

Wzrost 11.12.2019
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE
Zastępca przewodniczącego
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okolów

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpł. dnia	10-12-2019
L. dz. RN-GM/	186/2019



Uniwersytet
ŁÓDZKI

Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz
Katedra Biofizyki Molekularnej
Uniwersytetu Łódzkiego

Recenzja osiągnięcia naukowego oraz pozostałego dorobku naukowego dr Marcina Kołaczekowskiego w związku z postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna

Dr Marcin Kołaczekowski ukończył z wyróżnieniem studia na kierunku biotechnologia na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego, po obronie pracy magisterskiej nt. „Analiza regionu wykluczającego wnikanie plazmidu CoLIB, z grupą niezgodności IncI1” w 1992 roku. Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii nadała Mu Rada Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego po obronie rozprawy pt. „Charakterystyka Pdr5p, głównego transportera związanego z wieloraką opornością drożdży na substancje toksyczne”, której promotorem był dr hab. Stanisław Ułaszewski (1997).

Odbył dwa krótkoterminowe staże naukowe w Wolnym Uniwersytecie Brukselskim (6 miesięcy) i Uniwersytecie Groningen (2 miesiące) oraz długoterminowe staże naukowe w Katolickim Uniwersytecie w Louvain-la-Neuve (1992-1998) oraz w Uniwersytecie Iowa (2001-2003)

Od 1999 roku jest adiunktem w Katedrze i Zakładzie Biofizyki Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (drobny błąd w Autoreferacie: to nie jest już Akademia Medyczna).

Ocena osiągnięcia naukowego

Podstawą przedstawionego osiągnięcia naukowego pt. „Oporność wielolekowa i transportery ABC – wyzwanie współczesnej chemioterapii” jest cykl siedmiu interesujących prac doświadczalnych opublikowanych na przestrzeni lat 2003-2013. Wszystkie prace ukazały się w języku angielskim, w czasopismach o międzynarodowym zasięgu: *International Journal of Antimicrobial Agents* (impact factor (IF) 1,950 w roku publikacji, obecnie 4,615), *Eucaryotic Cell* (IF 3,954), *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (IF 4,802), *Microbial Drug Resistance* (IF 1,989), *Mycoses* (IF 1,667, obecnie 3,065), *Journal of Natural Products* (IF 3,947, obecnie 4,257) i *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (IF 3,431). Sumaryczna wartość impact factor artykułów składających się na osiągnięcie naukowe wynosi prawie 21,74; doczekały się one 132 cytowań w momencie składania dokumentów do otwarcia przewodu habilitacyjnego. Wszystkie

publikacje wchodzące w skład rozprawy są współautorskie. Swój wkład w ich powstanie Habilitant szacuje na 90%, 70%, 65%, 70%, 40%, 45% i 65%. Habilitant jest pierwszym autorem sześciu z tych prac, drugim współautorem jednej pracy i autorem korespondującym czterech prac, a drugim autorem korespondującym jednej pracy. W pięciu pracach Habilitant planował doświadczenia (czyli był co najmniej współautorem koncepcji), we wszystkich brał udział w pracy doświadczalnej, napisał manuskrypt lub jego część i brał udział w redakcji końcowej wersji manuskryptu. Jego dominujący wkład w powstanie publikacji składających się na osiągnięcie naukowe nie budzi więc wątpliwości. Załączone oświadczenia współautorów (wszystkich lub co najmniej czterech w pracach, w których uczestniczyło więcej niż pięciu współautorów) są napisane w sposób zalecany przez Centralną Komisję ds. Stopni i Tytułów, (tj. wymieniony jest ich udział w sposób opisowy) i nie pozwalają na zakwestionowanie deklarowanego dominującego udziału Habilitanta w powstaniu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.

Pierwsza praca składająca się na Osiągnięcie naukowe (*International Journal of Antimicrobial Agents* 2003) analizuje zależność pomiędzy strukturą i funkcją znanych i nowo zsyntetyzowanych pochodnych fenotiazyn a ich wpływem na hamowanie wzrostu drożdży *S. cerevisiae* przez ketokonazol, substrat transportera Pdr5p. Praca wykazała, że związki mające grupę aminową na końcu podstawnika alkenylowego najsilniej zwiększały efekt hamowania wzrostu przez ketokonazol, zaś wprowadzenie grupy *N*-acetylowej zmniejszyło efekt hamowania wzrostu. Potencjalna użyteczność badanych związków jest jednak w moim przekonaniu ograniczona, gdyż minimalne stężenia hamujące wzrost drożdży wynosiły kilkadziesiąt μM .

Druga praca (*Eukaryotic Cell* 2004) wykazuje, że główny aktywator transkrypcyjny oporności wielolekowej drożdży, Pdr1p, aktywujący biosyntezę transporterów wielolekowych, aktywuje także ekspresję genu syntazy ceramidu *LAC1*, nie wpływając na ekspresję homologicznego genu *LAG1*. Wynik ten, w połączeniu z wcześniej wykazaną przez innych autorów aktywacją ekspresji genu *IPT1*, kodującego końcowy enzym szlaku biosyntezy sfingolipidów przez czynniki Pdr1p i Pdr3p (*Hallstrom et al., J. Biol. Chem.* 2001) dowodzi, że czynniki transkrypcyjne Pdr w sposób skoordynowany aktywują biosyntezę transporterów wielolekowych drożdży (takich jak Pdr5p, Snq2p i Yor1p) i istotnych składników otoczenia lipidowego, w którym funkcjonują te transportery – sfingolipidów.

Trzecia praca (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009) przedstawia zastosowanie pomysłowego prostego testu określania aktywności transporterów wielolekowych do wysokoprzepustowego badania profili farmakologicznych transporterów wielolekowych drożdży. Test oparty jest na pomiarze kinetyki przyrostu fluorescencji po podaniu drożdżom dioctanu fluoresceiny – niefluoryzującego związku, w wyniku hydrolizy którego powstaje silnie fluoryzująca fluoresceina. Dioctan fluoresceiny jest substratem transporterów wielolekowych drożdży, więc obniżenie szybkość przyrostu fluorescencji jest

miernikiem szybkości eksportu diocyanu fluoresceiny z komórek. Test jest dużo prostszy od oznaczenia wymagającego izolowania błon drożdży, może być stosowany na płytce wielodołkowej czytnika fluorescencji i umożliwia analizę poszczególnych transporterów, jeśli uzyskana jest ich selektywna nadekspresja w komórkach drożdży. Heterologiczna ekspresja transportera Cdr1p patogennego drożdżaka *Candida albicans* w komórkach drożdży piekarniczych *S. cerevisiae* umożliwiła bezpieczną analizę profilu farmakologicznego tego transportera w organizmie niepatogennym. Zaproponowana metoda stwarza warunki analizy modulacji aktywności transporterów innych organizmów, w tym człowieka, po uzyskaniu ich ekspresji w komórkach drożdży. Przeprowadzone badania przesiewowe wskazały na silne działanie inhibitorowe nowo zsyntetyzowanej pochodnej aminofenotiazyny (związku M961) wobec wszystkich badanych transporterów, w tym Cdr1p (wartości IC₅₀ rzędu 1-2 μM).

Czwarta praca (*Microbial Drug Resistance* 2009) przedstawia wyniki badań, w których porównano hamowanie wzrostu patogennych drożdżaków *Candida albicans* i *Candida glabrata* przez ekstrakty 11 roślin, a w oparciu o rekombinowane szczepy drożdży piekarniczych cechujące się różnym poziomem ekspresji głównych genów oporności wielolekowej określono rolę głównych transporterów oporności wielolekowej drożdży (Pdr5p, Snq2p i Yor1p) w oporności na przeciwgrzybowe działanie tych ekstraktów.

Kolejna praca (*Mycoses* 2009) wykazuje istotną rolę głównego transportera oporności wielolekowej *C. albicans*, Cdr1p w determinowaniu oporności/wrażliwości komórek drożdży na działanie ekstraktów wielu roślin leczniczych pochodzących z centralnej Afryki i brak wpływu tego transportera na przeciwgrzybowe działanie ekstraktów szeregu innych roślin. Interesująca jest obserwacja zwiększania wrażliwości drożdży na działanie niektórych ekstraktów w wyniku nadekspresji transportera Cdr1p; wydaje się to być to przejawem zjawiska wrażliwości pobocznej (*collateral sensitivity*). Wykorzystanie tego zjawiska może być istotne w leczeniu kandydoz spowodowanych przez szczepy lekooporne, cechujące się podwyższonym poziomem ekspresji transporterów wielolekowych.

Praca opublikowana w *Journal of Natural Products* (2013) porównuje przeciwgrzybowe właściwości rozdzielonych frakcji ekstraktu *Dalea formosa* i wyizolowanych z nich związków wobec *C. glabrata*. Z ekstraktów wyizolowano sześć nowych związków, spośród których sedonan A cechował się lepszymi niż flukonazol właściwościami przeciwgrzybowymi. Interesujące było wykazanie, że roślina wytwarza szereg zbliżonych strukturalnie metabolitów hamujących wzrost drożdżaków, w różnym stopniu eksportowanych przez główne transportery wielolekowe drożdży i stwierdzenie synergii składników ekstraktu w hamowaniu wzrostu drożdży.

Celem ostatniej z prac składających się na Osiągnięcie naukowe (*Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 2013) była identyfikacja reszt aminokwasowych uczestniczących w długodystansowej komunikacji pomiędzy domenami wiążącymi nukleotydy (NBD) i domenami transbłonowymi transportera Cdr1p, w oparciu o

analizę aktywności dużej biblioteki przypadkowych mutantów tego transportera i komputerową analizę ewolucji białek. Materiałem wyjściowym było ok. 400 000 transformantów. Praca wykazuje, że droga komunikacji pomiędzy domenami NBD a domenami TM jest zachowana w różnych, odległych ewolucyjnie grupach transporterów ABC.

Prace składające się na Osiągnięcie naukowe są świadectwem wykorzystania bogatej wiedzy i doświadczenia Habilitanta w zakresie badań transporterów wielolekowych drożdży do zagadnienia o istotnym znaczeniu biomedycznym (zwalczanie zakażeń drożdżakami, w tym szczepami lekoopornymi). Nie mam więc wątpliwości, że osiągnięcie naukowe może być przypisane do dyscypliny biologia medyczna (co zresztą przestaje mieć znaczenie w świetle nowej klasyfikacji dyscyplin naukowych, ale z kolei uzasadnia przypisanie go do nowej dziedziny nauk medycznych i nauk o zdrowiu). Krytycznie muszę się jednak odnieść do tytułu osiągnięcia naukowego, który uważam za zdecydowanie zbyt ogólny. Być może Habilitant chciał podkreślić, formułując tytuł tak szeroko, że zaproponowane metody i niektóre wnioski dotyczą szerszego spektrum transporterów ABC, w tym także transporterów ABC człowieka. Moim zdaniem przydałoby się jednak uszczegółowienie tytułu, choćby poprzez zaznaczenie, że badania dotyczą transporterów ABC drożdży i drożdżaków.

Podsumowując, zdecydowanie pozytywnie oceniam Osiągnięcie naukowe dr Marcina Kołaczkowskiego, ze względu na wagę podjętej tematyki badawczej, właściwy dobór metod badań w umiejętny sposób łączący metody biologii molekularnej, biologii komórki, biofizyki i bioinformatyki, poziom analizy wyników i ich dyskusji oraz publikację prac w dobrych czasopismach międzynarodowych.

Ocena pozostałego dorobku naukowego

Na dorobek naukowy dr. Marcina Kołaczkowskiego nie wchodzący w zakres Osiągnięcia naukowego wchodzi 13 prac, w tym 9 prac oryginalnych i 2 prace poglądowe opublikowane w czasopismach indeksowanych w bazie JCR, jedna praca poglądowa opublikowana w języku angielskim w zagranicznym czasopiśmie bez przypisanej wartości IF oraz jedna pełnotekstowa, anglojęzyczna publikacja w materiałach zjazdowych.

Dorobek naukowy dr. Marcina Kołaczkowskiego dokumentuje jego współpracę z największymi w czasie, gdy prowadzone były Jego badania autorytetami w zakresie badań transporterów ABC drożdży – prof. André Goffeau (Uniwersytet Katolicki w Louvain-la-Neuve) i prof. W. Scottem Moye-Rowley (Uniwersytet Iowa).

Dwie pierwsze prace, w których dr M. Kołaczkowski jest drugim i pierwszym autorem należą do pierwszych podstawowych publikacji dotyczących transporterów ABC drożdży. W pracy opublikowanej w *Journal of Biological Chemistry* w 1994 roku opisana jest procedura izolowania transportera Pdr5p z błon drożdży, udokumentowana jest aktywność ATPazowa tego białka i jego

podobieństwo do glikoproteiny P człowieka. Druga praca (*Journal of Biological Chemistry* 1996) podaje pomysłową metodę pomiaru aktywnego transportu przez białko Pdr5p opartą na fluorymetrycznym pomiarze eksportu rodaminy 6G z komórek drożdży i opisuje profil substratowy i inhibitorowy tego białka, w znacznej mierze pokrywające się z profilami: substratowym i inhibitorowym glikoproteiny P. Prace te doczekały się, odpowiednio, 93 i 235 cytowań do momentu składania dokumentacji habilitacyjnej.

Kolejne prace porównywały specyficzność substratową głównych transporterów wielolekowych drożdży (Pdr5p, Snq2p i Yor1p) wykazując odrębność ale też nakładanie się profili substratowych tych białek i wskazując na możliwość pełnienia przez te transportery innych funkcji fizjologicznych poza ochroną przed ksenobiotykami (*Microbial Drug Resistance* 1998; *Folia Microbiologica* 1998). Pierwsza z tych prac miała 167 cytowań do kwietnia 2019 r.

Jedna z prac dotyczyła przeciwgrzybowej aktywności cystatyny z białka jaja kurzego i histatyny wobec *C. albicans* (*Mycoses* 2010). Dalsze prace analizowały intrygujące zjawisko kompensacyjnej indukcji biosyntezy homologicznych transporterów ABC drożdży w wyniku chemicznej inhibicji wybranych transporterów. Ta kompensacyjna indukcja skutkuje paradoksalnym wzrostem szybkości transportu wspólnych substratów i wzmożeniem oporności na leki, a jak wykazały badania, w których uczestniczył Habilitant, jej mediatorem jest białko Pdr1p. Badania te pozwoliły na identyfikację domen: aktywacyjnej, regulatorowej i inhibitorowej tego białka (*FEBS Letters* 2008; *Molecular Genetics and Genomics* 2002). Innym efektem inaktywacji transporterów ABC drożdży okazała się być indukcja innych genów, między innymi genu *RTA1* warunkującego oporność na 7-aminocholesterol, indukowanego także w komórkach *C. glabrata* w odpowiedzi na leki azolowe, co zostało przedstawione w kolejnych pracach (*FEMS Yeast Research* 2012; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013).

Cennym uzupełnieniem oryginalnych prac, których współautorem jest dr Marcin Kołaczkowski są Jego prace pogładowe poświęcone omówieniu mechanizmów oporności komórek drożdży i praktycznych implikacji badań tych mechanizmów (*Pharmacology & Therapeutics* 1997; *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2001; 171 cytowań do kwietnia 2019 r.) oraz mechanizmom oporności na leki drożdżaków *Candida* (*Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016).

Dr Marcin Kołaczkowski wygłosił cztery wykłady na zjazdach międzynarodowych, wykład plenarny na zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (2009) i wykład na posiedzeniu komisji Oddziału PAN we Wrocławiu. Poza tym, brał aktywny udział w 17 międzynarodowych konferencjach naukowych i jednej konferencji krajowej przedstawiając komunikaty zjazdowe.

Sumaryczna wartość IF wszystkich publikacji dr. Marcina Kołaczkowskiego przekracza 60, a sumaryczna liczba punktów MNiSW Jego publikacji równa jest 423 (wg „starej” punktacji). Jego prace cytowane były do złożenia wniosku o

nadanie stopnia doktora habilitowanego 951 razy (856 bez autocytowań), a wartość indeksu Hirscha Jego dorobku naukowego wynosi 12 wg bazy Web of Science. Te wartości wskaźników bibliometrycznych oceniam jako bardzo dobre jak na etap habilitacji.

Zdecydowanie pozytywnie oceniam całokształt dorobku naukowego dr. Marcina Kołaczkowskiego. Liczbowo dorobek ten nie jest zbyt imponujący, biorąc pod uwagę okres czasu, w jakim powstawał, jednak zawiera prace o dużej wartości naukowej, które wniosły znaczący wkład w rozwój wiedzy o transporterach wielolekowych drożdży i drożdżaków.

Opinia o dorobku dydaktycznym, eksperckim i w zakresie pozyskiwania środków na badania

Dr Marcin Kołaczkowski był kierownikiem dwóch krajowych projektów badawczych uzyskanych w otwartych konkursach, finansowanych ze źródeł zewnętrznych (MNiSW/KBN, NCN; pomijam tu projekty realizowane w ramach badań własnych w macierzystej Uczelni). Na podkreślenie zasługuje więc Jego umiejętność zdobywania funduszy na badania naukowe. Był też wykonawcą w dwóch projektach MNiSW/NCN i uczestnikiem akcji COST.

Habilitant prowadzi intensywną współpracę międzynarodową obejmującą, poza ośrodkami, w których odbywał staże naukowe, także partnerów w Uniwersytetach we Fryburgu i Lizbonie, Colorado State University, Central Washington University i Meiji Pharmaceutical University.

Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego; był członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologicznego.

Jego dorobek dydaktyczny obejmuje prowadzenie ćwiczeń z biofizyki dla studentów kilku wydziałów Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich i części wykładów dotyczących oporności wielolekowej nowotworów i patogennych mikroorganizmów. Jest współautorem skryptu poświęconego ćwiczeniom laboratoryjnym z biofizyki dla studentów medycyny.

Był opiekunem naukowym części pracy doktorantki.

Może pochwalić się też osiągnięciami na polu popularyzacji nauki w postaci wykładów w ramach Dolnośląskich Festiwali Nauki (4 wykłady).

Zajął pierwsze miejsce w konkursie „Mój pomysł na BIOprojekt” zorganizowanym przez Wrocławskie Centrum Badań EIT+ (2009).

Przedstawione materiały nie zawierają informacji o dorobku organizacyjnym Habilitanta, dokumentują jednak Jego znaczący dorobek ekspercki. Dr M. Kołaczkowski recenzował 18 projektów Narodowego Centrum Nauki i 35 manuskryptów złożonych do międzynarodowych czasopism naukowych, co świadczy, że jest ekspertem rozpoznawalnym w skali międzynarodowej.

Pozytywnie oceniam dorobek dydaktyczny i ekspercki Habilitanta, Jego działalność na polu pozyskiwania funduszy na badania naukowe, współpracy międzynarodowej i popularyzacji nauki.

Wniosek końcowy

Pozytywnie oceniam Osiągnięcie naukowe dr. Marcina Kołaczkowskiego, jak też całokształt Jego dorobku naukowego. Habilitant jest dojrzałym badaczem. Zdobył bogate doświadczenie prowadząc badania w zespołach wiodących specjalistów w zakresie transporterów wielolekowych drożdży; umiejętnie wykorzystuje je i twórczo rozwija w dalszych badaniach, w szczególności w pracach składających się na Osiągnięcie naukowe. Jego prace wniosły znaczący wkład do wiedzy o transporterach wielolekowych drożdży i drożdżaków. Ma osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki, umiejętność pozyskiwania środków na badania i jest ekspertem rozpoznawalnym w skali międzynarodowej. W moim przekonaniu osiągnięcia dr. Marcina Kołaczkowskiego spełniają warunki określone w art. 16 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r (z późniejszymi zmianami) o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i w pełni uzasadniają wniosek o nadanie dr. Marcinowi Kołaczkowskiemu stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna. Wniosek ten popieram.



Łódź, 5 grudnia 2019

Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz