



prof. dr hab. Michał Dadlez
Zakład Biofizyki, IBB PAN
Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa

Warszawa 1.03.2024

Ocena osiągnięcia naukowego pt. „Potencjał biotechnologiczny oraz charakterystyka oddziaływania związków powierzchniowo czynnych z modelowymi białkami” i dorobku naukowego oraz działalności organizacyjnej i dydaktycznej p. dr Tomasza Janka w związku z ubieganiem się o stopień doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

1. Sylwetka kandydata

Pani dr Tomasz Janek ukończył w roku 2005 studia magisterskie na kierunku chemia ze specjalizacją w informatyce chemicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Jego praca magisterska opisywała syntezę i właściwości spektroskopowe matryc fluorkowych domieszkowanych jonami lantanowców i została wykonana pod kierunkiem prof. Piotra Solarza. Prace doktorską Kandydat wykonał pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Łukaszewicza, pracując jako starszy specjalista naukowo-techniczny w Zespole Dydaktycznym Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Dysertację doktorską pt. „Izolacja, identyfikacja oraz charakterystyka właściwości biomedycznych biosurfaktantów” obronił 12.10.2013 przed Radą Wydziału Biotechnologii.

Po obronie doktoratu, jeszcze do lutego 2015 Kandydat pracował na stanowisku naukowo-technicznym na Wydziale Biotechnologii, obejmując z dn. 1.03.2015 stanowisko asystenta badawczo-dydaktycznego w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, a od 1.03.2018 stanowisko adiunkta w tym samym Zakładzie. Już jednak we wrześniu 2018 kandydat zmienił miejsce zatrudnienia obejmując kontrakt w ramach stażu podoktorskiego (1.10.2018-30.09.2020), a następnie stanowisko adiunkta badawczo-dydaktycznego (od 1.10.2020) w Katedrze

Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, które to stanowisko piastuje do dziś. Ukończył dwusemestralne studia podyplomowe dotyczące kierowania zespołem w Uniwersytecie Ekonomicznym we Wrocławiu.

2. Ocena osiągnięcia naukowego.

Kandydat wyróżnił w swoim dorobku prace dotyczące analiz oddziaływań wybranych związków powierzchniowo czynnych z białkami modelowymi, zamykając osiągnięcie w cyklu ośmiu spójnych tematycznie publikacji (IF między 4 a 5,5). Dr Janek jest we wszystkich tych publikacjach jednocześnie pierwszym i korespondującym Autorem.

Deklarowana motywacja uzasadniająca prowadzone badania jest aplikacyjna, kierowana przeświadczeniem o konieczności poszukiwania biodegradowalnych związków powierzchniowo czynnych do stosowania w licznych produktach rynkowych, w których stanowią one niezbędny komponent. Autor we wstępie zauważa, że w obecnie wytwarzanych kosmetykach, środkach czyszczących, produktach u używanych w rolnictwie, farmaceutycznych, czy spożywczych stosuje się w przeważającej większości surfaktanty pochodzące z syntezy chemicznej, często niedegradowalne lub wręcz toksyczne, zanieczyszczające środowisko. Odnotowuje też przełom w zainteresowaniu naturalnymi biosurfaktantami pochodzenia mikrobiologicznego, tu źródłem ich mogą być bakterie lub grzyby, lub nowymi syntetycznymi, lecz biodegradowalnymi związkami. Autor podnosi też, że proces produkcyjny może w tych przypadkach również być bardziej korzystny dla środowiska. W dalszej części wstępu nacisk zostaje położony na aktywność biologiczną surfaktantów, szczególnie ich właściwości bakteriobójcze, wirusobójcze, czy też grzybobójcze. Autor wiąże aktywność biologiczną związków powierzchniowo czynnych z ich oddziaływaniem z białkami, receptorami, białkami transportowymi, enzymami, wspierając to stwierdzenie odnośnikami do kilku publikacji. Ten aspekt stanowi główny temat jego aktywności zawodowej i zdaniem recenzenta mógłby doczekać się bardziej pogłębionego uzasadnienia w rozprawie z wskazaniem przykładów literaturowych wykazujących pośrednictwo białek w aktywności biologicznej surfaktantów. Adekwatnego uzasadnienia wyboru właśnie tej klasy kompleksów do dalszych badań zatem we wstępie nie ma. Dalej, w kilku zdaniach Autor dyskutuje różne rodzaje oddziaływań fizycznych stabilizujących te kompleksy, szczególnie podkreślając rolę efektu hydrofobowego, wymienia też stosowane metody badawcze, szczególnie podkreślając

rolę metod obliczeniowych. Wymienia w końcu kilka przykładów analiz kompleksów białek modelowych z syntetycznymi anionowymi czynnikami powierzchniowo czynnymi, wskazując na wspólny mianownik tego typu oddziaływań, a mianowicie denaturację białek. Konkluduje niezbyt jasnym zdaniem o tym, że surfaktanty nie są „inhibitorami lecz modulatorami aktywności struktur enzymów”, co wydaje się też stać w sprzeczności z konkluzją o denaturacji białek w kompleksach z surfaktantami. Bardzo krótki wstęp razi zatem miejscami brakiem jasności wyводу. Nie wynika z niego np. konkluzja o korzystnym potencjale prowadzonych badań dla racjonalizacji strategii zastosowań tych związków w biotechnologii, biochemii, medycynie, farmacji, rolnictwie; enigmatycznie brzmi też zapewnienie o roli własnych badań przy zastępowaniu surfaktantów syntetycznych naturalnymi. Autor nie uzasadnia przekonująco biotechnologicznego znaczenia założeń pracy, np. że badania oddziaływań surfaktant – modelowe białko globularne, przekładają się wprost na ich oddziaływanie z innymi białkami, o potencjale modyfikacji aktywności układu biologicznego, skoro sam Autor nadmienia że związki te w odmienny sposób będą oddziaływać np. z białkami o strukturze mniej uporządkowanej. Nie ma też informacji jakiego typu produkty z klasy bakteriobójczych, wirusbójczych, czy też grzybobójczych, bo to produkty z tej tylko klasy, jak wywodzi Autor, opierają swoją aktywność na oddziaływaniu z białkami, mogłyby zostać stworzone/ulepszone z wykorzystaniem wyników pracy. Cel pracy sformułowany jako badanie mechanizmu oddziaływania surfaktant-białko „ze szczególnym uwzględnieniem roli struktury i dynamiki....w determinowaniu ich aktywności biologicznej, użytkowej (aktywności użytkowej??? wtrącenie recenzenta) i zastosowań w biotechnologii”, wykraczający poza niewątpliwy aspekt poznawczy nie znajduje w części wstępnej pogłębionego uzasadnienia.

Jak już wspomniałem, w skład osiągnięcia naukowego zatytułowanego „Potencjał biotechnologiczny oraz charakterystyka oddziaływania związków powierzchniowo czynnych z modelowymi białkami” włączono osiem prac z lat 2017-2020. We wszystkich tych publikacjach Kandydat występuje na pozycji pierwszego i jednocześnie korespondującego Autora. Kandydat jest w nich wszystkich inicjatorem i głównym wykonawcą. Prace są cytowane, doczekały się już łącznie 85 cytowań. Prace zostają podzielone w zależności od badanego białka, od modelowych, typowych białek globularnych, jak albuminy (P1-P5), lizozymu białka kurzego (P5,P6), cytochromu c (P7) oraz lipazy - enzymu o znaczeniu przemysłowym (P8).

W przypadku albuminy badano szereg wariantów związków powierzchniowo czynnych by wyjaśnić jakiego typu oddziaływania są dla stabilizacji kompleksu krytyczne. Autor wyjaśnia też aspekt aplikacyjny tych badań argumentując, że albumina, jako główne białko transportowe

krwi, może wchodzić w interakcje z amfifilowymi/niepolarnymi terapeutykami, jak wskazana daptomycyna, potencjalnie modulując ich biodostępność. Stąd uzasadnienie dla analizy determinant tego oddziaływania.

Autor stosuje szereg klasycznych metod charakterystyki strukturalnej i biofizyki białek (fluorescencja Trp, kołowy dichroizm, kalorymetria, dynamiczne rozpraszanie światła) wspomaganych przez metody obliczeniowe. W przypadku albuminy silny efekt gaszenia fluorescencji unikalnego tryptofanu wskazał główną kieszeń wiążącą jako prawdopodobny obszar tworzenia kompleksu z badanymi związkami, kalorymetria wykazała entropowy mechanizm stabilizacji kompleksów (str.9), a dokowanie molekularne pozwoliło zaprezentować modele kompleksów (ryc. 1,2).

W badaniach kompleksów z lizozymem, modelowaniu ulegają kompleksy białkowe surfaktantów kationowych, jako potencjalnych antybiotyków o działaniu lizosomotropowym, a uzasadnieniem badania ich kompleksów z lizozymem jest potencjalna synergia przeciwdrobnoustrojowej aktywności lizozymu i surfaktantów. Tworzenie kompleksu śledzono mierząc zmiany w wydajności fluorescencji Trp. Nie jest jasne dlaczego wzrost zawartości struktur drugorzędowych obserwowany w analizach kołowego dichroizmu w kompleksach lizozymu z DMM-11 i DMPM-11 ma wspierać tezę o destabilizacji (rozwinęciu) jego struktury drugorzędowej, proponowanej dla uzasadnienia wzrostu wydajności fluorescencji dla tych dwu związków? Autor nie próbuje interpretować tego kontrintuicyjnego rezultatu, choć powinien.

Dokowanie DMGM-14 do lizozymu wykonano wybierając jedną z potencjalnych hydrofobowych kieszeni wiążących (ryc. 3, na której trudno zlokalizować ligand). W badaniach aktywności przeciwbakteryjnej wykazano pewną poprawę aktywności bakteriostatycznej (a nie bakteriobójczej – str.12) przy skojarzeniu surfaktantów z lizozymem, nie wiadomo na jakiej podstawie powstaje wniosek o nieaddytywności efektu. Wątpliwości rozwiewa lektura publikacji 6, z rysunkiem 4, tym niemniej tekst rozprawy nie powinien takich wątpliwości budzić przy przedstawianiu jednego z głównych rezultatów „osiągnięcia”. Nadal jednak nie wiadomo, czy ta synergia związana jest w jakikolwiek sposób z tworzeniem kompleksu (mało prawdopodobnego w stężeniu mikromolowym dla stałej 10^3 - z grubsza licząc przy stałej asocjacji 3×10^3 powinniśmy się spodziewać 0,01 uM kompleksu przy 2 uM składników i 1,2 uM kompleksu przy 20 uM składników), czy też wynika z samoistnej aktywności obu czynników. Czy sprawdzono wpływ obecności surfaktantów na aktywność hydrolityczną lizozymu, metody są dostępne. Nie widać zatem iunctim badań strukturalnych i testów aktywności.

Cyt c ma według Autora stanowić białko modelowe reprezentatywne dla hemoprotein, nie wskazuje jednak, poza obecnością hemu, jakie cechy cyt c miałyby reprezentatywność dla tej dużej i niehomogennej rodziny białek konstytuować, nie podaje też uzasadnienia tych badań dla zastosowań biotechnologicznych surfaktantów. Badania Autora wskazały na tworzenie kompleksu poprzez agregację cząstek surfaktanta na powierzchni białka, prowadząca do silnie substechiometrycznej obecności białka w kompleksie i do niewielkich przesunięć strukturalnych w jego obrębie. Autor podnosi nowatorski aspekt prowadzonych badań, nie precyzując sposobu ich wykorzystania dla „opracowania zastosowań pochodnych czwartorzędowych soli amoniowych, mających właściwości lizosomotropowe w medycynie, jako substancje o aktywności przeciwnowotworowej”.

Podobny do powyższych schemat badań strukturalnych został zastosowany w ostatniej publikacji z cyklu, w której badano oddziaływanie lipopeptydowych biosurfaktantów z P. fluorescens (wiskozyzny, amfizyny) i lipazy z Yarrowia lipolytica. Tym razem jednak partner białkowy nie był białkiem modelowym, lecz uzyskanym przez oczyszczenie frakcji sekrecyjnej w szczepie z usuniętymi dwiema proteazami enzymem o potencjale aplikacyjnym. Uzyskano potwierdzenie oddziaływań surfaktantów z lipazą w stechiometrii 2 cząsteczki surfaktanta na cząsteczkę lipazy.

Kandydat szczegółowo opisuje swój udział w powstaniu każdej publikacji, podając informacje w formie tabelaryzowanej w połączeniu z oświadczeniami współautorów. Te informacje wykazują, że wkład dr Janka jest kluczowy, w zgodzie z pierwszą pozycją jego nazwiska w tych publikacjach. Przedstawione oświadczenie współpracowników precyzyjnie opisują ich wkład i potwierdzają wiodącą rolę kandydata w ich powstaniu.

Podsumowana przez Autora na str. 18 zawartość przedstawionego w rozprawie „osiągnięcia” sprowadza się do 7 punktów: Punkty 1-2 podnoszą kwestie metodologiczne, traktując „zapropozowanie metodologii lub empiryczną jej weryfikację” (cokolwiek to miałyby znaczyć - przyp. rec.) a *de facto* wdrożenie kilku klasycznych metod analiz biofizycznych jako część „osiągnięcia”. Trudno się z tym zgodzić; Pkt 3. Pomiar parametrów charakteryzujących wiązanie wybranych surfaktantów z białkami modelowymi o luźno zarysowanym związku z biotechnologią; Pkt 4 i 5 wzmiankują jako osiągnięcie stwierdzenie zależności efektywności oddziaływania od: wielkości i hydrofobowości cząsteczki surfaktanta oraz struktury czy sekwencji białek. Taki truizm nie kwalifikuje się jako element „osiągnięcia naukowego w istotny sposób poszerzającego istniejącą wiedzę w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia” przedstawianego rozprawie habilitacyjnej; Pkt 6 – to stwierdzenie synergii aktywności surfaktant lizozym, skomentowane wyżej; Pkt 7 – Autor

stwierdza, że jego badania ujawniły duży potencjał aplikacyjny badanych surfaktantów, jednak zdaniem recenzenta w treści rozprawy trudno znaleźć jakiegokolwiek uzasadnienie tego stwierdzenia. O uzyskaniu ekspresji i charakterystyki lipazy, opisanej w pracy 8, ani o stworzonych modelach molekularnych badanych kompleksów Autor tu nie wspomina, przyznając też, że żadna generalizacja uzyskanych rezultatów nie jest możliwa (pkt.5). Jak widać Autor sam ma problemy w sformułowaniu istotnej treści osiągnięcia, które na podstawie w/w listy można zmieścić jak w pigułce w konstatacji: zmierzono parametry oddziaływania kilku układów surfaktant-białko modelowe, stwierdzając w przypadku lizozymu efekt synergii z obecnością surfaktanta. Osiągnięcie nadzwyczaj skromne w świetle wymagań stawianych rozprawom habilitacyjnym. Co więcej Autor nie odnosi się do obszernej literatury przedmiotu, co byłoby oczekiwane, by można uznać nowatorski aspekt prowadzonych badań za udokumentowany. Badania oddziaływań surfaktant-białko (także dla białek modelowych, jak BSA czy lizozym) mają długą historię, choćby ze względu na proces denaturacji indukowany przez surfaktanty. Autor jedynie we wstępie omawia kilka zagadnień, jednak dyskusji odnoszącej badania własne do wiedzy opisanej choćby w cytowanej pracy przeglądowej z 2011 (Otzen 2011), czy bardziej aktualnych pracach przeglądowych, jak np.: Aguirre-Ramírez, M., Silva-Jiménez, H., Banat, I. M., & Díaz De Rienzo, M. A. (2021). Surfactants: physicochemical interactions with biological macromolecules. *Biotechnology letters*, 43(3), 523–535. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03054-1>, brak. Tak dokonany wybór publikacji Autora trudno uznać za osiągnięcie wnoszące znaczny wkład w rozwój dyscypliny biotechnologia.

3. Inne osiągnięcia naukowe kandydata.

Pracując przed uzyskaniem stopnia doktora w Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, kandydat pod kierownictwem swojego promotora prof. Marcina Łukaszewicza, zajmował się poszukiwaniem nowych związków powierzchniowo czynnych produkowanych przez bakterie arktyczne. Prowadził badania własności nowych związków wyizolowanych z hodowli trzech szczepów bakteryjnych. Wykazał potencjał aplikacyjny, w tym również medyczny, kilku odkrytych nowych związków.

Po obronie doktoratu, pracując na stanowisko asystenta badawczo-dydaktycznego a następnie adiunkta w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, dr Janek podjął współpracę nad tworzeniem nowych sond fluorescencyjnych z przeznaczeniem do obrazowania medycznego. Prowadził badania

koniugatów konkanawaliny A z wybranymi fluorochromami. Wykazał potencjał aplikacyjny tych sond jako fluoroforów w znakowaniu lektyn. Uczestniczył też w badaniach kompleksów metali i cyklopeptydów polihistydynowych jako mimetyków dysmutaz ponadtlenkowych, metalokompleksów związków aminofosfonowych jako potencjalnych cytostatyków, zajmował się też przeciwdrobnoustrojowym działaniem peptydomimetyków mucyny.

Kandydat podjął też współpracę z wiodącym w zakresie zastosowań biosurfaktantów jako substancji przeciwdrobnoustrojowych i przeciwnowotworowych zespołem prof. Rodrigues z Uniwersytetu Minho w Portugalii. W ramach tej współpracy odbył 4 miesięczny staż badawczy w tym ośrodku, realizując dwa tematy badawcze, co należy uznać za spełnienie warunku pracy w więcej niż jednym ośrodku badawczym. W ramach pierwszego z nich szukał synergicznych kompleksów biosurfaktanta pseudofaktyny z jonami metali dwuwartościowych. Drugi dotyczył optymalizacji warunków produkcji ramnolipidów przez bakterie *Burkholderia thailandensis* na podłożu produktów ubocznych przemysłu rolnego. Badania te zaowocowały publikacjami i przyczyniły się do uzyskania przez Kandydata własnego grantu OPUS dotyczącego oddziaływań metalokompleksów lipopeptydowych surfaktantów produkowanych na hydrolizatach odpadów przemysłu rolno-spożywczego. Kandydat prowadził też własny projekt badawczy „Miniatura 2”, dotyczący wpływu metalokompleksów biosurfaktantów lipopeptydowych na wirulencję *Candida albicans*.

Dr Janek współpracuje obecnie w szeregu innych projektów dotyczących wykorzystania odpadów postprzemysłowych do produkcji pożądaných związków biologicznie aktywnych. Dokumenty wymieniają współpracę z dwiema firmami, jednej z Belgii, drugiej z Portugalii.

Autor legitymuje się łącznie 37 publikacjami (w tym współautorstwem 2 prac przeglądowych, w których dr Janek figuruje jako Autor ostatni) w recenzowanych czasopismach o zróżnicowanym poziomie IF. Dokumenty wymieniają 23 publikacje eksperymentalne z okresu po uzyskaniu doktoratu, poza pracami wchodzącymi w skład osiągnięcia, oraz 4 prace opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora. Tematyka prac opublikowanych po doktoracie dotyczy zróżnicowanych układów molekularnych, w tym białkowych, takich jak: sondy fluorescencyjne, peptydy cykliczne, mucyna i jej fragmenty, antyoksydanty peptydowe, kompleksy pseudofaktyny, surfaktyny, oraz różnych aspektów biotechnologicznego wykorzystania odpadów przemysłowych. W 10 publikacjach eksperymentalnych spoza „osiągnięcia” nazwisko Kandydata zajmuje pierwsza pozycję na liście autorów, a w 12 jest on wymieniony jako autor ostatni, także w 12 jako Autor korespondujący. Dr Janek w wielu publikacjach poza „osiągnięciem” również pełni zatem istotną rolę.

Prace niewchodzące do cyklu były dobrze cytowane, łącznie 650 razy, co prowadzi do indeksu Hirscha 13. Dane bibliometryczne mieszczą się w limitach przyjętych zwyczajowo dla tego etapu kariery naukowej.

Publikacjom tym towarzyszą 54 doniesienia konferencyjne, przyjmujące formę plakatu (45) lub wystąpień ustnych (7), także na kilku konferencjach międzynarodowych. Dr Janek uczestniczył w kilkunastu projektach grantowych, prowadził jako kierownik kilka niewielkich projektów i jeden projekt NCN OPUS 19. Kandydat aktywnie rozpowszechnia swoje osiągnięcie i stara się o fundusze na ich prowadzenie.

Kandydat bierze udział w komitetach redakcyjnych czasopism naukowych, także w Komitecie Redakcyjnym jednej monografii, wykonał wiele recenzji publikacji w czasopismach, również o wysokim IF.

4. Aktywność dydaktyczna i popularyzatorska.

Działalność dydaktyczna Kandydata jest znacząca, tworzył i prowadził liczne kursy dla studentów zarówno z racji zatrudnienia w Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, jak i Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Ma już bogate doświadczenie w prowadzeniu zajęć dla studentów oraz w prowadzeniu prac inżynierskich (4) i magisterskich (11), recenzuje te prace, opiekuje się wolontariuszami. Pełni też rolę opiekuna naukowego i promotora pomocniczego jednej rozprawy doktorskiej, której obrona została zaplanowana na koniec roku 2023. Kandydat udziela się organizacyjnie w ramach swojej działalności uczelnianej, organizował też warsztaty popularyzujące naukę.

Aktywność dr Janka spełnia wymogi w zakresie działalności edukacyjnej, popularyzatorskiej i organizacyjnej.

5. Wniosek końcowy

W podsumowaniu, zdaniem recenzenta, dorobek przedstawiony jako osiągnięcie naukowe p. dr Tomasza Janka nie spełnia wymagań stawianych w postępowaniach w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego, określonych w art. 219 ust. 1 pkt 1-3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.), przedstawionego wyboru 8 prac nie sposób bowiem zakwalifikować jako „osiągnięcia

naukowego w istotny sposób poszerzającego istniejącą wiedzę w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia”. Ze względu na tak dokonany wybór prac recenzent nie rekomenduje uznania obecnie przedłożonej rozprawy jako podstawy do nadania p. dr Tomaszowi Jankowi stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.



prof. dr hab. Michał Dadlez