



Wrocław, 1.02.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandra Szymczaka
pt. „Viral and bacterial components of the human microbiome: profiling in
selected gastrointestinal disease states”**

wykonanej w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we
Wrocławiu

Praca doktorska pana Aleksandra Szymczaka „Viral and bacterial components of the human microbiome: profiling in selected gastrointestinal disease states” została wykonana w Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, pod opieką naukową pani prof. dr hab. Krystyny Dąbrowskiej i prof. dr hab. Wojciecha Witkiewicza. Rozprawa doktorska dotyczy identyfikacji poprzez sekwencjonowanie mikrobiomu u pacjentów z wybranymi schorzeniami układu pokarmowego oraz jego wszechstronnej analizy, w szczególności korelacji mikrobiomu ze stanami chorobowymi układu pokarmowego. Niniejsza praca dotyczy ciekawego i istotnego naukowo problemu badawczego, wpisuje się w ekspertyzę i tematykę badawczą Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów i bazuje na wieloletnim bogatym doświadczeniu naukowym Zespołu.

Rozprawa doktorska przygotowana została w języku angielskim w formie klasycznej pracy doktorskiej, złożonej z wyczerpującej części wstępnej, opisu zastosowanej metodyki, przedstawienia wyników badań doktoranta oraz z dyskusji. Część z zaprezentowanych w pracy doktorskiej wyników została opublikowana w 2020 roku w czasopiśmie PeerJ [IF=3,06]. Rozprawa doktorska napisana jest w odpowiednich proporcjach i bazuje na eksperymentach angażujących głównie techniki biologii molekularnej (m.in. izolacja kwasów nukleinowych, przygotowanie bibliotek, sekwencjonowanie) oraz różnorodnych zaawansowanych narzędzi do obróbki danych i testów statystycznych. Wyniki prac mgr Aleksandra Szymczaka prezentowane były na czterech międzynarodowych konferencjach naukowych. Doktorant



ZAKŁAD INŻYNIERII BIAŁKA

ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 28 24
www.uni.wroc.pl

pełnił rolę wykonawcy w projekcie OPUS-15 NCN, co jest dorobkiem odpowiednim dla tego etapu kariery naukowej.

Odnosnie układu niniejszej pracy doktorskiej zdecydowanie zabrakło mi sprecyzowania celu tej pracy (najlepiej po rozdziale „Wstęp”). Przy braku jasno określonego celu trudno jest ocenić, czy przeprowadzone badania znacząco powiększyły dotychczasowy stan wiedzy oraz czy doprowadziły do rozwiązania założonego w ramach pracy zadania.

Część wstępna dotyczy tzw. konceptu ludzkiego mikrobiomu, który odzwierciedlać może stan zdrowia oraz potencjalnie informować o specyficznych chorobach. Doktorant bardzo ciekawie i merytorycznie poprawnie przedstawia problem badawczy, włączając do opisu interesujący kontekst historyczny badań nad ludzkim mikrobiomem. W tej części pracy doktorant przedstawił różnorodność ludzkiego mikrobiomu oraz skoncentrował się na specyficznym mikrobiomie układu pokarmowego. Rozdział wstępny zawiera też szczegółowy opis technik sekwencjonowania stosowanych do analizy zróżnicowania mikrobiomu. Ze względu na to, że dalsze etapy pracy doktorskiej nie koncentrują się na rozwoju nowej / modyfikacji istniejącej metodyki sekwencjonowania, w mojej opinii część ta mogłaby być znacznie bardziej zwięzła. Doktorant opisuje też w tej sekcji niezwykle interesujący koncept zależności pomiędzy genomem ludzkiego gospodarza a jego mikroorganizmami, szczególną uwagę poświęcając zależnościom pomiędzy polimorfizmem pojedynczego nukelotydu (z ang. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) a mikrobiomem. Ten podrozdział zawiera kilka bardzo ciekawych przykładów korelacji pomiędzy SNP gospodarza i obecnością specyficznych mikroorganizmów. Jednak, jak sam doktorant pisze (s. 41, rozdział 8.12) tego typu analizy są bardzo trudne ze względu na stopień skomplikowania zbieranych danych, a uzyskane wyniki są pod silnym wpływem wielu czynników, takich jak płeć, wiek, region zamieszkiwania przez pacjentów itp. W związku z tym chciałem poprosić doktoranta o przedstawienie jego opinii na temat dokładności prognostycznej identyfikowanych korelacji SNP/mikrobiom oraz o rozmiar ewentualnej grupy badawczej niezbędnej do uzyskania wiarygodnych korelacji.

Część metodyczna pracy przedstawiona jest w dokładny sposób, umożliwiającą ewentualne powtórzenie przeprowadzonych badań. W rozdziale 9 (przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania) minimalne stężenie kwasów nukleinowych po izolacji ustalono na 1-2 ng/ μ l. Odnosnie tej części chciałem zapytać doktoranta o minimalną ilość DNA danego mikroorganizmu konieczną do wykrycia jego obecności w próbce. Czy założona przez



doktoranta ilość/stężenie DNA umożliwia detekcję pełnego mikrobiomu, czy tylko najbardziej reprezentatywnych mikroorganizmów? Czy testowano zależność pomiędzy ilością wyizolowanego DNA a reprezentatywnością mikrobiomu?

Rozdział „Wyniki” zaczyna się od przedstawienia próby badawczej złożonej ze 148 próbek pobranych od pacjentów (91 kobiet i 56 mężczyzn) z różnorodnymi zaburzeniami układu pokarmowego skategoryzowanych według skali ICD (International Classification of Diseases). W związku z niezgodnością liczb chciałem się zapytać doktoranta czy od jednego pacjenta pobrano dwie próbki? Po przygotowaniu odpowiednich bibliotek z sukcesem przeprowadzono eksperymenty sekwencjonowania pod kątem identyfikacji mikrobiomu bakteryjnego i bakteriofagowego (Rozdział 10.2 – 10.4). W tej części brakowało mi informacji o ilości/składzie mikrobiomów zidentyfikowanych u poszczególnych pacjentów. W mojej opinii tabela zbiorcza lub wykresy informujące o wyżej wspomnianych parametrach znacząco wzbogaciłyby niniejszą pracę doktorską. W związku z tym prosiłbym doktoranta o związane przedstawienie danych dotyczących ilości zidentyfikowanych mikroorganizmów i ich zróżnicowaniu taksonomicznemu u różnych pacjentów. Czy porównywano elementy mikrobiomu pod kątem ilościowym (np. jak licznie występuje dany bakteriofag u poszczególnych pacjentów?). Sugerowałbym także w przyszłości lepszą obróbkę prezentowanych obrazów, gdyż w mojej opinii część rycin jest nieczytelnych (np. Figure 4 – Figure 6, zbyt małe czcionki, wiele paneli A, B, C...), a ich podpisy są zbyt ogólne i częściowo niedokładne (podpisy odnoszą się do jednego panelu np. A, podczas, gdy rycina zawiera wiele paneli A).

W kolejnej części pracy przedstawiono szereg analiz korelacji pomiędzy wybranymi stanami chorobowymi układu pokarmowego według ICD oraz SNPs genomu pacjentów, a ich mikrobiomem. Badania te doprowadziły do szeregu bardzo ciekawych odkryć, sugerujących m.in. korelację kilku chorób z obecnością specyficznych bakterii oraz bakteriofagów, wskazujących na zależność pomiędzy SNPs w genach kodujących komponenty odpowiedzi immunologicznej, a obecnością bakteriofagów z grupy Kayirus, Punavirus, Lambdavirus czy Teseptimavirus. Odnośnie tej części pracy prosiłbym doktoranta o odpowiedź na poniższe pytania:

1. W Rozdziale 10.5.1 dotyczącym korelacji pomiędzy zidentyfikowanymi bakteriami i chorobami według ICD pojawia się informacja o zastosowaniu testu porównującego pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą według ICD do osób zdrowych. Ponieważ w



ZAKŁAD INŻYNIERII BIAŁKA

ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 28 24
www.uni.wroc.pl

pracy nie znalazłem informacji o poborze materiału od kontrolnej grupy osób zdrowych prosiłbym o informację co stanowiło niniejszą grupę kontrolną i jaka była liczebność tej grupy.

2. Istotne korelacje pomiędzy składem bakteryjnym a ICD zidentyfikowano tylko dla trzech grup ICD, które zawierały największą liczbę pacjentów (K21-17 pacjentów, K29-64 pacjentów, R10.4-9 pacjentów). Zidentyfikowano również istotne korelacje pomiędzy obecnością bakteriofagów a ICD dla trzech grup ICD: K63-2 pacjentów, K29.6-2 pacjentów i K29-64 pacjentów). Jaka minimalnie liczna powinna być próba w przeprowadzanych badaniach korelacyjnych? Czy dwóch pacjentów jest wystarczająco liczną próbą do stwierdzenia korelacji? Czy liczebność grupy kontrolnej (osób zdrowych) jest porównywalna do tak mało licznych grup ICD?
3. Tabela 13 i Tabela 15 – zidentyfikowano korelacje pomiędzy SNPs w szeregu genów, głównie systemu odpornościowego a składem bakteryjnym i bakteriofagowym. Dla przykładu, dla IL-6 doktorant pisze, że zidentyfikowana zmienność genetyczna znajdowała się powyżej genu kodującego IL-6 i mogła np. wpłynąć na zmianę w strukturze ekspresjonowanego RNA IL-6 (s.103). Czy doktorant przeprowadzał lub też planuje przeprowadzić jakieś testy funkcjonalne mające na celu zrozumienie zaobserwowanych korelacji, np. pomiary poziomu RNA dla IL-6 oraz białka IL-6 w stosunku do osób bez tych mutacji?
4. Wyniki doktoranta sugerują na możliwość zmian w składzie bakteriofagowym pacjenta przy zachowaniu stałego składu bakteryjnego. Czy znane są przykłady bezpośredniego oddziaływania bakteriofagów na komórki ludzkie, szczególnie w kontekście patologicznym?
5. Chciałbym prosić też doktoranta o przedstawienie opinii dotyczącej potencjalnej wartości prognostycznej analizy zmian mikrobiomu pacjentów. Czy doktorant uważa, że zmiany w mikrobiomie są zazwyczaj konsekwencją przechodzonej choroby czy też mogą występować już przed manifestacją objawów choroby?

Podsumowując, przedstawioną do recenzji pracę doktorską mgr Aleksandra Szymczaka oceniam jako naukowo ciekawą i dotyczącą istotnej tematyki dla zdrowia człowieka, mającą oprócz znaczenia poznawczego także charakter potencjalnie aplikacyjny. Chciałbym w związku z tym serdecznie pogratulować zarówno



ZAKŁAD INŻYNIERII BIAŁKA

ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 28 24
www.uni.wroc.pl

Doktorantowi jak i Promotorom. Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Aleksandra Szymczaka spełnia wszystkie zwyczajowe i ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne. Wnoszę więc do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr Aleksandra Szymczaka oraz o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Łukasz Opaliński, prof. UWr