

Toruń, 04.08.2022r.

Dr hab. Patrycja Golińska, prof. UMK
Katedra Mikrobiologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Recenzja osiągnięcia naukowego oraz aktywności naukowej dra Krzysztofa Jakuba Pawlika w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne

Ocenę przygotowano na podstawie następujących dokumentów:

- kopia dyplomu doktora nauk biologicznych
- autoreferat
- wykaz osiągnięć naukowych
- kopie artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego
- oświadczenia współautorów publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe
- dane osobowe wnioskodawcy

1. Sylwetka habilitanta

Pan dr Krzysztof Jakub Pawlik w 1995 roku ukończył studia na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego uzyskując tytuł zawodowy magistra na podstawie pracy pt. „Charakterystyka macierzy jądrowych otrzymanych trzema metodami”. Stopień naukowy doktora nauk biologicznych uzyskał w tej samej jednostce naukowej w dniu 12.04.2002, na podstawie pracy doktorskiej pt. „Ekspresja genów syntazy poliketydowej typu I *Streptomyces coelicolor* A3(2)”. Pracę doktorską zrealizował pod kierunkiem prof. dr hab. Mariana Mordarskiego. Od 25.10.1994r. do chwili obecnej jest zatrudniony w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, początkowo na stanowiskach biotechnologa, asystenta i adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii, Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów, a następnie na stanowiskach asystenta (1.02.2021 - 1.04.2021) i adiunkta (od 1.04.2021 do chwili obecnej) w Międzyzakładowej Pracowni Analizy Instrumentalnej i Preparatyki. W międzyczasie (1.10.2009 - 30.09.2010 oraz 1.10.2012 - 30.09.2014) dr Pawlik był zatrudniony w wymiarze ½ etatu na stanowisku adiunkta na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu w Katedrze i Zakładzie Toksykologii. Habilitant odbył roczny staż podoktorski na Uniwersytecie Paris Sud XI, w Institut de Génétique et Microbiologie we Francji (obecnie Université Paris-Saclay) pod kierunkiem prof. Jean-Luc Pernodet'a oraz ośmiotygodniowy staż w na Uniwersytecie Eberharda Karola w Tybindze (Niemcy) pod kierunkiem dra Eriko Takano.

2. Ocena osiągnięcia naukowego

Osiągnięciem naukowym przedstawionym przez dra Krzysztofa Jakuba Pawlika jest cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych pod wspólnym tytułem „**Odkrycie nowego związku poliketydowego - coelimycyny i rola wybranych białek zespołu genów cpk w metabolizmie *Streptomyces coelicolor* A3(2)**”. W skład osiągnięcia naukowego wchodzi pięć oryginalnych prac oraz jedna praca przeglądowa, które zostały opublikowane na przestrzeni lat 2009-2021 w czasopiśmie z listy JCR o współczynniku wpływu (impact factor; IF) od 1,153

do 5,924. Sumaryczny Impact Factor (IF) prac stanowiących osiągnięcie naukowe wynosi **22,581**, sumaryczna liczba punktów MNiSW wynosi **414**, a liczba cytowań zgodnie z wnioskiem wynosi 69/59 razy (wg. danych z 23.07.2022r. 72/62 razy; z/bez autocytoowań). Prace oryginalne opublikowano w *Applied and Environmental Microbiology* (2009r.), *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* (2010r.), *Acta Biochimica Polonica* (2014r.), *Frontiers in Microbiology* (2021r.) i *International Journal of Molecular Science* (2021r.), zaś pracę przeglądową w *Applied Microbiology and Biotechnology* (2014r.). Czasopisma te znajdują się odpowiednio w 2, 4, 4, 1, 1 i 1 kwartyli (Q2, Q4, Q1) czasopism publikujących prace z zakresu biotechnologii i mikrobiologii stosowanej, mikrobiologii oraz biochemii i biologii molekularnej.

W czterech pracach Habilitant jest autorem korespondencyjnym i jednocześnie pierwszym lub ostatnim autorem, co oznacza, że główny ciężar planowania koncepcji tych prac, badań, analizy wyników oraz napisania manuskryptu i przygotowania odpowiedzi na recenzje spoczywał na habilitancie. W pozostałych dwóch pracach jest odpowiednio autorem drugim i ostatnim. Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania w trzech pracach zostały sfinansowane ze środków w ramach grantów, których habilitant był kierownikiem.

We wszystkich pracach stanowiących osiągnięcie naukowe rolę habilitanta w ich powstawaniu uważam za wiodącą.

W pierwszej z cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe opublikowanej w *Applied and Environmental Microbiology* Habilitant badał tioesterazę ScoT związaną z syntazą poliketydową Cpk ze *Streptomyces coelicolor* A3(2). Założeniem było scharakteryzowanie białka ScoT. W tym celu przeprowadzono badania enzymatyczne z zastosowaniem różnych substratów takich jak estry *p*-nitrofenylowe i tioestry N-acetylocysteaminowe kwasu masłowego, octowego i propionowego. Wykazano, że tioesteraza ScoT była zdolna do hydrolizy acetylu, propionylu i butyrylu, z preferencją wobec pochodnych kwasu propionowego. Następnie na podstawie homologii sekwencji badanego białka zaproponowano, że enzym ten należy do rodziny hydrolaz. Po przygotowaniu konstruktów ekspresyjnych i pozyskaniu białek rekombinowanych, badając aktywność enzymatyczną mutein wobec pochodnej *p*-nitrofenylowej kwasu propionowego i tioestru N-acetylocysteaminowy i kwasu propionowego wykazano, że seryna 90 jest aminokwasem koniecznym dla aktywności enzymatycznej tioesterazy ScoT, a histydyna 224 jest aminokwasem budującym centrum aktywne. W pracy tej Habilitant wraz z zespołem wykazał specyficzność substratową tioesterazy typu II (ScoT) kodowanej w zespole genów CPK, określił jej parametry kinetyczne i scharakteryzował jej centrum aktywne. Nie udało się określić, pozycji kwasu asparaginowego stanowiącego trzeci element triady katalitycznej tej hydrolazy. Scharakteryzowanie tioesterazy ScoT stanowiło krok w kierunku poznania jej roli w procesie syntezy coelimityny.

W drugiej pracy opublikowanej w *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* Habilitant opisuje odkrycie potencjalnego produktu syntazy poliketydowej Cpk o żółtym zabarwieniu wytwarzanego w określonych warunkach wzrostu i wydzielanego pozakomórkowo. Wykazano, że przerwanie ciągłości genu *cpkC* całkowicie hamuje syntezę żółtego pigmentu, a wprowadzenie do mutantu dodatkowej kopii tego genu przywraca jego syntezę. Wykazano, że produkcja pigmentu rozpoczyna się w fazie przejściowej wzrostu promieniowca, przy określonej gęstości zarodników w hodowli i na bogatym podłożu bez glukozy przy jednoczesnym intensywnym napowietrzaniu hodowli w podłożu płynnym. Stwierdzono, że glukoza stosowana w wielu podłożach hodowlanych dla mikroorganizmów

jest czynnikiem hamującym wytwarzanie żółtego barwnika, przez co w odróżnieniu od innych barwników (undecyloprodigosyna czy aktynorodyna) nie był on wcześniej opisywany u *S. coelicolor* A3(2). Wykazano również, że włączenie syntezy żółtego pigmentu obniża poziom syntezy dwóch barwników wspomnianych powyżej. Ponadto wykazano, że żółty pigment jest związkami polarnym i nie posiada właściwości antybiotycznych wobec przetestowanych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz drożdżaka *Candida albicans*. Cennym uzupełnieniem tej publikacji byłoby zbadanie struktury chemicznej i opisanie metabolitu.

Kontynuując badania nad tioesterazą ScoT, w pracy opublikowanej w *Acta Biochimica Polonica* uzyskano odpowiedź na pytanie jaka jest rola tioesterazy ScoT w syntezie coelimityny przez syntazę Cpk. W tych badaniach Habilitant wraz z zespołem z IITD konstruując szczep delecyjny i szczep komplementarny genu *scoT* oraz porównując poziomy syntezy coelimityny wykazał, że szczep delecyjny był niezdolny do syntezy coelimityny, zatem potwierdził udział tioesterazy ScoT w jej wytwarzaniu u *Streptomyces coelicolor* A3(2). Uzyskane wyniki badań nad tioesterazą ScoT mają znaczenie praktyczne w syntezie nowych związków poliketydowych z zastosowaniem tioesteraz typu II. Opisana przez Habilitanta tioesteraza, jak podkreśla Kandydat, znalazła zastosowanie w projektach komercyjnych w celu pozyskania dużych ilości krótkołańcuchowych poliketydów. Na uwagę zasługuje również fakt, że w tej pracy przedstawiono szybką i precyzyjną metodę pomiaru coelimityny P2 bezpośrednio w medium hodowlanym z zastosowaniem metody HPLC.

W celu lepszego poznania mechanizmów regulujących syntezę coelimityny Habilitant wraz ze współpracownikami dokonał podsumowania stanu wiedzy w tej tematyce opracowując kompleksową pracę przeglądową zatytułowaną „Multi-level regulation of coelimityn synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”. Analiza badań opublikowanych do roku 2019, w tym swoich własnych i swojego zespołu, wykazała, że regulacja genów odpowiedzialnych za biosyntezę coelimityny jest niezwykle złożona i wielopoziomowa i nadal nie w pełni poznana. Biosynteza wyspecjalizowanych metabolitów, takich jak coelimityna (choć jej rola do dziś pozostaje nieznaną), podlega złożonej kaskadowej regulacji, w którą zaangażowane są geny zlokalizowane w obrębie klastra CPK (ang. *Cluter-situated Regulators*, CSRs) oraz liczne geny zlokalizowane poza klastrem określane jako plejotropowe. Podsumowanie dotychczasowego stanu wiedzy na temat regulacji procesu syntezy coelimityny pozwoliło Habilitantowi ukierunkować swoje dalsze badania w tej tematyce.

W kolejnej pracy opublikowanej w *Frontiers in Microbiology* Habilitant podjął próbę wyjaśnienia powiązań pomiędzy regulatorami jakimi są białka CpkN i CpkO należące do rodziny białek regulatorowych SARP (ang. *Streptomyces antibiotic regulatory protein*) kodowanych przez geny zlokalizowane w obrębie klastra CPK a innymi elementami metabolizmu pierwotnego i wtórnego, prowadząc badania proteomiczne oraz eksperymenty z sondami reporterowymi i obserwacjami fenotypów bakterii. Na podstawie obserwacji zaproponowano, że białko CpkO jest aktywatorem genu *cpkN* a białko CpkN jest aktywatorem genu *scoT*, zatem białka te są kluczowymi regulatorami w metabolizmie wtórnym, wymaganymi do syntezy coelimityny. Stwierdzono, że usunięcie badanych genów regulatorowych wpływa na inne szlaki metabolizmu wtórnego związane z syntezą poliketydów, np. barwnika undecyloprodigosyny czy antybiotyku wapnio-zależnego. Habilitant wykazał, że delecja tych białek regulatorowych wpływała też na białka związane z metabolizmem pierwotnym – syntezą i degradacją lipidów. Przeprowadzone badania sugerują istnienie sprzężenia zwrotnego pomiędzy białkiem CpkO a ScbA poprzez białko ScbR2.

Podsumowując, habilitant wraz z zespołem wykazał, że białka regulatorowe typu SARP, uważane powszechnie za regulatory genów własnego klastra mogą wpływać na regulację całego metabolizmu. Dokonania w tej pracy uważam za cenny wkład w wyjaśnienie roli systemu regulacji syntazy CPK w regulacji metabolizmu wtórnego u *Streptomyces coelicolor* A3(2) i jego wpływu na metabolizm podstawowy.

Poszukując nowych białek regulatorowych kontrolujących klastry genów biosyntezy coelimityny (CPK) u *S. coelicolor* A3(2), Kandydat wraz z zespołem zidentyfikował nieznane białko SCO3932 i podjął próbę wyjaśnienia jego roli w metabolizmie wtórnym. Sekwencja tego białka wykazała homologię do białka KorSA z plazmidu insercyjnego pSam2 występującego u *Streptomyces ambofaciens*. Białko to ma funkcje elementu Kor i jest niezbędne do rozwoju kolonii promieniowca. Jego usunięcie hamuje rozwój kolonii. Natomiast jego zdolność do wiązania z własnym promotorem wskazuje, że należy do rodziny regulatorów transkrypcji GntR. Wykazano, że białko SCO3932 wiąże się z promotorami genów *cpkD* i *actII-orf4*. O ile wiązanie się z promotorem genu *actII-orf4* było już wcześniej opisane w literaturze, o tyle jego wiązanie z genem *cpkD* zostało wykazane przez Habilitanta i jego zespół. Białko wiąże się także z regionem międzygenowym pomiędzy genami SCO3932 i SCO3933. Podsumowując dokonania przedstawione w ostatniej z cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe Habilitanta, należy podkreślić, że jest to pierwsze doniesienie na temat zaangażowania regulatora z AICE w regulację metabolizmu wtórnego. Jednak pytanie czy takie połączenie odgrywa rolę w procesie wycinania/integracji AICE i może być kontrolowany przez system kilkor z SCO3932 jako potencjalnym elementem Kor pozostaje otwarte.

Podsumowując, uważam, że recenzowane osiągnięcie naukowe świadczy o samodzielności i dojrzałości badawczej dra Krzysztofa Jakuba Pawlika, który opanował i twórczo rozwinął swój warsztat badawczy w zakresie badania biologii *Streptomyces*.

3. Ocena dorobku naukowego

Poza pracami stanowiącymi osiągnięcie naukowe, dr Pawlik w swoim dorobku naukowym po osiągnięciu stopnia doktora opublikował 31 prac, w tym 28 z listy JCR ze współczynnikiem wpływu (IF) od 0,511 do 12,74, w tym w, Scientific Reports, PLOS One, Frontiers in Microbiology i The Journal of Physical and Chemical Letters. Są to w większości prace wieloautorskie a ich problematyka badawcza jest różnorodna. Pięć z nich dotyczy badań nad nanostrukturami (nanokryształy, nanocząstki), w tym ich syntezy, właściwości optycznych i przeciwbakteryjnych oraz cytotoksyczności. Pozostałe dotyczą różnych zagadnień z zakresu szeroko rozumianej biologii molekularnej i mikrobiologii, w tym molekularnego typowania izolatów klinicznych.

Wskaźniki naukometryczne dra Pawlika zgodnie ze stanem na dzień 8.02.2022 (wg. bazy Web of Science) kształtują się następująco: liczba opublikowanych prac 38, sumaryczny IF 121,35, całkowita liczba punktów MNiSW 1570, liczba cytowań (bez autocytowań) 484, index Hirscha 14, co uważam dla osoby na tym etapie kariery zawodowej za wynik dobry.

Wyniki badań dra Pawlika zostały zaprezentowane na licznych konferencjach krajowych i międzynarodowych, na co wskazuje 79 wykazanych we wniosku tytułów abstraktów. Kandydat w 10 z nich był pierwszym autorem i w 27 ostatnim, jednak na żadnej z nich nie prezentował wyników samodzielnie. Liczba dwóch wygłoszonych wykładów na zaproszenie w 2012 i 2018r. również nie jest imponująca. Habilitant był członkiem komitetu organizacyjnego dwóch edycji Wrocławskiej Konferencji Sekwencjonowania Następnej Generacji. Wykonał jedną ekspertyzę dla Lubelskiego Urzędu Celno-Skarbowego w Białej Podlaskiej. Dr Pawlik jest

współautorem trzech patentów krajowych i patentu międzynarodowego, co uważam za godne podkreślenia osiągnięcie naukowe.

Habilitant wykazuje się znaczącą aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni. Dr Pawlik poza macierzystą jednostką odbył jeden długoterminowy (Francja 2002-2003) i jeden krótkoterminowy (Niemcy 2005) staż podoktorski oraz przez 3 lata był zatrudniony na etacie adiunkta na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu w Katedrze i Zakładzie Toksykologii, gdzie prowadził prace badawcze i uczestniczył w przygotowaniu aplikacji grantowej do programu STRATEGMED III. Efektem współpracy z dr Takano (Tybinga, Niemcy) jest publikacja Pawlik K., Kotowska M., Chater K., Kuczek K, Takano E. A cryptic type I polyketide synthase (cpk) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Arch Microbiol., 2007. Efektem współpracy z naukowcami z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu są cztery publikacje naukowe i jeden patent.

Zgodnie z pkt 3 art. 2019 rozdz. 3 Ustawy o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, który mówi, że kandydat do stopnia doktora habilitowanego powinien wykazać się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej stwierdzam, że dr Krzysztof Jakub Pawlik w pełni spełnia te wymagania.

Ponadto, współpraca Habilitanta z zespołem prof. Marka Samocia, w ramach grantu Harmonia, zaowocowała pięcioma oryginalnymi publikacjami naukowymi. Obecnie Habilitant jest również wykonawcą w projekcie badawczo-rozwojowym realizowanym we współpracy z Uniwersytetem Rzeszowskim. Od kilku lat dr Pawlik współpracuje z dr hab. Katarzyną Matczyszyn z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej oraz z prof. Iforem Samuelem z Uniwersytetu w St. Andrews (Wielka Brytania) regularnie publikując uzyskane wyniki badań. Dr Krzysztof Jakub Pawlik na przestrzeni lat 2012-2021 wykonał nieznaną liczbę (6) recenzji dla międzynarodowych czasopism mikrobiologicznych (np. *International Journal of Molecular Sciences*, *Frontiers in Microbiology*, *Journal of Applied Genetics*), co może świadczyć, że nie jest powszechnie rozpoznawany jako samodzielny naukowiec.

Podsumowując, oceniam dorobek dra Krzysztofa Jakuba Pawlika po uzyskaniu stopnia doktora jako dobry, podkreślając jednocześnie, że w okresie tym powstało kilka prac, które stanowią istotny wkład Habilitanta w biologię molekularną, mikrobiologię i biotechnologię. Ponadto Habilitant wykazał się skuteczną umiejętnością pozyskiwania funduszy na prowadzone przez siebie badania naukowe.

4. Ocena dorobku dydaktycznego, popularyzatorskiego i organizacyjnego

Pomimo, że do uzyskania stopnia naukowego doktora habilitowanego nie są wymagane osiągnięcia dydaktyczne Habilitant wykazuje duże doświadczenie w tym zakresie. Chociaż jednostka macierzysta z którą Habilitant jest związany od początku swojej kariery naukowej nie prowadzi działalności dydaktycznej, to dzięki zatrudnieniu na stanowisku adiunkta na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Habilitant prowadził zajęcia dydaktyczne dla studentów farmacji. Był promotorem 18 prac magisterskich, trzech prac licencjackich i trzech inżynierskich. Opiekował się ponad czterdziestoma studentami uczelni wrocławskich w ramach praktyk studenckich.

Na szczególną uwagę zasługuje dorobek organizacyjny i popularyzatorski Habilitanta. Po uzyskaniu stopnia doktora dr Pawlik kierował dwoma grantami badawczymi finansowanymi przez KBN i MNiSW, odpowiadał za badania prowadzone przez IITD w ramach konsorcjum IITD PAN z Politechniką Wrocławską (grant NCN Harmonia). Był pomysłodawcą, autorem i kierownikiem odpowiedzialnym za realizację projektu Projekt BINWIT finansowanego przez

Centrum Projektów Polska Cyfrowa (2018-2021). W ramach tego projektu zorganizował Pracownię Transmisyjnej Mikroskopii Elektronowej oraz współorganizował Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki IITD PAN. Projekt BINWIT był również szeroko promowany przez Habilitanta na zorganizowanych konferencjach, Dolnośląskim Festiwalu Nauki, stronie internetowej projektu, w mediach społecznościowych i serwisie internetowym YouTube. Nad wszystkimi działaniami promocyjnymi dr Pawlik sprawował nadzór organizacyjno-merytoryczny, jako kierownik projektu BINWIT. W/w działania świadczą o umiejętności Habilitanta w pozyskiwaniu środków na badania i rozwój ze źródeł zewnętrznych. Dr Pawlik pełnił także rolę wykonawcy w grantie badawczym NCN, kierownika zespołu mikrobiologicznego w projekcie NCBR, kierownika zadań konsorcjanta IITD PAN w projekcie badawczym Harmonia NCN, co wskazuje na umiejętność nawiązywania współpracy naukowej. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (PTBioch) oraz Polskiego Towarzystwa Genetycznego (PTGen), w którym od czterech lat pełni funkcję sekretarza oddziału dolnośląskiego.

Podsumowując, uważam, że dr Krzysztof Jakub Pawlik posiada w dorobku osiągnięcia naukowe, stanowiące znaczny wkład w rozwój dyscypliny oraz wykazuje się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni/institucji naukowej. W związku z tym stwierdzam, że dr Pawlik spełnia wymagania stawiane osobom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego, określone w art. 219 ust 1 p. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego.

Patrycja Golińska