

**Recenzja rozprawy doktorskiej na stopień doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne**

Pana mgr Pawła Michała Markwitz

**pt. "Charakterystyka mutantów *Pseudomonas aeruginosa* izolowanych
z populacji traktowanej fagami litycznymi"**

Pomimo podejmowanych na całym świecie działań mających na celu zahamowanie selekcji i rozprzestrzeniania się wielolekoopornych drobnoustrojów wciąż rośnie liczba klinicznych izolatów bakterii zachowujących wrażliwość jedynie na nieliczne antybiotyki. W 2017 r. została opublikowana przez WHO lista najgroźniejszych dla ludzkości patogenów. W pierwszej grupie bakterii tzw. krytycznych znalazły się szczepy *Pseudomonas aeruginosa* odporne na leki ostatniej szansy - karbapenemy. *P. aeruginosa* to oportunistyczna Gram-ujemna pałeczka niefermentująca, która odpowiada także za zakażenia szpitalne, w tym o ciężkim przebiegu. Ze względu na wysoką lekooporność i liczne czynniki zjadliwości szczepów szpitalnych, infekcje wywoływane przez tę pałeczkę obarczone są wysokim ryzykiem zgonów. Konieczne jest więc poszukiwanie nowych opcji terapeutycznych. Jedną z ważniejszych alternatyw dla antybiotykoterapii jest terapia fagowa. Koncepcja fagoterapii powstała na początku XX wieku przed „złotą erą antybiotyków”. Początkowe sukcesy terapeutyczne związane z odkryciami nowych grup antybiotyków i chemioterapeutyków spowodowały zahamowanie badań nad fagami. Obecnie prowadzone są na świecie szeroko zakrojone i zintensyfikowane prace nad poznaniem podstaw genetycznych biologii bakteriofagów, zjawiskiem ko-ewolucji fag-gospodarz i potencjałem terapeutycznym wirusów bakteryjnych.

Rozprawa doktorska Pana mgr Pawła Markwitz wpisuje się w ten ważny i aktualny temat badawczy. Poświęcona jest analizie problemu wpływu fagów litycznych na różnorodność fenotypową i genotypową w populacji komórek *P. aeruginosa* oraz rozwojowi oporności na fagi. Rozprawa doktorska oparta jest na cyklu dwóch publikacji oryginalnych o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 17,035 oraz 240 punktach MEiN:

- (1) Markwitz P i wsp. „Emerging phage resistance in *P. aeruginosa* PAO1 is accompanied by an enhanced heterogeneity and reduced virulence”, *Viruses* 2021, 13(7):1332. IF = 5,818, MEiN = 100.
- (2) Markwitz P i wsp. „Genome-driven elucidation of phage-host interplay and impact of phage resistance evolution on bacterial fitness”, *ISME J.*, 2022, 16(2): 533-542. IF = 11,217, MEiN = 140.

W obydwu publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem. W przedstawionej dysertacji Pan P. Markwitz przy każdej z publikacji opisał wkład własny w jej powstanie. Ponadto współautorzy tych publikacji załączyli podpisane oświadczenia, w których szczegółowo określili swój udział w powstanie każdej z prac. Oświadczenia te zawierają również sformułowanie informujące, iż Pan P. Markwitz ubiega się o stopień doktora nauk biologicznych. Pomimo ukazania się tych publikacji w ostatnich dwóch latach 2021 i 2022 zostały one już zacytowane odpowiednio 9 i 12 razy według Web of Science. Świadczy to o dużej wartości merytorycznej publikacji i ich znaczeniu dla światowej nauki.

Ponadto część wyników uzyskanych w ramach badań do pracy doktorskiej była prezentowana wcześniej w formie plakatów na dwóch krajowych i czterech międzynarodowych konferencjach w latach 2017-2019.

Badania prowadzone w pracy doktorskiej były realizowane w ramach grantu badawczego HARMONIA 2015/18/M/NZ6/00413 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi spójny tematycznie cykl dwóch publikacji i składa się z następujących części: spisu treści, spisu tabel i rycin, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celu pracy, wymienienia publikacji stanowiących cykl pracy doktorskiej ze streszczeniami oraz przedstawionym szczegółowym wkładem własnym Doktoranta w powstanie prac, materiału badawczego i metodologii, wyników, wniosków, bibliografii, przedstawienia innych osiągnięć naukowych Doktoranta, kopii opublikowanych prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego oraz oświadczeń współautorów określających ich wkład w powstanie publikacji.

W skondensowanym wstępie Doktorant omówił dwa zagadnienia poruszane w pracy doktorskiej: (I) Gram-ujemną pałeczkę niefermentującą *P. aeruginosa*, w tym głównie szerokie spektrum czynników wirulencji jakimi się charakteryzuje, (II) bakteriofagi – ich budowę oraz bakteryjne mechanizmy oporności na infekcję wirusową. Przy tak skondensowanym wstępie rozprawy doktorskiej celowe byłoby według recenzenta wcześniejsze opublikowanie pracy przeglądowej poruszającej zagadnienia ujęte w pracy doktorskiej. Wstęp stanowi dobre uzasadnienie dla celu badań prowadzonych w prezentowanej rozprawie doktorskiej.

Głównym celem postawionym w przedłożonej do recenzji rozprawie doktorskiej jest wyjaśnienie wpływu infekcji fagów litycznych na różnorodność fenotypową i genetyczną populacji komórek *P. aeruginosa* oraz na rozwój oporności na fagi. Przed przystąpieniem do badań Doktorant postawił trzy hipotezy: (1) infekcja fagowa zwiększa bioróżnorodność populacji komórek *P. aeruginosa*, (2) fagi rozpoznające konkretny receptor będą generować oporność krzyżową na fagi rozpoznające ten sam receptor, (3) uzyskanie oporności na fagi powoduje spadek wirulencji szczepu bakteryjnego. Ponadto w trakcie realizacji badań Doktorant jeszcze postawił 6 pytań związanych bezpośrednio z wcześniejszymi hipotezami.

Wyżej wymieniony cel pracy został przez Doktoranta w pełni zrealizowany, postawione hipotezy zweryfikowano i uzyskano odpowiedzi na dodatkowych 6 pytań. A całość pracy opublikowano w dwóch przedłożonych przez Doktoranta wysoko punktowanych pracach oryginalnych.

Doktorant prowadził badania na szczepie referencyjnym *P. aeruginosa* PAO1 (jest on powszechnie stosowany w badaniach genetycznych, o zdeponowanym w NCBI GenBank i dokładnie scharakteryzowanym genomie) oraz na 4 szczepach klinicznych (o różnej podatności na infekcje fagami wykorzystującymi receptory LPS i/lub T4P do adhezji na powierzchni komórki bakteryjnej). Fagi wybrane przez Doktoranta do badań to 3 fagi rozpoznające jako receptor LPS, następne 3 fagi rozpoznające jako receptor T4P i jeden fag rozpoznający obydwa te receptory. Wybrane fagi różniły się także pozycją taksonomiczną i wielkością genomu (były wśród nich podowirusy, miowirusy i typu jumbo). Izolację klonów opornych na fagi szczepu referencyjnego oraz szczepów klinicznych, Pan P. Markwitz przeprowadził przez poddawanie hodowli bakteryjnych działaniu pojedynczych fagów jak i kombinacji zawierającej dwa lub trzy fagi. Należy podkreślić ogromną liczbę badanych wyizolowanych klonów bakteryjnych po traktowaniu fagami.

Publikacja 1. dotyczy badania bioróżnorodności populacji *P. aeruginosa* PAO1 zarówno traktowanych fagami jak i nie poddanych działaniu fagów. Doktorant wyizolował w sposób losowy 417 klonów biofilmowych. Wykonał dla nich szeroko zakrojone badania takie jak (I) badanie ruchliwości, (II) określił ich lekowrażliwość, oraz (III) zdolność do produkcji pozakomórkowych czynników wirulencji tj. elastaza, piocyjanina i piowerdyna, a także (IV) określił ich podatność na dopełniacz 50% surowicy krwi baraniej czyli uwrażliwienie bakterii na działanie dopełniacza surowicy. Biorąc pod uwagę podany przez Pana P. Markwitz wkład własny w powstanie tej publikacji oraz oświadczenie jej współautora Pana Tomasza

K. Olszaka, przypuszczam, że Doktorant uczył się metodyki badania patogenności na modelu jakim była larwa *Galleria mellonella*. Bardzo proszę Doktoranta aby dokładniej określił swój udział w doświadczeniach na *G. mellonella*.

Publikacja 2. dotyczy badania interakcji bakteriofagi-gospodarz, w tym przeprowadzenia sekwencjonowania i analizy genomów wyizolowanych klonów bakteryjnych oraz badania kosztów nabycia oporności na dane fagi w zakresie zmian kondycji populacji tzw. *fitness*. Doktorant wyizolował i poddał typowaniu fagowemu 780 klonów *P. aeruginosa* PAO1, w tym 320 klonów planktonowych, 400 klonów biofilmowych i 60 klonów kontrolnych. Ponadto Pan P. Markwitz otrzymał i analizował 800 klonów 4 szczepów klinicznych, w tym po 30 klonów z każdego szczepu bakteryjnego traktowanego fagami w określonych warunkach i po 10 klonów kontrolnych. Dla klonów szczepu referencyjnego PAO1 Doktorant wykrył oporność krzyżową komórek bakteryjnych na fagi rozpoznające ten sam receptor, odpowiednio u 12/17 i 23/24 klonów poddanych działaniu fagów LPS- i T4P-zależnych. W przypadku szczepów klinicznych taką zależność Doktorant stwierdził jedynie dla klonów szczepów infekowanych fagiem phiKZ (T4P-zależnym). Reasumując, uzyskane przez Doktoranta wyniki sugerują iż nabycie oporności na fagi LPS-zależne jest znacznie trudniejsze niż na fagi T4P-zależne. Ponadto w kontraście do szczepu referencyjnego PAO1, u szczepów klinicznych Doktorant nie wykazał w analizie statystycznej wpływu pomiędzy nabytym profilem oporności fagowej ani presją selekcyjną typu zastosowanego faga, na obniżenie tempa wzrostu populacji tzw. *fitness*. Statystycznie istotną redukcję tempa wzrostu wykazał jedynie dla klonów PAO1 opornych na więcej niż 5 fagów, uzyskanych pod presją tzw. koktajli czyli kombinacji fagów.

Głównym i niewątpliwym atutem publikacji 2. o wysokim IF = 11,217 jest szeroka i dogłębna analiza genetyczna. W publikacji analizowano zarówno szczepy dzikie jak i otrzymane oporne na fagi klony podejmując trudne wyzwanie oceny genetycznego podłoża tej oporności. Przebadano ponad 250 wyizolowanych klonów – przeprowadzono analizę polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNPs) oraz mapowanie 102 klonów PAO1 i 156 klonów szczepów klinicznych. W celu uzyskania pełnego tła genetycznego szczepy dzikie *P. aeruginosa* poddano sekwencjonowaniu metodą Illumina i metodą PacBio. Analizowano mutacje typu *missense*, *nonsense* i *frameshift* wykluczając mutacje synonimiczne. Mutacje, które występowały także w szczepach dzikich zostały wykluczone z analizy. Zastosowany wymieniony powyżej tok postępowania wskazuje na w pełni profesjonalne prowadzenie analizy genetycznej. W publikacji wykazano, iż pomimo genetycznego zróżnicowania wybranych do badań szczepów *P. aeruginosa*, wywarta presja fagów litycznych spowodowała selekcję klonów o podobnych modyfikacjach genomów tych szczepów. Wykryte u wszystkich klonów mutacje występowały w obszarach odpowiadających za biosyntezę receptorów LPS lub fimbrii typu IV. Niemniej jednak mutacje obszaru związanego z LPS u PAO1 najczęściej występowały w genach *wzy* i *ssg*, natomiast u klonów szczepów klinicznych w genach *wzy* i *wapH*. Natomiast największą liczbę mutacji w obszarze genomu związanym z biosyntezą T4P wykazano dla wszystkich szczepów w obrębie genów *pilB*, *pilQ*, *pilR*, u szczepów klinicznych także w genie *pilT*. Ponadto wykazano rozbieżność występowania mutacji w obrębie globalnych genów regulatorowych – u klonów PAO1 stwierdzono mutacje w genach *yqjG* i *vfr*, a u klonów szczepów klinicznych w genach *cpdA* i *parS*. Najczęściej mutacje w globalnych genach regulatorowych występowały u szczepów klinicznych po infekcji fagami LPS-zależnymi i stanowiły większość mutacji do jakich doszło w genomach tych klonów. Co istotne, analiza wykazała także delecje dużych obszarów w genomach tj. u opornych na fagi klonów PAO1 delecje dotyczyły obszarów od 23 tys. pz do 544 tys. pz, a u klonów szczepów klinicznych dotyczyły obszarów od 92 tys. pz do 384 tys. pz. Zarówno u klonów PAO1 jak i szczepów klinicznych obszary delecji obejmowały region genu *galU*, którego delecje były już wcześniej obserwowane przez innych badaczy. W publikacji przeprowadzono także analizę

możliwości nosicielstwa fagów litycznych w populacji komórek bakteryjnych w zależności od obecności profagów w genomie szczepu wyjściowego.

Biorąc pod uwagę podany przez Pana P. Markwitz wkład własny w powstanie tej publikacji, oświadczenia jej współautorów oraz fakt podania w rozprawie doktorskiej w rozdziale 8. „Inne osiągnięcia naukowe” 3-miesięcznego stażu naukowego jaki odbył Doktorant w ramach projektu „Internship in genetic analysis programs” w Laboratory of Gene Technology Leuven w Belgii pod opieką prof. Rob Lavigne (jednocześnie współautora publikacji 2), można wnioskować o znacznym udziale mgr P. Markwitz w badaniach genetycznych. Jednak ze względu na szeroki wachlarz przeprowadzonych analiz i zastosowanych metod genetycznych prosiłabym jednak Doktoranta o uściślenie swojego udziału w poszczególnych procedurach.

Zastosowane przez Doktoranta metody badawcze, zarówno z zakresu fenotypowego badania bioróżnorodności populacji szczepów *P. aeruginosa* traktowanych fagami jak i metody molekularne oraz bioinformatyczne, są zgodne z najnowszymi światowymi standardami i świadczą o doskonałym warsztacie pracy.

Uwagi i pytania.

1. W rozdziale 6. „Wnioski” Doktorant rzetelnie przedyskutował i przeprowadził weryfikacji hipotez oraz pytań postawionych w pracy doktorskiej. Pomimo tego zasadne wydaje się wyciągnięcie konkretnych wniosków. Bardzo proszę o przedstawienie w punktach takich wniosków w czasie trwania obrony pracy doktorskiej.
2. Doktorant wykazał obecność mutacji w obrębie konkretnych globalnych genów regulatorowych u klonów otrzymanych po infekcjach fagami. Jakie funkcje pełnią w komórkach *P. aeruginosa* te geny i czy zaistniałe mutacje mogą wpłynąć na biologię tych komórek?
3. Doktorant wykazał obecność delecji dużych obszarów w genomach. Jakie znaczenie ma to dla komórek bakteryjnych?
4. Bardzo proszę Doktoranta o odpowiedź na pytania postawione w recenzji przy omawianiu poszczególnych publikacji: (I) aby dokładniej określił swój udział w doświadczeniach na larwach *G. mellonella* oraz (II) o uściślenie swojego udziału w poszczególnych badaniach genetycznych.

Uwagi edytorskie.

Rozprawa doktorska zawiera liczne drobne uchybienia np. zamiast polskiego skrótu pz (par zasad) stosowany jest skrót angielski bp, literówki, nieprawidłowości stylistyczne zdań oraz braki tj. brak podania piśmiennictwa w pustym nawiasie na str. 14, brak chociażby krótkiego akapitu o systemach TCS, chociaż podane są w nazwie podrozdziału 1.1.2.4 (wchodzą też w skład ryciny 3), brak cytowania ryciny 9, pomyłki w tekście np. str. 25 i 26 pod publikacjami zamieniony jest tekst z punktacją i cytowalnością oraz brak oświadczenia promotora do publikacji nr 1. (zakładam że to przeoczenie przy składaniu pracy doktorskiej), które jednak nie wpływają na zawartość merytoryczną pracy.

Jednocześnie należy podkreślić, że działalność naukowa Doktoranta znacznie wykracza poza prezentowany cykl dwóch prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego do uzyskania stopnia doktora. W trakcie trwania studiów doktoranckich Pan P. Markwitz był współautorem 5 publikacji niezwiązanych ściśle z tematem pracy doktorskiej, w tym w czterech pracach oryginalnych z lat 2021 – 2023 o łącznym IF = 12,416 i 520 punktach MEiN oraz jednej pracy przeglądowej z 2018 r. o wartości 5 punktów ministerialnych. Uczestniczył również w dwóch międzynarodowych szkoleniach „3rd International Hand-ON phage biotechnology course” Braga w Portugalii i „EMBO workshop visuses of microbes 2018” we

Wrocławiu. Ponadto odbył 3-miesięczny staż naukowy w ramach projektu „Internship in genetic analysis programs” w Laboratory of Gene Technology Leuven w Belgii pod opieką prof. Rob Lavigne w ramach programu Erasmus+. Był także jednym z wykonawców grantu OPUS 2016/21/B/NZ6/01157.

Wniosek:

W oparciu o powyższą recenzję, stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska Pana mgr Pawła Michała Markwitz, oparta na zbiorze publikacji, spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora zgodnie z Ustawą „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art.179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne, Wydziału Nauk Biologicznych, Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Pawła Michała Markwitz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Warszawa, dnia 16.03.2023 r.

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
i Bioanalizy


dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy