

Katowice, 18.07.2022 r.

Prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget

Zespół Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

## RECENZJA

osiągnięcia naukowego i aktywności naukowej, dydaktycznej i współpracy naukowej

**Pana dra Krzysztofa Pawlika**

ubiegającego się o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w  
dyscyplinie nauki biologiczne

### Sylwetka Habilitanta

Pan dr Krzysztof Pawlik jest absolwentem Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego. Tytuł magistra uzyskał w roku 1995, na podstawie pracy pt: „Charakterystyka macierzy jądrowych otrzymanych trzema metodami”. W 2002 roku Rada Naukowa Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej (IITD) Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu nadała Habilitantowi stopień doktora nauk biologicznych. Podstawą jego nadania była rozprawa doktorska zatytułowana „Ekspresja genów syntazy poliketydowej typu I *Streptomyces coelicolor* A3(2)”.

Pracę zawodową dr Krzysztof Pawlik rozpoczął w 1994 roku, kiedy to został zatrudniony w IITD w Zakładzie Mikrobiologii, Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów na stanowisku biotechnologa. W kolejnych latach pracował na stanowisku asystenta (1996-2007), adiunkta (2007-2016), ponownie asystenta (2016-2021), a obecnie adiunkta (od 01.04.2021 r.). Od 01.02.2021 jest również członkiem zespołu Międzyzakładowej Pracowni Analizy Instrumentalnej i Preparatyki. Przez trzy lata, w okresie 1.10.2009 - 30.9.2010 oraz 1.10.2012 - 30.09.2014, dr Krzysztof Pawlik łączył pracę w IITD z pracą na ½ etatu na stanowisku adiunkta w Katedrze i Zakładzie Toksykologii na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

### Ocena osiągnięcia naukowego

Jako osiągnięcie naukowe Pan dr Krzysztof Pawlik przedstawił cykl 6 publikacji, wydanych w latach 2009-2021, pod wspólnym tytułem:

#### Odkrycie nowego związku poliketydowego – coelimycyny i rola wybranych białek zespołu genów *cpk* w metabolizmie *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Prezentowane osiągnięcie naukowe składa się z pięciu prac eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej. Wyniki prac doświadczalnych opublikowane zostały w *Applied and Environmental Microbiology*, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *Acta Biochimica Polonica*, *Frontiers in Microbiology* oraz *International Journal of Molecular Sciences*, a publikacja przeglądowa w *Applied Microbiology and Biotechnology*. Wszystkie publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego są współautorskie, w dwóch z nich Habilitant jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, w trzech kolejnych, jest autorem ostatnim i korespondencyjnym, a w ostatniej publikacji drugim autorem. Kolejność autorów oraz załączona dokumentacja jednoznacznie wskazują, że udział dra Krzysztofa Pawlika w realizacji badań i publikacji uzyskanych wyników był kluczowy. We wszystkich pracach doświadczalnych Habilitant brał udział w opracowaniu koncepcji i planu badań, prowadził doświadczenia obejmujące między innymi: przygotowanie konstruktywów plazmidowych, oznaczanie ilości produkowanych przez *S. coelicolor* A3(2) poliketydów, tworzenie szczepów delecyjnych czy przygotowanie materiałów do badań proteomicznych. Uczestniczył także w analizie i dyskusji wyników, przygotowaniu manuskryptów i udzielaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Warto podkreślić, że badania, których wyniki stanowią podstawę trzech pierwszych publikacji były finansowane przez granty uzyskane z Komitetu Badań Naukowych oraz Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. W dwóch z nich dr Krzysztof Pawlik był kierownikiem, w jednym wykonawcą. Powodzeniem zakończyły się również Jego starania o sfinansowanie analiz proteomicznych z funduszy Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego, którego status IITD miał w latach 2014-2018.

Sumaryczny Impact Factor (IF) czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego wynosi **22,581**, natomiast liczba ich cytowań jest równa **75** (wg bazy Web of Science, stan na dzień 04.08.2022). Liczba punktów MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 414. Warto podkreślić, że cztery artykuły cyklu ukazały się w czasopismach mieszczących się w pierwszym (3 prace) i drugim kwartylu (1praca) czasopism publikujących z zakresu mikrobiologii, biochemii i mikrobiologii molekularnej.



Głównym problemem badawczym, którego rozwiązania podjął się dr Krzysztof Pawlik było poznanie funkcji genów *cpk* kodujących syntazę coelimycyny (CPK) u *Streptomyces coelicolor* A3(2). Obiekt badań Habilitanta to modelowy gatunek dla rodzaju *Streptomyces*, który może syntetyzować ponad 20 metabolitów wtórnych.

W publikacji „*Streptomyces coelicolor* A3(2) produces a new yellow pigment associated with the polyketide synthase Cpk” dr Pawlik poszukiwał warunków, które indukują u tej bakterii syntezę żółtego pigmentu (nazwanego później coelimycyną), którego produkcję zaobserwował we wcześniejszych badaniach. Dzięki zastosowaniu szeregu różnych podłoży hodowlanych oraz różnych warunków hodowli Habilitant wykazał, że synteza pigmentu zachodzi jedynie przy odpowiedniej gęstości hodowli. Autorzy tłumaczą tą obserwację faktem regulacji syntezy badanego produktu mechanizmem quorum-sensing opartego na  $\gamma$ -butyrolaktonach. Wyniki eksperymentów pokazały również, że produkcja pigmentu, zachodzi w bogatym podłożu pozbawionym glukozy i w warunkach silnego napowietrzania hodowli płynnych. Dr Pawlik oceniał również aktywność biologiczną coelimycyny wobec wybranych mikroorganizmów oraz jej cytotoksyczność. Wyniki tych badań wskazują, że nie wykazuje ona istotnej aktywności bójczej wobec testowanych mikroorganizmów i linii komórkowych.

W interesującej publikacji pt: „Multi-level regulation of coelimecin synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Review” (2019) autorzy dokonali gruntownego przeglądu literatury dotyczącego regulacji procesu syntezy coelimecyny. Omówili działanie szeregu czynników regulatorowych, takich jak białka typu SARP, regulatory plejotropowe oraz dwuskładnikowe systemy regulacyjne w aktywacji genów klastra CPK. Przegląd ten pokazuje, że Autorzy doskonale znają mechanizmy determinujące funkcjonowanie CPK. Praca ta jest doskonałym wstępem i podstawą do badań, które Habilitant przeprowadził w kolejnych latach.

Celem kolejnej pracy pt: Coelimecin synthesis activatory proteins are key regulators of specialized metabolism and precursor flux in *Streptomyces coelicolor* A3(2) (2021) było poznanie funkcji białek CpkN i CpkO w indukcji biosyntezy coelimecyny u badanego szczepu. Wyniki szeroko przeprowadzonych badań, obejmujących analizy proteomiczne, wykorzystanie sond reporterowych, jak i obserwację fenotypów wykazały, że oba badane białka pełnią ważną rolę w regulacji klastra CPK. Pełnią one funkcję aktywatorów syntezy coelimecyny, przy czym białko CpkO aktywuje większość genów zespołu CPK, a także geny strukturalne. Przeprowadzone badania pozwoliły Autorom na zaproponowanie następujących mechanizmów działania badanych białek, CpkO jest aktywatorem genu *cpkN*, z kolei białko CpkN jest aktywatorem *scot*. Istotnym wnioskiem wynikającym z zaprezentowanych badań jest udział białek CpkN



i CpkO w regulacji nie tylko CPK, ale również innych szlaków metabolizmu podstawowego i wtórnego *S. coelicolor* A3(2).

Funkcji innego czynnika, regulującego aktywność klastra genów CPK u *S. coelicolor* A3(2), poświęcona jest publikacja pt: „GntR-like SCO3932 protein provides a link between actinomycete integrative and conjugative elements and secondary metabolism” (2021). Autorzy tej pracy skupili się na poznaniu roli białka SCO3932, kodowanego przez gen znajdujący się w elemencie genetycznym, będącym homologiem plazmidu pSam2, biorącym udział w regulacji syntezy metabolitów wtórnych u *Streptomyces coelicolor* A3(2). W eksperymentach przeprowadzonych w warunkach *in vivo* i *in vitro* Autorzy wykazali, że badany czynnik transkrypcyjny SCO3932 wiąże się do promotora własnego genu i przylegającego do niego genu *CO3933*, a także genów *cpkD* i *actII-ORF4*. Uzyskane wyniki dowodzą, że na poziomie molekularnym istnieje ścisła interakcja pomiędzy procesami syntezy metabolitów wtórnych a aktywnością elementów insercyjnych występujących u *Streptomyces*.

Dwie pozostałe prace wchodzące w skład osiągnięcia naukowego zawierają wyniki badań prowadzonych przez Habilitanta i współautorów nad tioesterazą typu II (ScoT), kodowaną przez gen wchodzący w skład zespołu genów CPK. W pierwszej z tych prac zatytułowanej „Type II thioesterase ScoT, associated with *Streptomyces coelicolor* A3(2) modular polyketide synthase Cpk, hydrolyzes acyl residues and has a preference for propionate” Habilitant i współautorzy badali specyficzność substratową tego enzymu. W trakcie badań przeprowadzono testy powinowactwa dzikiego białka ScoT do różnych substratów. Wyznaczone wartości parametrów kinetycznych reakcji wykazały, że badana tioesteraza ma największe preferencje wobec pochodnych kwasu propionowego. W pracy podjęto też próbę ustalenia składu aminokwasowego centrum aktywnego ScoT. Analiza uzyskanych białek rekombinowanych pozwoliła Autorom na ustalenie, że seryna 90 jest aminokwasem koniecznym do aktywności katalitycznej ScoT, a histydyna 224 tworzy jego centrum aktywne.

Wyniki dalszych badań nad enzymem ScoT zaprezentowano w publikacji pt: “Type II thioesterase ScoT is required for coelimycin production by the modular polyketide synthase Cpk of *Streptomyces coelicolor* A3(2)” (2014). Ocena poziomu syntezy coelimycyny u mutantu delecyjnego genu *scoT* i szczepie komplementacyjnym tego genu pozwoliła autorom tej pracy na potwierdzenie bezpośredniej roli tioesterazy ScoT w procesie syntezy coelimycyny. Na potrzeby tych badań Autorzy opracowali szybką i precyzyjną metodę, z wykorzystaniem HPLC, do oznaczania poziomu coelimycyny w podłożu hodowlanym.

Do najważniejszych osiągnięć Habilitanta zaliczam: (1) odkrycie nowego związku poliketydowego produkowanego przez *Streptomyces coelicolor* A3(2) i ustalenie warunków aktywacji zespołu genów CPK

odpowiedzialnych za syntezę tego metabolitu wtórnego (2) wyjaśnienie roli białek CpkO i CpkN w regulacji syntezy coelimityny, (3) wykazanie, że elementy integracyjne i koniugacyjne promieniowców mogą wpływać na syntezę coelimityny i aktynorydyny.

W podsumowaniu stwierdzam, że publikacje dra Krzysztofa Pawlika, wskazane jako osiągnięcie habilitacyjne, stanowią oryginalny wkład w rozwój mikrobiologii i biotechnologii. Przedstawione wyniki poszerzają naszą wiedzę o poliketydowym związku produkowanym przez *S. coelicolor* A3(2), coelimitynie, oraz mechanizmach regulacji zespołu genów *cpk* odpowiedzialnych za syntezę tego związku. Wyniki tych badań, obok znaczenia poznawczego mają duży potencjał aplikacyjny. Do realizacji postawionych celów Habilitant wykorzystywał szereg metod obejmujących klasyczne techniki mikrobiologii i biochemii, a także techniki biologii molekularnej, bioinformatyczne oraz zaawansowane metody analizy instrumentalnej.

### **Pozostały dorobek naukowy**

Dorobek naukowy dra Krzysztofa Pawlika, wliczając cykl artykułów tworzących osiągnięcie naukowe, obejmuje 41 publikacji. Cztery z nich Habilitant opublikował przed uzyskaniem stopnia doktora. Sumaryczna wartość współczynnika Impact Factor wynosi 121,35, a liczba punktów MNiSW i MEiN 1570. Biorąc pod uwagę, że w trakcie pracy zawodowej Habilitanta punkty przyznawane przez Ministerstwo zmieniały się wielokrotnie, trudno ocenić podaną przez Habilitanta wartość. Należy jednak podkreślić, że wyniki wielu badań, w realizacji których uczestniczył dr Pawlik, opublikowane zostały w dobrych i bardzo dobrych czasopismach, takich jak *Applied Microbiology and Biotechnology*, *Chemistry-A European Journal*, *Biosensors and Bioelectronics*, *PLOS One*, *Scientific Reports*, *Journal of Physical Chemistry Letters*, *Flexible Electronics*, *International Journal of Molecular Sciences* czy *Frontiers in Microbiology*. Prace współautorstwa Habilitanta były cytowane, bez autocytowań, 484 razy (wg bazy Web of Science), a wartość współczynnika *h* wynosi 14, co pokazuje, że prace Habilitanta wzbudzają zainteresowanie naukowców. Tematyka badawcza publikacji Habilitanta jest bardzo różnorodna i obejmuje zagadnienia nie tylko związane z metabolitami wtórnymi produkowanymi przez promieniowce i genetyczną regulacją ich syntezy, ale wieloma aspektami badań nad bakteriofagami i patogennymi mikroorganizmami. Wyniki badań, w których uczestniczył Habilitant prezentowane były na wielu krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych (79 doniesień po uzyskaniu stopnia doktora). Na dwóch konferencjach wygłosił wykłady. Dorobek naukowy dr Pawlika obejmuje również współautorstwo 3 patentów i jedno zgłoszenie patentu międzynarodowego.

Do istotnych osiągnięć naukowych Habilitanta zaliczam uczestnictwo w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów, czego owocem jest część ocenianego

właśnie dorobku naukowego. Pozytywnie oceniam starania Habilitanta o fundusze na prowadzenie projektów badawczych. Po uzyskaniu stopnia doktora Habilitant kierował trzema projektami. Dwa z nich finansowane przez KBN i MNiSW dotyczyły odpowiednio: analizy aktywności kinetycznej tioesterazy typu II ze *Streptomyces coelicolor* A3(2) oraz poznania struktury i procesu biosyntezy związku poliketydowego u tego samego szczepu bakterii. Trzeci, bardzo duży projekt, zatytułowany „Baza Informacji Naukowych Wspierających Innowacyjne Terapie – BINWIT” finansowany był przez Centrum Projektów Polska Cyfrowa. W kolejnym projekcie, pozyskanym z NCBiR, dedykowanym utworzeniu bazy danych immunogenetycznych polskiej populacji, Habilitant pełnił funkcję kierownika zespołu mikrobiologów. Fundusze na opracowanie tej bazy pochodziły z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Z kolei, w granicy Harmonia (NCN) realizowanym przez Konsorcjum Politechniki Wrocławskiej oraz IITD, Habilitant był kierownikiem zadań realizowanych przez IITD. Obecnie Habilitant zaangażowany jest, jako wykonawca, w realizację projektu badawczo-rozwojowego, którego celem jest opracowanie biopreparatu fagowego do zwalczania lekoopornych bakterii z rodzaju *Klebsiella*. Fundusze na ten projekt pozyskane zostały w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Podkarpackiego na lata 2014-2020. Jako wykonawca uczestniczył także w projekcie dotyczącym systemu regulacji biosyntezy nowego antybiotyku u *S. coelicolor* A3(2).

Wysoko oceniam współpracę dra Krzysztofa Pawlika z pracownikami różnych jednostek naukowych. W załączonym autoreferacie Habilitant prezentuje się jako pracownik otwarty na współpracę i poszukujący badaczy, z którymi może rozwiązywać różnorodne problemy naukowe. W najbliższej przyszłości warto byłoby zadbać o staż w zagranicznej instytucji naukowej, który mógłby ułatwić poszerzenie kompetencji i zapewni dalszą, owocną karierę naukową.

#### **Aktywność naukowa realizowana poza macierzystym Instytutem**

Dr Krzysztof Pawlik prowadził badania naukowe w kilku różnych jednostkach naukowych. Przed uzyskaniem stopnia doktora badania nad genem *cpkC* prowadził w Norwich, John Innes Centre (Anglia). Już po obronie doktoratu, w trakcie rocznego stażu podoktorskiego (01.12.2002 do 30.11.2003) w Instytucie Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytetu w Paryżu (Francja) realizował projekt badawczy dotyczący transferu plazmidów zintegrowanych z chromosomem *S. coelicolor*. Kolejna instytucja, w której Habilitant zdobywał doświadczenie zawodowe to Uniwersytet Eberharda Karola w Tybindze, gdzie prowadził badania nad aktywnością genów syntazy poliketydowej CPK. Przez trzy lata, równoległe z pracą w IITD, dr Krzysztof Pawlik zatrudniony był na etacie adiunkta w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analizy Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

W Uniwersytecie Medycznym aktywność naukowa Habilitanta związana była z Jego udziałem w realizacji projektu pt.: „Badanie własności biologicznych nowych pochodnych izoksazolo- i pirazolopirydyny” oraz prowadzeniem badań nad peroksydacją lipidów i polimorfizmem genu NAT 2.

#### **Działalność dydaktyczna i organizacyjna**

Dr Krzysztof Pawlik przez trzy lata zatrudniony był na etacie adiunkta w Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, co wiązało się z obowiązkiem prowadzenia zajęć dydaktycznych. Habilitant prowadził ćwiczenia z toksykologii dla studentów Wydziału Farmacji. Dr Pawlik ma istotne osiągnięcia w zakresie opieki nad młodymi adeptami nauki. Pełnił funkcję promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim dr Bartosza Bednarza oraz był promotorem 18 prac magisterskich. Ponadto, był promotorem trzech prac licencjackich i trzech inżynierskich. Habilitant angażował się również w promocję osiągnięć IITP, w ramach której wraz ze współpracownikami przygotował szereg materiałów informacyjnych umieszczonych w Internecie.

W ramach działalności organizacyjnej Habilitant przygotował koncepcję, a następnie zorganizował nową pracownię transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Współuczestniczył również w organizacji Laboratorium Genetyki i Bioinformatyki. Udział w utworzeniu tych jednostek naukowych w IITD związany był z realizacją projektu „Baza Informacji Naukowych Wspierających Innowacyjne Terapie – BINWIT”, którego dr Pawlik był pomysłodawcą i kierownikiem. W 2018 i 2019 roku Habilitant był członkiem komitetów organizacyjnych dwóch konferencji: II Wrocławskiej Konferencji Sekwencjonowania Następnej Generacji i III Wrocławskiej Konferencji Sekwencjonowania Następnej Generacji – diagnostyka.

We wniosku końcowym stwierdzam, że całkowity dorobek naukowy Habilitanta spełnia wszystkie wymogi stawiane kandydatom do stopnia doktora habilitowanego, o których mowa w art. 219 ust. 1, pkt 1-3 ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Dr Krzysztof Pawlik jest dojrzałym naukowcem, posługującym się nowoczesnymi metodami badawczymi, gotowym budować swój zespół i rozwijać dalszą współpracę badawczą. W oparciu o przedstawioną w recenzji jednoznacznie pozytywną ocenę dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego Habilitanta stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN o podjęcie stosownej uchwały opiniującej pozytywnie wniosek dra Krzysztofa Pawlika o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

*Zpfeget*