

Dr hab. Magdalena Płotka  
Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR PAWŁA MICHAŁA MARKWITZA ZATYTUŁOWANEJ:

„Charakterystyka mutantów *Pseudomonas aeruginosa* izolowanych z populacji traktowanej fagami litycznymi”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Pawła Markwita została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Zuzanny Drulis-Kawy oraz pod opieką promotora pomocniczego Pana dr Tomasza Olszaka w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii, Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

Rozprawa doktorska była realizowana w ramach projektu naukowego HARMONIA nr 2015/18/M/NZ6/00413 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN).

Badania zostały opublikowane w 2021 r. w czasopiśmie *Viruses* (IF 5,818) w artykule zatytułowanym: „Emerging phage resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is accompanied by an enhanced heterogeneity and reduced virulence” oraz w 2022 r. w prestiżowym czasopiśmie *ISME J.* (IF 11,217) w pracy zatytułowanej: “Genome-driven elucidation of phage-host interplay and impact of phage resistance evolution on bacterial fitness”. W obu publikacjach Pan Paweł Markwitz jest pierwszym, wiodącym autorem co potwierdzają oświadczenia współautorów przedstawionych do oceny prac. Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej były prezentowane w formie plakatów na dwóch krajowych i pięciu międzynarodowych konferencjach naukowych. Pan Paweł Markwitz jest również autorem pięciu publikacji niezwiązanych bezpośrednio z tematem pracy doktorskiej, w tym trzech o 140 punktach według listy czasopism kategorii A Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Forma pracy oparta na zbiorze publikacji spełnia nie tylko wymogi formalne dotyczące eksperymentalnych prac doktorskich, ale także idealnie wpisuje się we współczesne oczekiwania dotyczące prac badawczych.

Praca mgr Pawła Markwita obejmująca analizę interakcji pomiędzy bakteriofagami, a bakteriami wpisuje się w doskonale w bardzo istotny nurt badań związany z przeciwbakteryjnym wykorzystaniem bakteriofagów w terapii fagowej. Istotnie, zmiana struktur powierzchniowych bakterii, jako częste zjawisko w odpowiedzi na infekcję fagową, może prowadzić do obniżenia kondycji populacji bakteryjnej tzw. fitness, co związane może być ze wzrostem wrażliwości bakterii na wybrane antybiotyki. Praca Pana Pawła Markwita porusza dwa istotne aspekty, pierwszy obejmuje analizę fenotypu bakterii *Pseudomonas aeruginosa* w konsekwencji uzyskania oporności na fagi ogonkowe, drugi uwzględnia badania zmian genetycznych *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 oraz co ważne czterech szczepów klinicznych w odpowiedzi na presję selekcyjną wybranych fagów KT28, KTN6, phiKZ, KTN4, LUZ7, LUZ19 i PA5oct. Na pozytywne podkreślenie zasługuje fakt nawiązania współpracy z Laboratoriami

of Gene Technology, KU Leuven, Belgia, skąd pochodzą trzy spośród wykorzystywanych fagów: LUZ7, LUZ19 i phiKZ, co wskazuje na międzynarodowy charakter prowadzonych badań. Ponadto, bakteria *Pseudomonas aeruginosa* jest jednym z głównych czynników etiologicznych infekcji płuc u chorych na mukowiscydozę (Cystic Fibrosis, CF). Wykorzystanie więc w badaniach szczepów klinicznych CHA i AA43 pochodzących od pacjentów z CF czyni badania niezwykle istotnymi pod względem praktycznym. Jako recenzent muszę przyznać, że oceniane przeze mnie badania prowadzone były na niezwykle wysokim poziomie. Fakt wykorzystania bakteriofagów należących do różnych grup taksonomicznych i morfologicznych, czy rozpoznających różne typy receptorów (LPS, T4P) świadczy o dogłębnej analizie badanych zagadnień i przemyślanym planowaniu eksperymentów pod kontem uzyskania jak największej liczby danych.

Cel pracy jest jasno przedstawiony, a przed rozpoczęciem badań postawiono trzy hipotezy:

1. Infekcja fagowa zwiększa bioróżnorodność populacji
2. Fagi rozpoznające konkretny receptor będą generować oporność krzyżową na fagi rozpoznające ten sam receptor
3. Uzyskanie oporności na fagi powoduje spadek wirulencji szczepów

Postawiono także szereg pytań, na które Pan Paweł Markwitz wykorzystując bogaty warsztat badawczy próbował uzyskać odpowiedź.

Pierwsza z prac wchodząca w skład osiągnięcia naukowego (Viruses. 2021 jul 10;13(7):1332. doi: 10.3390/v13071332) ocenia biologię i zmiany fenotypu klonów *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 opornych na fagi, wyselekcjonowanych po traktowaniu fagami biofilmów bakteryjnych. Wkład własny Pana mgr Pawła Markwita w powstanie publikacji polegał na przeprowadzeniu typowania fagowego mutantów, wykonania badań ruchliwości, wrażliwości na antybiotyki, zmian w produkcji czynników wirulencji takich jak plicjanina, piowerdyna i elastaza, wrażliwości na dopełniacz 50% surowicy krwi baraniej i patogenności z wykorzystaniem modelu infekcji larw *Galleria mellonella*. W załączonych oświadczeniach współautorów dotyczących wyżej wymienionej publikacji, współautor pracy Pan dr Tomasz Olszak również wymienił ocenę wirulencji szczepów przy pomocy modelu *Galleria mellonella*.

**Czy Doktorant mógłby uściślić, która część badań była prowadzona osobiście, a która we współpracy?** To drobne niedoprecyzowanie nie zmienia jednak faktu, że Doktorant wykorzystywał w pracy szeroki wachlarz metod badawczych, co świadczy o wysokich umiejętnościach technicznych. Pan Paweł Markwitz wykonał szereg wariantów doświadczenia, gdzie biofilm bakteryjny traktowany był pojedynczymi bakteriofagami, lub koktajlami składającymi się z dwóch lub trzech bakteriofagów. Z każdego wariantu doświadczenia Doktorant izolował po 10 kolonii bakteryjnych co dało imponującą liczbę 417 losowo wyizolowanych klonów *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Na podstawie analiz wyselekcjonowanych klonów Doktorant wysnuł prawidłowy wniosek (popierający hipotezę nr 1), że infekcja bakteriofagowa powoduje dużą heterogenność populacji *P. aeruginosa*. Do dalszych badań

Pan Paweł Markwitz wyselekcjonował 42 klony najbardziej zróżnicowane m. in. pod względem morfologii. Badania intensywności produkcji biofilmu ujawniły, że tylko klony traktowane koktajlami fagowymi (nie pojedynczymi fagami) wykazały istotne statystycznie różnice. Ciekawym wnioskiem jest fakt pozytywnej korelacji morfologii kolonii (brązowa lub szara pigmentacja i śluzowatość), użyciem koktajlu fagowego, a powstaniem dużych delecji w regionie genu *galU* odpowiedzialnym za biosyntezę LPS. Kolejnym istotnym wnioskiem wyciągniętym przez Doktoranta, jest korelacja delecji w regionie *galU*, a zwiększoną wrażliwością bakterii na antybiotyki takie jak gentamycyna. Dużą różnorodność Doktorant zaobserwował również wśród wskaźników ruchliwości badanych klonów, w tym utratę zdolności do ruchu koziółkowego (ang. *twitching*) skorelowaną z pojawieniem się oporności na fagi, przy czym największy wpływ na ruchliwość PAO1 miało zastosowanie potrójnego koktajlu fagowego. Różnorodność odpowiedzi na infekcję fagową Doktorant zaobserwował również badając wydzielanie czynników wirulencji PAO1. Pozytywna korelacja została zaobserwowana w przypadku istotnego spadku produkcji elastazy (23/38 izolatów), natomiast klony traktowane fagami T4P-zależnymi wykazywały zwiększoną, a nie, jakby można się było spodziewać, obniżoną produkcję plicjaniny.

Moim zdaniem jako recenzenta opis apoptotycznego działania LPS nie powinien być umieszczony w pracy, ponieważ izolacja LPS, jak i same testy nie zostały wykonane przez Doktoranta. Wniosek z analizy wyników doświadczeń jest natomiast prawidłowy i sugeruje, że lipid A nie został zmodyfikowany podczas pojawiania się oporności fagowej. Jednak recenzja rozprawy doktorskiej ma na celu ocenę wkładu Doktoranta w prowadzone badania, a nie ocenę publikacji, która jest wieloautorska.

Kolejne analizy dotyczyły podatności bakterii na aktywność dopełniacza w surowicy. Badania wykazały, że zastosowanie fagów LPS-zależnych powodowało zmiany w genach syntezy LPS, co wiązało się również ze zwiększeniem podatności bakterii na aktywność lityczną surowicy. Nie dziwi brak znaczących zmian w oporności na surowicę klonów wyselekcjonowanych przez fagi T4P-zależne.

Ciekawymi badaniami były także eksperymenty prowadzone przez Doktoranta na modelu *G. mellonella*. Tylko 1/5 klonów w grupie izolatów traktowanych fagami LPS-zależnymi wykazał obniżoną wirulencję, w przeciwieństwie do 5 z 9 izolatów traktowanych fagami T4P-zależnymi. Zmniejszenie patogenności *in vivo* korelowało z jednoczesną redukcją kilku czynników wirulencji, co było najbardziej widoczne dla izolatów PAO1 traktowanych koktajlami fagowymi.

W kolejnej pracy przedstawionej do oceny dysertacji Pan Paweł Markwitz uzyskał mutanty wszystkich szczepów biorących udział w badaniu, przeprowadził typowanie fagowe mutantów, izolował DNA genomowe, brał udział w analizach genetycznych oraz badał możliwość nosicielstwa fagów litycznych w populacji w zależności od obecności profagów w genomie szczepu wyjściowego. Praca ta stanowi doskonałe uzupełnienie/ciąg dalszy prowadzonych uprzednio badań. Oprócz szczepu referencyjnego PAO1 zbadano również cztery szczepy kliniczne, które infekowano pojedynczymi

fagami lub koktajlami fagowymi. Pan Paweł Markwitz wyizolował łącznie 780 klonów *P. aeruginosa* PAO1 oraz łącznie 880 klonów szczepów klinicznych A5803, AA43, CHA i PAK. Do badań genetycznych oraz badania kinetyki wyselekcjonowano imponującą pulę 156 klonów, reprezentujących ponad dwadzieścia różnych wzorów oporności fagowej. Pan Paweł Markwitz analizował częstotliwość występowania wśród klonów oporności krzyżowej na fagi, gdzie szczepy kliniczne inne niż PAO1 rozwijały przede wszystkim oporność krzyżową na fagi T4P-zależne. Najczęściej selekcjonowaną opornością była oporność na faga giganta PA50c rozpoznającego dwa typy receptorów LPS i T4P (80/95 klony PAO1 oraz 127/140 klonów pozostałych szczepów klinicznych). Kolejno, przeprowadzono analizę polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNPs) oraz mapowanie 102 referencyjnych klonów PAO1 i 156 klonów pochodzących od wyselekcjonowanych szczepów klinicznych co wiązało się z sekwencjonowaniem genomów bakterii z wykorzystaniem metod Illumina i PacBio. Częstotliwość zmian genetycznych Doktorant przedstawił na Rycinie 17. Poza mutacjami punktowymi 23% opornych na fagi klonów PAO1 zawierało dużą delecję genomową w regionie zawierającym gen *galU* odpowiedzialny za syntezę LPS i gen *hmgA* odpowiedzialny za tworzenie brązowego zabarwienia kolonii. Często zmiany w genach biosyntezy LPS korelowały ze zmianami w genach odpowiedzialnych za syntezę egzopolisacharydu EPS. Mutacje występowały również w genie *wzy*, kodującym polimerazę antygeny O typu B lub genie *ssg*. Badania doprowadziły do wykrycia zmian w genach związanych z rzęską (*flgH*, *fliN*, *fliP*, *flhA*) w populacji traktowanej fagami T4P-zależnymi. Podobną wnikliwą analizę Doktorant przeprowadził dla szczepów klinicznych innych niż PAO1. Największą rozbieżność Doktorant zauważył w kategorii „globalnych genów regulatorowych”, w której geny *yqjG* i *vfr* zostały zamienione w populacji kontrolnej PAO1, a w populacjach innych szczepów klinicznych były to geny *cpdA* i *parS*. Doktorant przeprowadził również doświadczenia mające na celu analizę tempa wzrostu bakterii traktowanych fagami w odniesieniu do populacji kontrolnej. Mutanty PAO1 i AA43 wykazywały znaczący spadek tempa wzrostu w porównaniu z kontrolą, jednak populacje komórek A5803, CHA i PAK wykazywały spadek tempa wzrostu tylko od 20 do 29% izolatów, co często wiązało się z dużymi delecjami genomowymi. Pan Paweł Markwitz zaobserwował istotną statystycznie redukcję tempa wzrostu tylko przy selekcji dokonywanej przy użyciu koktajli fagowych. Następnie Doktorant przeanalizował możliwość nosicielstwa fagów litycznych w populacji w zależności od obecności profagów w genomie szczepu wyjściowego. Przeanalizował obecność sekwencji profagowych we wszystkich szczepach badanych i stwierdził, że 69/70 izolatów szczepów A5803 oraz CHA (szczepy, które zawierały nienaruszone dsDNA profagów) nie wykazywało stanu nosicielstwa fagów litycznych użytych do infekcji populacji.

Podsumowując, badania prowadzone przez Pana mgr Pawła Markwita to niezmiernie żmudna analiza dotycząca zmian w biologii *P. aeruginosa* w odpowiedzi na presję selekcyjną wytworzoną przy użyciu pojedynczych fagów lub koktajli fagowych. Wystarczy napisać, tak jak to wspominałam

wcześniej, że badania prowadzone były na pięciu szczepach *P. aeruginosa* traktowanych siedmioma fagami różniącymi się choćby wielkością genomu (trzy tzw. fagi jumbo) używanymi pojedynczo lub w koktajlach. Generuje to niezmierną liczbę danych, które trzeba starannie przeanalizować i podsumować. Pan mgr Paweł Markwitz bardzo dobrze poradził sobie z tym zadaniem o czym świadczy publikacja wyników w tak prestiżowym czasopiśmie jak ISME J. Hipoteza o indukcji dokładnie tego samego typu oporności fagowej przez fagi rozpoznające tę samą cząsteczkę została odrzucona ze względu na obecność mutantów wykazujących unikalne wzory fagowe dla faga użytego w eksperymencie. Hipoteza 3 (Uzyskanie oporności na fagi powoduje spadek wirulencji szczepów) została potwierdzona chociażby poprzez wyniki pracy które wskazują, że najczęstszymi przyczynami spadku tempa wzrostu bakterii są duże delecje genomowe i utrzymywanie się faga w populacji.

Czytając tak detalicznie przeprowadzone analizy **mam pytanie do Doktoranta o kolejne plany badawcze**. Ponadto, badania dotyczące interakcji bakteriofag-bakteria i konsekwencji fenotypowych i genotypowych takiego oddziaływania zostały przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych. **Czy Doktorant mógłby przytoczyć dane literaturowe stwierdzające mutacje/delecje w genomach bakterii generowane przy wykorzystaniu fagów podczas terapii fagowej?**

*Ocena poprawności formalno-językowej, stylistycznej, interpunkcyjnej oraz sposobu prezentacji*

Największym mankamentem pracy jest umieszczenie wszystkich Rycin w języku angielskim. Ryciny są bezpośrednio przekopiowane z prac oryginalnych, często łącznie z anglojęzycznymi nagłówkami. Dotyczy to przykładowo Ryciny nr 2, czy Ryciny nr 6. Często tekst na przedstawionych Rycinach jest na tyle mały, że trudno przeczytać zawartość lub np. Rycina nr 7 zawiera znaki wodne skopiowanego ze strony internetowej obrazka. Również odsyłacz tej Ryciny (pozycja 50 literatury) odnosi się do strony internetowej o dość szerokiej tematyce, a elementy samej Figury 7 zostały skompilowane z obrazków przekopiowanych bezpośrednio z kilku podstron. Zakładam, że praca doktorska przygotowana została przez Pana Pawła Markwita osobiście, jednak Rozdział 8. Inne osiągnięcia naukowe napisany został w 3 osobie. Ponadto, Pan Paweł Markwitz w rozdziale 3 pomylił (zamienił) liczbę punktów ministerialnych oraz wartość IF dwóch czasopism, w których opublikował wyniki badań wchodzących w skład przedstawionego do oceny osiągnięcia. Drobną pomyłką dotyczy również tekstu odnośnie Ryciny 17, powinno być Rycina 17B, nie 18B (strona 41), czy braku zapisu nazw genów kursywą (np. strona 7, 40 geny takie jak *yajG*, *vfr*, *flgH*, *fliN*, *fliP*, *flhA*). Jestem natomiast pod wrażeniem wiedzy Doktoranta odnośnie bakteryjnych mechanizmów oporności na infekcje fagowe, a podrozdział 1.2.2. zawiera szereg cennych informacji.



### Wniosek końcowy

W podsumowaniu bardzo wysoko oceniam przedstawioną rozprawę doktorską Pana Pawła Markwita oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z artykułem 179 ust. 3 z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669 ze zm.).

Wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr Pawła Markwita do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość naukową wyników, które zostały opublikowane w czasopismach Viruses i ISME Journal wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

Gdańsk, 2022-03-22

Dr hab. Magdalena Płotka  
UNIWERSYTET GDAŃSKI  
KATEDRA MIKROBIOLOGII

*dr Magdalena Płotka*