

# **Ocena dorobku naukowego i rozprawy habilitacyjnej doktora nauk medycznych Krzysztofa Fiedoruka**

## **Sylwetka naukowa Kandydata**

Pan doktor nauk medycznych Krzysztof Fiedoruk ukończył studia na Uniwersytecie w Białymstoku, na Wydziale Biologiczno-Chemicznym w 2001 uzyskując tytuł magistra biologii.

W 2009 po obronieniu pracy doktorskiej pt. „Przydatność różnych odmian technicznych metody PCR do wykrywania i identyfikacji *Listeria monocytogenes*” został mu nadany tytuł doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej.

## **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

01.10.2003 – 30.09.2003, Studia Doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Zakład Mikrobiologii.

Od dnia 01.10.2003 do dnia dzisiejszego jest zatrudniony w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Lekarskim z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

## **Ocena osiągnięcia naukowego**

Podstawą oceny osiągnięcia naukowego jest spójny tematycznie cykl 4 publikacji naukowych na podstawie prac badawczych opublikowanych w latach 2015-2017 składających się na temat „Filogenetyczne mechanizmy różnicowania się *Bacillus cereus sensu lato*”

Osiągnięcie porusza niezwykle ważny temat, zważywszy, że bakterie z rodzaju *Bacillus* mogą być zabójczymi patogenami wykorzystanymi jako broń biologiczna, mogą również powodować zakażenia oportunistyczne lub zanieczyszczać żywność, a także mogą być wykorzystane jako probiotyki. Laseczki z grupy *Bacillus cereus sensu lato* odegrały kluczową rolę w rozwoju mikrobiologii jako nauki, w szczególności *B. anthracis* – przyczyna wąglika jednej z najstarszych zoonoz i bakteria, która pomogła Robertowi Kochowi sformułować teorię „zarazkowej chorób”, znaną szerzej jako Postulaty Kocha, dając początek mikrobiologii medycznej.

Obecne spojrzenie na podział gatunkowy grupy *B. cereus* jest dość uproszczone, ponieważ bazuje głównie na cechach fenotypowych, takich jak: chorobotwórczość dla ssaków (*B. anthracis* i *B. cereus*) i owadów (*B. thuringiensis*), psychro- (*B. weihenstephanensis*) lub termotolerancyjność (*B. cytotoxicus*) oraz ryzoidalna morfologia kolonii (*B. mycoides* i *B. pseudomycoides*). Jakkolwiek podejście do klasyfikacji gatunków jest uzasadnione z praktycznego punktu widzenia, to w tym wypadku ma niewiele wspólnego z ich podziałem filogenetycznym. Liczne badania sugerują, że pod względem filogenetycznym grupa *B. cereus sensu lato* powinna być traktowana jako pojedyncza jednostka ewolucyjna, cechująca się klonalnym rozprzestrzenianiem szczepów i ich stopniową adaptacją do różnych nisz ekologicznych i/lub gospodarzy, co w dłuższej perspektywie prowadzi do powstawania odrębnych fenotypów, nazywanych również ekotypami, w obrębie głównych linii filogenetycznych *B. cereus sensu lato*.

Jednak poza nabywaniem określonych plazmidów, niewiele wiadomo o molekularnym podłożu i przyczynach takiej ekologicznej strategii różnicowania się tych bakterii.

Celem przedstawionego cyklu prac wchodzącego w skład osiągnięcia naukowego w postępowaniu habilitacyjnym były praktyczne aspekty charakterystyki *B. cereus sensu lato* takich jak

1. poszukiwanie wiarygodnych biomarkerów przydatnych przy ich identyfikacji i/lub różnicowaniu w oparciu o nowe techniki badawcze np. MALDI-TOF MS (P2)
2. optymalizacji istniejących metod, np. PFGE (P1),
3. poznanie molekularnych mechanizmów stojących za procesem filogenezy tych bakterii, jak np. zmiany zachodzące na poziomie białek i ich związek z temperaturą wzrostu (P3),
4. występowanie i charakterystyka plazmidów niosących określone geny wirulencji (P4).

Przeprowadzone badania *in vitro* dotyczyły najczęstszych gatunków *B. cereus s.l.*, głównie mezofilnych *B. thuringiensis* i *B. cereus*, oraz psychrotolerancyjnych *B. weihenstephanensis* i *B. mycoides*.

Typowanie genetyczne szczepów *B. cereus* z użyciem techniki PFGE było celem pracy pt. „One-day pulsed-field gel electrophoresis protocol for rapid determination of emetic *Bacillus cereus* isolates” (P1), w której opisana została szybka, 1-dniowa, modyfikacja standardowej, 4-dniowej, procedury typowania PFGE szczepów emetycznych. Opracowana procedura PFGE została dostosowana do „szybkich” protokołów PFGE zalecanych dla innych enteropatogenów przez PulseNet, czyli ogólnosiwiatową sieć laboratoriów ustanowioną w celu śledzenia i monitorowania bakteryjnych schorzeń jelitowych.

Celem badań, których wyniki opublikowano w drugiej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia pt. „MALDI-TOF MS portrait of emetic and non-emetic *Bacillus cereus* group members” (P2) było zróżnicowanie szczepów emetycznych *B. cereus* od pozostałych przedstawicieli *B. cereus s.l.* oraz ocena ich pokrewieństwa filoproteomicznego z zastosowaniem MALDI-TOF MS.

Należy podkreślić, że jest to nowatorska i bardzo obiecująca metoda identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów oparta na analizie widm masowych białek, głównie tych najliczniej reprezentowanych w komórce bakteryjnej, takich jak białka metabolizmu podstawowego, a w szczególności białka rybosomalne. Jest to prosta i szybka procedura przeprowadzana bezpośrednio z poziomu kolonii bakteryjnych o wyjątkowej czułości, umożliwiająca wykrycie podstawień nawet pojedynczych aminokwasów. Dzięki czemu MALDI-TOF MS pozwala na identyfikację na poziomie rodzaju, gatunku, podgatunku, a w niektórych przypadkach również szczepu bakteryjnego.

Habilitant wykazał, że filoproteomiczne podobieństwo pewnych laseczek (nieemetycznych) do szczepów emetycznych może wynikać z obecności w ich genomach wspólnych genów odpowiedzialnych za metabolizm niektórych cukrów np. L-ramnozy, co przemawia za ich adaptacyjną funkcją do podobnych i/lub pokrywających się, np. pod względem występowania określonych cukrów, nisz ekologicznych, wskazując jednocześnie nową ścieżkę w badaniach nad mechanizmami różnicowania się szczepów emetycznych. Praca (P2) wykazała również spójność widm białkowych, w szczególności białek rybosomalnych, z podziałem filogenetycznym *B. cereus s.l.*, co spowodowało kontynuowanie badań w tym temacie i przyniosło wyniki w 3 publikacji pt. „Ribosomal background of the *Bacillus cereus* group thermotypes” (P3).

Uzyskane przez Habilitanta wyniki rzuciły nowe światło na mechanizmy różnicowania się *B. cereus s.l.*, ujawniając związek pomiędzy zmianami zachodzącymi w białkach rybosomalnych oraz innych białkach uczestniczących w adaptacji bakterii do stresu cieplnego z procesem wyłaniania się termotypów *B. cereus s.l.*, niezależnie od ich pozycji filogenetycznej. Wyniki te pozwoliły na znacznie dokładniejszy, w stosunku do istniejących grup filogenetycznych/termotypów, podział laseczek na grupy czy też klastry, które Habilitant nazwał rybosomalnymi-klastrami (r-klastrami).

Kandydat wykazał, że “przejście” ze stanu termotolerancji, czyli ewolucyjnie pierwotnego dla *B. cereus s.l.*, do mezofilności nastąpiło dwukrotnie w niezależny sposób, a zjawisko tzw. zniesienia ograniczeń było głównym mechanizmem molekularnym stojącym za tym procesem.

Dodatkowo proces naturalnej pozytywnej selekcji zależnej od temperatury odpowiedzialny był za stopniowe narastanie określonych zmian w białkach, jak wzrost proporcji pewnych aminokwasów, prowadzących ostatecznie do wyodrębnienia się linii psychrotolerancyjnych oraz selekcję wariantów białek rybosomalnych swoistych dla pewnych rklastrów np. wariantów białek L21 i S13 wspólnych dla gatunków termotolerancyjnych (r-klaster VII) oraz uważanych za wysoce mezofilne, w domyśle termotolerancyjne (wzrost w 48°C), szczepów emetycznych.

Należy podkreślić, że uzyskane przez Habilitanta wyniki i wnioski znajdują również odbicie we współczesnym spojrzeniu na rybosomy, które przez lata ewoluowało z poziomu niezmiennych jednostek translacyjnych do aktywnych uczestników procesów adaptacyjnych, których składowe, czyli białka rybosomalne i rRNA, mogą podlegać zmianom w odpowiedzi na sygnały płynące ze środowiska, co w rezultacie prowadzi do ich specjalizacji.

W publikacji pt. "Genetic environment of cry1 genes indicates their common origin" (P4), Habilitant opisał mechanizmy molekularne związane z ewolucją i transmisją plazmidowych genów cry1, kodujących owadobójcze białka Cry1. Cry1 reprezentują najliczniejszą grupę tego typu białek wytwarzanych przez *B. thuringiensis* i wykazują toksyczość wobec owadów zaliczanych do głównych szkodników upraw rolniczych i leśnych, stąd też od wielu lat budzą duże zainteresowanie jako naturalne środki ochrony roślin.

Najważniejsze osiągnięcia uzyskane w cyklu publikacji stanowiących dorobek habilitacyjny i wnioski płynące z badań to:

1. Zmiany zachodzące na poziomie białek rybosomalnych są czułym wskaźnikiem procesów termoadaptacyjnych *B. cereus sensu lato* i dostarczają znacznie dokładniejszych informacji co do ich kierunku, co z praktycznego punktu widzenia może być wykorzystane na przykład do tworzenia pewnego rodzaju „map termicznych” środowiska w oparciu o rozkład r-klastrów.
2. Białka rybosomalne *B. cereus sensu lato* można traktować jako czynniki inicjujące proces termoadaptacji, którego skutki dopiero w późniejszym etapie różnicowania znajdują odzwierciedlenie w innych białkach np. białkach szoku zimna (CSPs).
3. Zmiany w białkach rybosomalnych *B. cereus sensu lato* zachodzące w wyniku termoadaptacji mają charakter kierunkowy i mierzalny, co można wyrazić za pomocą wskaźnika obliczonego z proporcji (Alanina + Walina)/(Izoleucyna + Seryna), a jego wartość zinterpretować jako poprawę stabilności (wysoka temperatura) lub elastyczności (niska temperatura) białek w zależności od kierunku adaptacji (termo- vs. psychrotolerancja).
4. Rybosomy aktywnie uczestniczą w procesach adaptacyjnych *B. cereus sensu lato* i istnieje korelacja pomiędzy białkami rybosomalnymi a kierunkiem adaptacji np. białka L20, L31 oraz L33-3 są ważne z punktu widzenia

psychrotolerancji, a białka L21 i S13 istotne dla termotolerancji, co może być wykorzystane dla celów diagnostycznych, podobnie jak inne białkowe biomarkery opisane w pracy P2.

5. W przypadku niektórych przedstawicieli *B. cereus sensu lato* np. szczepów emetycznych, nabycie genów odpowiedzialnych za metabolizm pewnych cukrów, obok temperatury i plazmidów wirulencji, może być ważnym mechanizmem leżącym u podstaw ich filogenezy.

6. Przenoszenie genów *cry1* pomiędzy plazmidami związane jest z ich lokalizacją wewnątrz tzw. kastety *cry1*, której występowanie ograniczone jest do plazmidów z określonym systemem replikacji i rozprzestrzeniających się dzięki procesowi mobilizacji. Co z czynni je dobrymi kandydatami na nośniki genów *cry1* w szczepach *B. thuringiensis* wykorzystywanych jako bioinsektycydy ze względu na zmniejszone ryzyko ich transmisji do szczepów dzikich.

7. Ewolucja genów *cry1* zachodzi również na poziomie ich ekspresji tj. poprzez różnicowanie się sekwencji odpowiedzialnych za stabilność kodującego jej mRNA. Co ma istotne znaczenie praktyczne, wskazując nowy kierunek pozyskiwania szczepów o zwiększonej efektywności jako bioinsektycydy.

### **Ocena aktywności naukowej poza osiągnięciami naukowymi**

Swoją pracę naukowo-badawczą Habilitant rozpoczął po zakończeniu studiów, a prace naukowo-badawcze Pana Doktora można ująć w główne kierunki badań, które skupiają się na praktycznych aspektach mikrobiologii lekarskiej, takich jak

1. zastosowanie technik biologii molekularnej w diagnostyce chorób zakaźnych,
2. analiza aktywności związków przeciwdrobnoustrojowych
3. badania szlaków przekazywania informacji zachodzących z udziałem fosfolipidów.

W ramach projektu statutowego, pt. „Porównanie klasycznej i molekularnej metody do wykrywania *Listeria monocytogenes* w próbkach materiałów klinicznych” (nr 3-22625) Habilitant badał za pomocą technik PCR materiały kliniczne od dzieci z biegunką na obecność patogenów jelitowych. Realizacja tych badań pozwoliła na znaczne rozszerzenie panelu wykrywanych enteropatogenów, m.in. na wszystkie odpowiedzialne za biegunki patotypy *Escherichia coli* (EHEC, EIEC, EPEC, ETEC, EAEC i DAEC), i w rezultacie doprowadziła do wyizolowania przez Habilitanta *Escherichia albertii* - drugiego patogennego gatunku z rodzaju *Escherichia*. Gatunek ten odpowiedzialny jest za zakażenia jelitowe u ludzi i zwierząt (głównie ptaków) i zaliczany obecnie do tzw. „wyłaniających się” patogenów. Należy podkreślić, że był to pierwszy przypadek izolacji *E. albertii* w Polsce, przedstawiony w publikacji pt. „Conventional and molecular methods in the diagnosis of community-acquired diarrhoea in children under 5 years of age from the north-eastern region of Poland”. Praca opisująca pełną sekwencję genomu tej bakterii pt. „First complete genome sequence of *Escherichia albertii* strain KF1, a new potential human enteric pathogen” była pierwszym tego typu doniesieniem na świecie.

Drugą i niemniej ważną korzyścią wynikającą z molekularnej diagnostyki biegunek, było rozpoznanie, *Campylobacter jejuni* jako wiodącego enteropatogena w Polsce. Kolejne prowadzone przez Habilitanta badania skupiają się na analizowaniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej naturalnych peptydów takich jak katelicydyna LL-37, oraz ich niepeptydowych analogów – ceragenin (CSAs). Związki te w dobie wielolekoopornych patogenów postrzegane są jako alternatywa dla konwencjonalnych terapii przeciwdrobnoustrojowych.



### **Udział w międzynarodowych i narodowych projektach badawczych:**

Pan Doktor uczestniczył w 9 projektach badawczych jako główny wykonawca, wykonawca lub kierownik projektu.

Uzyskał 5 nagród za działalność naukową.

### **Ocena działalności dydaktycznej:**

1. Od 2003 roku Pan Doktor prowadzi zajęcia praktyczne z przedmiotów „Mikrobiologia lekarska z immunologią” lub „Mikrobiologia” na Kierunku Lekarskim oraz „Mikrobiologia i immunologia”, „Mikrobiologia z parazytologią” i „Mikrobiologia jamy ustnej” na Kierunku Lekarsko-dentystycznym.

2. Od 2004 roku jest koordynatorem przedmiotów na Kierunku Lekarskim – nauczania w języku angielskim (English Division): „Microbiology and Immunology” (do 2009/2010) i „Microbiology” (od 2010/2011) oraz „Microbiology and Parasitology” (od 2012/2013).

Opracował (konspekty zajęć, instrukcje i prezentacje multimedialne) i prowadzenie ćwiczeń z wymienionych przedmiotów. A od 2010 roku prowadzi wykłady dla studentów English Division.

3. W latach 2002-2003 Pan Doktor prowadził zajęcia praktyczne i teoretyczne podczas kursów specjalizacyjnych Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego (CMPK) z Mikrobiologii Lekarskiej organizowanych przez Zakład Mikrobiologii (Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, kierownik: prof. dr n. med. Maria Lucyna Zaremba):

□ Nazwa kursu: „Mikrobiologiczna diagnostyka i chemioterapia wybranych chorób odzwierzęcych” (Nr kursu: 021-07-I-2002 i 1-716-2003)

□ Nazwa kursu: „Wybrane zagadnienia z diagnostyki mikrobiologicznej” (Nr kursu: 021-07-I-2002 i 2-716-2003)

4. Kandydat był opiekunem naukowym badań pt. “Molecular background of resistance to ciprofloxacin and genetic diversity of *Campylobacter jejuni* diarrheal isolates”, prowadzonych przez studentów anglojęzycznych III roku Kierunku Lekarskiego (English Division), którego wyniki zaprezentowano na XIII Białostockim Międzynarodowym Kongresie Młodych Naukowców (13th Bialystok International Medical Congress for Young Scientists) w 2018 roku.

5. Od 2018 roku jest opiekunem naukowym doktorantki: mgr Suhanya Veronica Prasad, odbywającej Międzynarodowe i interdyscyplinarne studia doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku (International Interdisciplinary PhD Studies in Biomedical Research and Biostatistics of Medical University of Bialystok).

### **Ocena działalności organizacyjnej**

Praca na rzecz Białostockiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (PTM) jako sekretarz Zarządu od 2012 roku.

2. Współorganizacja laboratorium mikrobiologicznego działającego przy Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, obejmująca:

aktywny udział w procedurze uzyskania Certyfikatu Ogólnopolskiego Sprawdzianu Wiarygodności Badań Mikrobiologicznych POLMICRO w latach 2013-2019,

stworzenie pracowni diagnostyki molekularnej.

3. Współorganizacja warsztatów i posiedzeń naukowo-szkoleniowych w ramach działalności Białostockiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (PTM) latach 2017-2019:

„Problemy w diagnostyce zakażeń wywoływanych przez bakterie o szczególnych wymaganiach wzrostowych” (2019 rok),

„Aktualna sytuacja epidemiologiczna zakażeń układu oddechowego w województwie podlaskim” (2018 rok),

„Zakażenia *Clostridium difficile* – możliwości diagnostyczne” (2018 rok),

„Zakażenia krwi – epidemiologia i diagnostyka” (2018 rok),

„Innowacyjne zastosowanie przełomowej technologii BIOLOG do identyfikacji i metabolicznego fenotypowania mikroorganizmów oraz komórek ssących” (2018 rok),

„Lekooporność wśród bakterii – aktualne problemy” (2017 rok).

4. Współorganizacja i działalność administracyjna podczas kursów specjalizacyjnych Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego (CMPK) z Mikrobiologii Lekarskiej organizowanych przez Zakład Mikrobiologii

(Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, kierownik: prof. dr n. med. Maria Lucyna Zaremba) w latach 2002-2003:

Nazwa kursu: „Mikrobiologiczna diagnostyka i chemioterapia wybranych chorób odzwierzęcych” (Nr kursu: 021-07-I-2002 i 1-716-2003)

Nazwa kursu: „Wybrane zagadnienia z diagnostyki mikrobiologicznej” (Nr kursu: 021-07-I-2002 i 2-716-2003)

5. Przygotowanie wniosków o przyznanie dotacji na inwestycję w zakresie dużej infrastruktury badawczej MNiSW:

Tytuł wniosku: „Spektrometr MALDI-TOF z funkcją identyfikacji drobnoustrojów (Biotyper) i wyposażeniem” (nr IA/SP/0600/2016)

Tytuł wniosku: „Spektrometr MALDI-TOF BIOTYPER do identyfikacji drobnoustrojów z wyposażeniem” (nr IA/SP/0669/2015)

### **Współpraca z innymi ośrodkami**

Kandydat wykazał się wielowątkową działalnością naukową co doprowadziło do współpracy „Data Transfer” z Instytutem Roberta Kocha w Niemczech (współpraca udokumentowana przez Biuro ds. Ochrony Własności Intelektualnej i Transferu Technologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, 2016 rok).

### **Staż w krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich:**

1. Rozpoczęty staż podstawowy w „Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej” (Uniwersytet Medyczny w Białymstoku; kierownik: prof. dr hab. n. med. Elżbieta A. Tryniszewska) w ramach specjalizacji w dziedzinie „Mikrobiologii Medycznej” dla diagnostów laboratoryjnych.
2. Staż w „Laboratorium Mikrobiologii Stosowanej” (Uniwersytet w Białymstoku; kierownik: prof. dr hab. Izabela Świącicka) z zakresu sekwencjonowania metodą Sangera i sekwencjonowania następnej generacji (NGS) genomów bakteryjnych z użyciem sekwenatorów: ABI3500 (Applied Biosystems), Illumina MySeq (Illumina), IonPGM (Life Technology) oraz MinION (Oxford Nanopore) (czerwiec-wrzesień 2017 rok).
3. Szkolenie „Technika PCR i jej zastosowanie” (DNA – Gdańsk, 2003 rok). 4. Szkolenie „Technika Real-Time PCR w oznaczeniach jakościowych i ilościowych” (Roche, 2016 rok).

### **Recenzowanie publikacji w czasopismach krajowych i zagranicznych:**

1. Scientific Reports - 1 recenzja
2. Microbial Cell Factories - 1 recenzja
3. Microbiology SGM - 1 recenzja
4. Acta Biochimica Polonica - 2 recenzje
5. Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology - 1 recenzja
6. Infectious Disorders - Drug Targets - 1 recenzja

### Doświadczenie zawodowe:

1. Kwalifikacje pedagogiczne do wykonania zawodu nauczyciela od 2001 roku.
2. Uprawnienia Diagnosty Laboratoryjnego od 2003 roku.
3. Praca w laboratorium mikrobiologicznym Zakładu Mikrobiologii UMwB od 2003 roku.
4. Rozpoczęta specjalizacja w dziedzinie „Mikrobiologii Medycznej” dla diagnostów laboratoryjnych (2019 rok).

### Podsumowanie i ocena osiągnięcia naukowego

Dorobek naukowy dr Krzysztofa Fiedoruka oceniam wysoko z oceną bardzo dobrą. Prace Kandydata mają charakter nowatorski, uzyskane wyniki są opublikowane w literaturze o światowym zasięgu i mają znaczenie globalne. Praca habilitacyjna jest nowatorska, rozszerzająca wiedzę z zakresu genetyki i ewolucji bakterii. Habilitant po raz pierwszy wskazały, że podobieństwo i złożona struktura genetyczna laseczek *B. cereus sensu lato* stanowią wyzwanie dla współczesnych metod diagnostyki i klasyfikacji bakterii, czy też w szerszej perspektywie dociekań nad definicją gatunku bakteryjnego.

**Bibliometria IF 32,242 punkty KBN/MNiSW 364**

### Wniosek końcowy

Stwierdzam, że wskazane przez Habilitanta osiągnięcie naukowe, a także dotychczasowy całkowity dorobek naukowy, dorobek dydaktyczny i organizacyjny spełniają kryteria określone w art. 16 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Wniosek 25.11.2019

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII  
FARMACEUTYCZNEJ I PARAZYTOLOGII  
Marzenna Bartoszewicz  
kierownik  
dr hab. n. med. Marzenna Bartoszewicz, prof. nadzw.