

Gliwice, 06.09.2026 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Michała Olewniczaka

zatytułowanej: „**Mechanizm allosterycznej aktywacji białek Hsp70**” Recenzja przygotowana została na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej, z dnia 12 maja 2026 r. Opiniowana praca doktorska powstała pod opieką naukową Prof. dr hab. inż. Jacka Czuba.

1. Uwagi wstępne.

Recenzowana Rozprawa obejmuje badania teoretyczne dotyczące mechanizmu allosterycznej aktywacji białek Hsp70 z uwzględnieniem oddziaływań z białkiem J. Z dużą ciekawością zapoznałem się z powierzoną mi do oceny Rozprawą, jej lektura była cenną podróżą w świat białek szoku cieplnego. Badania teoretyczne, w kluczowej fazie zostały skonfrontowane z wynikami eksperymentalnymi. Należy podkreślić, że badania były prowadzone w systematyczny sposób, ze szczególnym zwróceniem uwagi na przygotowanie modeli. W swoich badaniach Doktorant z sukcesem opanował i wykorzystał szeroki wachlarz nowoczesnych metod obliczeniowych wykorzystywanych w dziedzinie chemii i biologii.

Praca stanowi samodzielne dzieło, część z wyników została opublikowana w bieżącym roku w prestiżowym czasopiśmie z listy filadelfijskiej - PLoS Computational Biology. Manuskrypt liczy 118 ponumerowanych stron, zawiera między innymi listę 6 innych publikacji, opublikowanych także w czasopismach z listy filadelfijskiej, których mgr inż. Michał Olewniczak był współautorem, wskazując na wysoką aktywność naukową doktoranta. Część z wyników powstała we współpracy z mgr Marcinem Pitkiem z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wszystkie odniesienia do współpracy zostały precyzyjnie opisane i nie pozostawiają wątpliwości, co do wkładu poszczególnych autorów w badania i autorstwa przedstawionej mi do analizy Rozprawy.

Politechnika Śląska
Centrum Biotechnologii
ul. Krzywoustego 8, pok. 010, 44-100 Gliwice
+48 32 237 16 59 / +48 664768710
artur.gora@polsl.pl

NIP 631 020 07 36
ING Bank Śląski S.A. o/Gliwice 60 1050 1230 1000 0002 0211 3056



2. Ocena redakcji pracy.

Rozprawa napisana została w języku polskim. Pod względem edytorskim praca jest spójna, przejrzysta, czytelnik nie ma problemów z poruszaniem się po niej. W większości rysunki są czytelne i przejrzysto ilustrują otrzymane wyniki i uzupełniają przeprowadzaną analizę.

3. Omówienie i ocena zawartości rozprawy, tematy do dyskusji.

W części zasadniczej przedstawiona rozprawa zawiera (i) wprowadzenie, który wprowadza czytelnika w problematykę Rozprawy, (ii) cel i zakres rozprawy, (iii) opis metod obliczeniowych stosowanych przez Doktoranta, (iv) opis procedur symulacyjnych, (v) wyniki własne i dyskusję wyników badań własnych wraz z odniesieniem do istniejących już badań, (vi) krótkie podsumowanie, (vii) załączniki oraz (viii) spis literatury i własnego dorobku naukowego.

W pierwszym rozdziale, poprzedzonym listą stosowanych skrótów, wprowadzeniu – Doktorant krótko i zwięźle przedstawia podstawowe dla Rozprawy terminy (allosterii, szoku cieplnego) oraz opisuje kluczowe z punktu widzenia Rozprawy białka: Hsp70, białko J (Hsp40) oraz białka DnaK i DnaJ. Przyznam, że jestem pod dużym wrażeniem tego w jaki sposób Doktorant skomasował na niecałych 16 stronach informacje, sprawnie poruszając się w tematyce skomplikowanych mechanizmów regulacji i oddziaływania wzajemnego omawianych białek. Duża kompresja informacji, niestety obdarzona jest też pewnym kosztem, skrótami logicznymi utrudniającymi precyzyjne zrozumienie przedstawionych informacji (przykładowo str. 10 „*W macierzy mitochondrialnej Hsp70 i Hsp40 są zakotwiczone do błonowego kanału (jakiego?, błony wewnętrznej, czy zewnętrznej?), a fragment polipeptydowy („a” sugeruje powiązanie zakotwiczenia białek Hsp z transportem fragmentu peptydowego, czy tak jest?) stopniowo przechodzi przez translokazy zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrialnej. Gdy w matriks znajdzie się fragment (mowa o fragmencie peptydu, który był transportowany?) mogący związać się z Hsp70, następuje utworzenie kompleksu Hsp70 z białkowym substratem (to substratem jest fragment peptydu czy białko?).*” Rozdział jest bardzo bogato ilustrowany, choć dwa z nich (Rys. 1.5.1 oraz Rys 1.6.1) nie są w mojej opinii wystarczająco czytelne. W rozdziale opisany został też mechanizm „entropowego szarpania” – fascynująca jest informacja o sile efektu rzędu 10-20 pN. Czy mógłbym poprosić o informację na podstawie jakiego eksperymentu została ona wyznaczona? Jedynym znaczącym mankamentem rozdziału w mojej opinii jest brak w zakończeniu rozdziału krótkiego podsumowania dotyczącego istniejących luk w „*state of the art*” i ich znaczenia.

Rozdział 2 cel pracy – w sposób krótki i zwięzły przedstawia cele badawcze. Moją uwagę zwrócił ostatni akapit. Byłbym wdzięczny, gdyby Doktorant rozszerzył informacje na temat potencjalnego wykorzystania białek Hsp70 jako celu molekularnego. W jaki sposób tak opracowany lek miałby działać w przypadku chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych? W jaki sposób miałyby być zagwarantowana jego selektywność w stosunku do komórek nowotworowych, a nie prawidłowych?

W rozdziale 3 przedstawiona została metodyka badań. Jest to bardzo spójnie i dobrze opisany rozdział, szczegółowo wprowadzający czytelnika w podstawy teoretyczne warsztatu wykorzystanego w badaniach własnych. Jedynym mankamentem z mojego punktu widzenia jest brak, choćby bardzo skrótowej informacji na końcu kluczowych podrozdziałów, pozwalającej odnieść przedstawioną teorię do praktycznego zastosowania w analizowanych układach (czyli mówiąc inaczej, w jakim celu dana metoda, teoria była wykorzystana).

Następujący po metodyce badań rozdział 4-ty dość szeroko i szczegółowo opisuje procedury symulacyjne. Ze względu na moje własne zainteresowania nie mogę się powstrzymać i zapytać o model wody wykorzystany w symulacjach – dlaczego taki właśnie został wybrany i jakie są potencjalne konsekwencje tego wyboru. W niektórych miejscach brakuje także, uzasadnienia wyboru startowych struktur (przykładowo, dlaczego „*Układ DnaK do badania dysocjacji SBDβ z powierzchni NBD został przygotowany na*

podstawie struktury 4JNE” – wynika to z dostępności struktury? Jej rozdzielczości? Kompletności?). Brakuje także wyjaśnienia dlaczego występują tak duże różnice w zastosowanych stałych siłowych (dla układu NBD z ADP i ATP przy zmianie różnicy RMSD zastosowano jednostronny potencjał harmoniczny o stałej siłowej równej $10000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$, a stała siłowa potencjału harmonicznego przykładanego w każdym oknie była równa $7500 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-2}$, natomiast w układzie DnaK do badania dysocjacji SBD β stałe siłowe były znacznie mniejsze. Dlaczego ścieżki reakcji zostały zdefiniowane w obu przypadkach w inny sposób (raz RMSD stanu reprezentacyjnego dla układu „substratu” i „produktu” raz, jako odległości pomiędzy centrum masy predefiniowanych atomów? Myślę, że każdy czytelnik Rozprawy docenił także umieszczenie w rozdziale 4 rysunków schematycznych opisującym schematycznie wybrane ścieżki dla wyznaczanych profili energetycznych (czytelnik musi skakać pomiędzy rozdziałem 4 i 5). Na stronie 51, omyłkowo długość symulacji została podana w nm.

Rozdział 5 – zawiera wyniki własne wraz z ich omówieniem i porównaniem z wynikami dostępnymi w literaturze. Podobnie jak w poprzednich rozdziałach zwraca uwagę solidny i systematyczny sposób przedstawienia danych. Zastanawia mnie jednak rozbieżność zastosowanych przez Doktoranta kryteriów, od tych dostępnych w literaturze (str. 57, porównanie wyników własnych z wynikami analiz NMR). Rozbieżność ta uniemożliwia wyciągnięcie bardziej precyzyjnych wniosków, brakuje też uzasadnienia dlaczego parametry selekcji są bardziej restrykcyjne. Podobnie w przypadku porównania z danymi otrzymanymi przez inne grupy badawcze dla dużo krótszych symulacji – czy metody wykorzystane do porównanie korelacji były takie same? Moją uwagę zwróciło też kilka rycin. Rysunek 5.1.3 ze względu na niezbyt szczęśliwą reprezentację wybraną do przedstawienia kontaktów reszt aminokwasowych – trudno na nim stwierdzić, czy i które kontakty są wspólne dla konformacji otwartej i zamkniętej, brakuje także możliwości szybkiego przypisania aminokwasów do poszczególnych płatów. Z kolei na rysunku 5.1.4 zastanawia mnie fakt, że dla profilu energii swobodnej dla przejścia konformacyjnego NBD między stanem otwartym i zamkniętym w obecności ADP stan pośredni pomiędzy stanem otwartym i zamkniętym ma energię niższą niż potencjalny stan równowagowy.

Idąc dalej docieramy do bardzo interesujących badań dotyczących wpływu mutacji alaninowych poszczególnych reszt na powinowactwo SBD β do NBD. Szczególną uwagę zwraca fenyloalanina 216. Doktorant podsumowując badania, żałuje, że brakuje informacji literaturowych i biochemicznych. Z ciekawości zapytam, czy Doktorant próbował przeanalizować bazy zawierające dane o polimorfizmach (bazy SNP)?

Kolejny interesujący aspekt badany przez Doktoranta to, w jego analizie, negatywna weryfikacja hipotezy dotyczącej stabilizacji stanu Thr-close przez resztę Tyr145. W tym celu Doktorant wykonał symulację z mutacją Y145A. Dlaczego Doktorant nie zastosował zamiast mutacji do alaniny – fenyloalaniny? Wówczas, różnice pomiędzy analizowanymi wariantami sprowadzałyby się tylko i wyłącznie do braku kluczowej wg niego grupy hydroksylowej. Proszę zwrócić uwagę, że w strukturze krystalograficznej treonina podstawiona jest przez alaninę, a nie walinę, co umożliwia na zlokalizowanie cząsteczki wody (widocznej w strukturze krystalograficznej) i odtworzenie wiązań wodorowych. Czy doktorant przeprowadził analizę cząsteczek wody zlokalizowanych pomiędzy wprowadzoną w miejsce tyrozyny 145 alaniną a treoniną i ATP??

Finalnie, w podrozdziale poświęconym roli motywu HPD w stymulacji aktywności białka DnaK, Doktorant w systematyczny sposób zbadał wpływ podstawienia każdego z trzech badanych aminokwasów alaniną. Nie ulega wątpliwości, że każde z takich podstawień wpływa na aktywność analizowanego białka. Szkoda, że podejście to nie zostało rozszerzone o dwa dodatkowe pytania: i) czy każda mutacja w motywie HPD będzie skutkowała niekorzystnymi zmianami? ii) czy sąsiednie aminokwasy nie mają także podobnego wpływu? Ostatnia moja uwaga dotycząca prezentowanych wyników związana jest z wynikami przedstawionymi w podrozdziale 5.3.3 „Podatność na „łamanie” SBD α w obecności czynników allosterycznych”. Doktorant porównuje otrzymane przez siebie wyniki z danymi otrzymanymi metodami krystalografii. Czy nie ma dostępnych wyników z NMR?

W rozdziale 6 Doktorant zgrabnie podsumowuje otrzymane wyniki i wnioski wynikające z jego pracy. Następnie zamieszcza jak już wspomniałem wyżej załączniki z surowymi danymi, spis literatury obejmujący 205 pozycji oraz spis własnego dorobku.

4. Wniosek końcowy.

Przytoczona powyżej ilość pytań może sugerować występowanie poważnych mankamentów w przedstawionej mi do oceny Rozprawie. Jest to absolutnie błędne wrażenie. Docieklivość Doktoranta sprawiła, że w wielu miejscach odpowiedzi, które otrzymuje generują kolejne pytania. Jest to sytuacja, z którą notorycznie stykamy się w naszej pracy naukowej. Bardzo wysoko oceniam poziom przeprowadzonych badań naukowych będących podstawą recenzowanej Rozprawy i w podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr inż. Michała Olewniczaka pod tytułem: „Mechanizm allosterycznej aktywacji białek Hsp70” " oparta jest o oryginalny, bogaty i wartościowy dorobek naukowy i spełnia z naddatkiem wszelkie wymagania określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, z dnia 20 lipca 2018 r. (t.j. Dz. U. 2024, poz. 1571 z późn. zm.) i wnioskuję do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie mgr inż. Michała Olewniczaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauk chemicznych.

prof. dr hab. Artur Góra