Michała Olewniczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.