

Ocena osiągnięć naukowych dr n. techn. Natalii Szóstak w związku z Jej wnioskiem o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Stwierdzam, że przedstawiony mi do oceny wniosek dr Natalii Szóstak, ubiegającej się o stopień doktora habilitowanego, spełnia wymagania określone w Ustawie z 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”, art. 219 ust. 1 pkt 2, bowiem zawiera cykl *Rola mykrobioty jelitowej człowieka w homeostazie organizmu i patogenezie chorób nowotworowych* powiązanych tematycznie artykułów naukowych (H1-H5) opublikowanych w czasopismach naukowych, które w roku opublikowania artykułu w ostatecznej formie były ujęte w wykazie sporządzonym zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit.

Habilitantka zdobyła tytuł magistra biologii (spec. bioinformatyka) na Uniw. im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, a stopień doktora nauk technicznych (dyscyplina informatyka) na Politechnice Poznańskiej. Od 9 lat jest pracownikiem Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, obecnie jako adiunkt, ale ma też w życiorysie kilkumiesięczne, równoległe zatrudnienie jako st. specjalista ds. naukowo-technicznych w Inst. Informatyki Politechniki Poznańskiej.

Po uzyskaniu stopnia doktora, w ciągu 7 lat, opublikowała:

- 5 tematycznie powiązanych prac z lat 2022-2025 przedstawionych jako osiągnięcie naukowe, w tym 4 oryginalne prace badawcze (H1-H4) i jedna praca przeglądowa (H5), o łącznie IF=34,5, p-ktach MNiSW=720, liczbie cytowań=106 (wg WoS z 6.12.2025 r.),
- 7 prac oryginalnych (N8-N14) o łącznie IF=43,2, p-ktach MNiSW=720, liczbie cytowań=31 (wg WoS z 6.12.2025 r.),

(a także kolejne cztery prace po złożeniu wniosku o nadanie st. dra hab.).

W zbiorze tematycznie powiązanych prac podjęto „gorący” dziś temat zależności ludzkiego zdrowia i odporności immunologicznej od mikrobioty jelitowej. Temat nie jest nowy (przeszczepy kału były stosowane w tradycyjnej medycynie chińskiej i starożytnej Grecji, a w XVII w. van Leeuwenhoek obserwował bakterie w próbkach kału, cyt. za doi:

10.3390/pathogens11121540), a współczesna nauka podjęła go w latach 1960-70. Obecnie szacuje się, że w ciele 70-kg człowieka jest ok. 3×10^{13} ludzkich komórek i ok. $3,8 \times 10^{13}$ komórek bakteryjnych (ok. 200 g), w większości bytujących w jelicie grubym (doi: 10.1371/journal.pbio.1002533). Mimo niemal równoważnej liczby komórek ludzkich i bakteryjnych, różnorodność zasiedlających nas bakterii sprawia, że łączna liczba bakteryjnych genów jest ≥ 1000 -krotnie wyższa niż genów ludzkich (doi:10.1016/j.chom.2019.07.008), stąd określenie, że tworzą „nasz drugi genom”. Na dodatek poszczególni ludzie są w ok. 99,9% identyczni pod względem genomu, ale mogą różnić się od siebie w 80–90% pod względem mikrobiomu (za doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x). Nie tylko jako gatunek od tysięcy lat współżyjemy z mikrobiotą, jej obecność w płynie owodniowym i pierwszej smółce nawet dzieci urodzonych przez cesarskie cięcie świadczy o współbytowaniu już w czasie życia płodowego (doi: 10.3389/fmicb.2019.01124; doi: 10.1002/imt2.173). Wpływ bakterii jelitowych na nasze zdrowie, zarówno fizyczne (począwszy od trawienia, poprzez odporność immunologiczną, po ryzyko chorób metabolicznych) jak i psychiczne (poprzez oś jelitowo-mózgową – wpływ na produkcję neuroprzekaźników, odpowiedź na stres, stany depresyjne i lękowe) był wielokrotnie badany i potwierdzany. Jest jedno „ale” – mikrobiotę jelitową tworzą w przeważającej części bakterie, ale znajdują się w niej również wirusy pro- i eukariotyczne, grzyby, protisty i archeony, o ich roli wiemy niewiele. Tę lukę zaczyna wypełniać osiągnięcie naukowe Habilitantki.

Cytowana 37-krotnie praca H1, rozpoczynająca cykl składający się na osiągnięcie naukowe, po raz pierwszy w badaniach mikrobioty ustala

- (i) standard metody przygotowywania próbek kału do izolacji kwasów nukleinowych mikrobioty (dokładniej optymalny, spośród 3 badanych, czas homogenizacji próbek, najlepiej zachowujący wyjściowe proporcje bakterii G+ i G–),
- (ii) który z 3 najczęściej używanych zestawów odczynników do sporządzenia bibliotek NGS daje najbardziej jednolite i powtarzalne wyniki – okazał się nim oparty o tagmentację zestaw Nextera (Illumina),
- (iii) że kombinacja narzędzi informatycznych Kraken2/Bracken daje bardziej kompletne odczyty niż często stosowana wtedy (r. 2022) alternatywa MetaPhlAn2.

Imponująca jest: rozciągłość projektu (sam fakt objęcia całego workflow wskazuje na projekt złożony i pracochłonny), duża liczba wariantów testowanych eksperymentalnie (skonstruowano i zsekwencjonowano 13 bibliotek NGS! – nie czas tu na ich dokładne omówienie, ale materiałem do ich stworzenia były i warianty próbek kału od ochotników i kontrolne mieszanki typowej „mock community” bakterii jelitowych i DNA), czasochłonność i wysoki poziom kompetencji analiz informatycznych i statystycznych. Nic dziwnego, że jego wykona-

nie wymagało skoordynowanej pracy kilkunastu naukowców z 4 laboratoriów, a to poświadcza, że Habilitantka posiada umiejętność współpracy i jej organizowania. Uzyskane wyniki pokazują, że nawet "drobne" decyzje metodologiczne mogą zmienić obraz mikrobiomu - co dotychczas było często ignorowane. Dokonane przez dr Szóstak ustalenie kompletnych, zoptymalizowanych warunków dla całego ciągu pracy (od pobrania próbki do analizy danych), umożliwia porównywanie wyników pomiędzy różnymi laboratoriami i badaniami. Ich stosowanie prowadzi do zredukowania wariancji technicznej: dzięki precyzyjnej metodologii można mieć pewność, że obserwowane różnice w składzie mikrobiomu to faktycznie różnice biologiczne porównywanych próbek, co w przypadku badań klinicznych, porównawczych i meta-analiz mikrobioty może przyspieszyć odkrywanie realnych powiązań między mikroorganizmami zasiedlającymi nasz organizm a zdrowiem/chorobami, podatnością na określone choroby i skutecznością zastosowanej terapii.

Artykuł H2 opisujący asocjację 53 „czynn timer gospodarza” (dotyczących demografii, stylu życia, zdrowia, BMI, stosowania probiotyków, chorób, a także typu diety czy konsumpcji konkretnych kategorii pokarmów) ze składem mykobioty u 923 polskich ochotników jest wynikiem współpracy 6-ośrodkowej, co ponownie dowodzi i wielowątkowości realizowanego projektu i umiejętności współpracy Habilitantki. Jest to pierwsze tak duże badanie mykobioty w populacji nieazjatyckiej, na dodatek uwzględniające tak wiele czynników. Nic dziwnego, że opublikowana wiosną 2023 r. praca ma już 39 cytowań. Jak już wspomniano, większość badań mikrobiomu jelitowego skupia się na bakteriach, zaś ta w centrum uwagi stawia grzyby i udowadnia, że ich skład nie jest stały ani losowy i może być skorelowany z naszą kondycją. Występowanie niektórych gatunków grzybów w większości badanych prób przybliża nas do pozytywnej odpowiedzi na pytanie o istnienie rdzeniowej mykobioty człowieka. Habilitantka w autoreferacie opisuje badaną kohortę jako zdrowych ochotników, co chyba nie do końca jest poprawne, skoro w H2 opisano zmiany składu mykobioty m.in. u osób z chorobami autoimmunologicznymi, przewodu pokarmowego, depresją, czy u osób otyłych. Na dodatek są to informacje istotnie zwiększające doniosłość uzyskanych wyników. Pochodzące z autoreferatu zdanie: „Równocześnie badania potwierdziły niski udział mykobioty w całościowym mikrobiomie jelitowym - w przeanalizowanych przeze mnie próbkach mykobiota jelitowa stanowiła około 1% całej mikrobioty (Nash i in. 2017).” niejednoznacznie podaje kto ustalił tę proporcję – w oryginalnej pracy jest podobne zdanie (paragraf *Core mycobiome* dyskusji), natomiast nie ma takich danych nigdzie w wynikach. Także z autoreferatu pochodzi „Stosując opisaną wyżej zoptymalizowaną strategię...”, podczas gdy realizując badania opisane w H2 użyto dwu z ustalonych w H1 standardów, natomiast z niewyjaśnionych przyczyn zmieniono zestaw do przygotowania bibliotek NGS. Standard homogenizacji próbek w pracy H1 ustalano

badając bakterie jelitowe, rodzi się jednak pytanie, czy jest on również optymalny w przypadku izolacji DNA grzybów, których ściana komórkowa jest odmienna niż u bakterii.

Mimo że w H2 badano jedynie korelacje czynników gospodarza ze składem mykrobioty, a nie przyczynowość, oraz że ze względu na mały udział grzybów w mikrobiomie gatunki rzadkie mogły nie zostać wykryte, uważam tę pracę za bardzo istotną i inspirującą dla przyszłych badań klinicznych, interwencji dietetycznych czy terapii ukierunkowanych na mykrobiotę jelitową. O wielowątkowości pracy, ilości zawartych danych i ich analiz, niech świadczy to, że bywa, że dwa ekrany to za mało dla czytelnika, bowiem są zdania z trzema odnośnikami – do ryciny w tekście, do tabeli w suplemencie i do ryciny w innym suplemencie, przy czym opisy dodatkowych rycin są gdzie indziej niż same ryciny.

(Poza swoją rolę zasugeruję, nie Habilitantce, lecz wszystkim autorom, że warto by zamieścić erratę tego artykułu – np. w opisie w tekście ryciny S1E mowa o kierunku zmian częstości pewnych gatunków grzybów u wegetarian w porównaniu do osób o innych dietach, co rycina pokazuje, ale kierunek zmian jest odwrotny; zgodnie z opisem ryciny 5 jej fragment B ma pokazywać różnorodność mykrobioty u pijących vs niepijących alkohol, a pokazuje u słodzących vs niesłodzących; w tekście mowa o zmianie mykrobioty u osób spożywających napoje gazowane każdego tygodnia, ale wskazana rycina S5B ilustruje zmiany u deklarujących „monthly consumption”).

Przed opublikowaniem pracy H3 (o 14 cytowaniach) nie było dobrze udokumentowanych badań korelujących dysbiozę mykrobioty jelit z ryzykiem nowotworów, konkretnie czerniaka, czy z reakcją na immunoterapię – w tym przypadku anti-PD-1. Praca wykazuje, że pacjenci z czerniakiem mają zmieniony skład grzybowej części mikrobioty jelitowej w porównaniu do osób zdrowych. Co więcej, pewne cechy mykrobioty korelowały z progresją choroby czy reakcją na terapię anti-PD-1. Sugeruje to, że grzyby jelitowe mogą być biomarkerami predykcyjnymi skuteczności immunoterapii. To z kolei mogłoby mieć realne przełożenie kliniczne - nie tylko na personalizację immunoterapii, ale również na modulację diety, stosowanie probiotyków czy interwencji mikrobiotycznych w celu przesunięcia mykrobioty pacjenta do profilu osób pozytywnie reagujących na terapię. Nowatorstwem technologiczno-koncepcyjnym H3 jest łączenie onkologii, immunologii, mikrobiologii, biologii molekularnej i bioinformatyki, to rzadko spotykany, multidyscyplinarny projekt. Wskazuje on, że profilowanie mikrobioty (bakterie, grzyby, ...) może być ważnym elementem przyszłych badań translacyjnych i klinicznych. Jest też bardzo prawdopodobne, że zainicjuje badania nad mykrobiotą w innych typach nowotworów, w kontekście ich immuno-, chemio- i radioterapii. Przedstawione w pracy H3 wyniki rodzą cały szereg nowych pytań – o związek przyczynowo-skutkowy pomiędzy

dysbiozą jelitowej mykrobioty z zachorowaniem na czerniaka, o zależności pomiędzy mykobiota a bakteriami jelitowymi w tej chorobie, jej przebiegu czy terapii, wreszcie jakie metabolity grzybowe sprzyjają danej terapii, a jakie zwiększają jej toksyczność. [Na marginesie dodam, że w opublikowanej wersji również tej pracy nie ustrzeżono się usterek; np.: przywołanie nie tej ryciny czy „czeski błąd” w zdaniu ”... the maximum number of species identified in a melanoma sample was much higher than in any sample in the healthy cohort (11 vs. 22 ...).]

Praca H4, znowu dzięki wieloośrodkowości i wielowątkowości, jest nowatorska pod niejednym względem:

- (i) połączenia analizy mykrobioty jelitowej z immunofenotypem krwi u pacjentów z czerniakiem – to pierwsza praca, która łączy dane o grzybach jelitowych z pomiarami limfocytów (np. podtypów T-komórek) w kontekście immunoterapii,
- (ii) połączenia meta-genomiki z cytometrią przepływową, co pozwala na poszukiwanie korelacji między mikrobiomem a realnym „stanem układu immunologicznego” w organizmie;
- (iii) skupienie się na pacjentach leczonych inhibitorami punktu kontrolnego (anti-PD-1) sprawia, że nie są to tylko obserwacje ogólne, ale wyniki istotne dla translacyjnego podejścia w onkologii,
- (iv) pokazanie, że mykobiota jelitowa koreluje nie tylko ze skutecznością terapii, co pokazano już w H3, ale także z cytologicznymi zmianami parametrów systemu immunologicznego, otwiera nowy kierunek badań – dotychczas mikrobiotę w immunoterapii oceniano jedynie pod kątem bakterii,
- (v) jeśli korelacje się potwierdzą, specyficzne wzorce grzybów + profil limfocytów mogą być wykorzystane do przewidywania odpowiedzi na immunoterapię.

Oparcie się na danych z kohorty chorych (a nie jedynie badań *in vitro* czy na zwierzętach) znacząco zwiększa kliniczne znaczenie odkryć i ich potencjalną translacyjność. Zastrzeżenie budzi znajdujące się w autoreferacie stwierdzenie jakoby „Ponownie analizie poddawane były dane zebrane w trzech punktach czasowych: przed rozpoczęciem terapii (BT), po 3 miesiącach leczenia (T3) oraz po 12 miesiącach leczenia (T12)...”, podczas gdy w H4 analizowano jedynie dwa punkty czasowe BT i T3. Odnosnie oryginalnej pracy mam m.in. zastrzeżenie dotyczące sekcji Materiały i metody – paragrafy od *Metagenomic sequencing* po *Fungal community profiling* są identyczna kopią tychże z poprzedniej pracy, moim zdaniem wystarczyłoby stwierdzenie „jak opisano w H3”.

Opublikowana w 2023 r. praca H5 zawiera uporządkowany przegląd 128 artykułów badawczych o zmianach w składzie mykrobiomu u pacjentów z chorobami wątroby, ma 15

cytowań. O nowości badań nad tym zagadnieniem niech świadczy fakt, że prawie wszystkie (z wyjątkiem bodajże 7) omawiane prace ukazały się w XXI wieku. H5 stanowi syntetyczne zebranie, ze wskazaniem luk, wiedzy o składzie grzybów jelitowych w 5 schorzeniach wątroby, a także ich zastosowania jako probiotyków w tego typu chorobach. Wskazanie co wymaga dalszych badań jest ważne w szybko rozwijającej się dziedzinie, bo pozwala zidentyfikować kierunki dla przyszłych badań. Jak to praca przeglądowa nie odkrywa nowego mechanizmu, ale stanowi strategicznie ważny krok – może stymulować rozwój badań nad rolą grzybów jelitowych w chorobach wątroby.

We wszystkich publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego dr Szóstak figuruje jako osoba, która przeprowadziła analizę bioinformatyczną i statystyczną, analizę i dyskusję wyników, przygotowała ryciny i manuskrypt. To imponujące, zwłaszcza, że moim zdaniem dyskusje są wyśmienicie napisane, a przecież konfrontują otrzymane wyniki z literaturą, w której nacisk był położony nie na bioinformatykę lecz biologiczno-medyczne aspekty badanego tematu. Szacunek dla będącej bioinformatykiem dr Szóstak.

Omawiając pozostałe osiągnięcia naukowe Habilitantki chcę zwrócić uwagę na te, które mają duży oddźwięk wyrażony liczbą cytowań, są to jej pierwsze prace opublikowane przed doktoratem (N1-N4).

Czterdzieści jeden cytowań, ma jedna z pierwszych publikacji N2, w której zidentyfikowano *in silico* nowy 12-nukleotydowy motyw w 3'UTR mRNA zawartych w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EV) wydzielanych przez komórki wątrobowe, a następnie, zweryfikowano to eksperymentalnie przyłączając 3'-UTR zawierający ten motyw do mRNA kodującego lucyferazę i pokazano jego wydajniejsze ładowanie do EV. Wykazano więc, że ładowanie mRNA do EV nie jest w pełni losowe, ale może być aktywne i zależne od sygnałów sortujących, co do dziś jest znaczące, bowiem mechanizmy selektywnego pakowania RNA do EV są ciągle słabo poznane. Była to pierwsza praca nie tylko dotycząca EV w komórkach nienowotworowych, ale też otwierająca drogę do celowego projektowania mRNA, które chcemy „wysłać” przez EV (np. w terapii, biomarkerach, komunikacji między-komórkowej).

Cytowana 34 razy praca N4 dotyczy hypercyklu, stworzonej w 1971 r. przez noblistę M. Eigena, abstrakcyjnej hipotezy cząsteczek samoreplikujących się w autokatalitycznym zamkniętym cyklu, której poparciem było odkrycie 11 lat później rybozymów. N4 jest wartością referencyjną i syntetyczną, łączy klasyczne idee hypercyklu z nowoczesną perspektywą obliczeniową. Daje zarówno kompletny przegląd, jak i krytyczną ocenę mocnych i słabych stron koncepcji. Dla kogoś zainteresowanego teorią pochodzenia życia, ewolucją molekularną,

biologią teoretyczną albo modelowaniem dynamicznym – będzie pracą fundamentalną. Jednocześnie jasno pokazuje, że hypercykl to ciągle nieudowodniona hipoteza.

Praca N3 (30 cytowań) przedstawia nową *in silico* metodę do oceny struktur drugorzędowych RNA uwzględniającą pary niekanoniczne, co istotne, bo zwiększa to realność i biologiczną trafność przewidywanych struktur. Dzięki temu otrzymuje się bardziej realistyczny model struktury RNA, co może być istotne dla przewidywania struktur, analizy funkcjonalnej RNA, a także dla projektowania RNA np. w kontekście terapii z użyciem RNA czy regulacji genów. Metoda ta poszerza narzędziownik bioinformatyki RNA – nie tylko analizuje sekwencję czy strukturę podstawową, ale uwzględnia subtelności strukturalne.

W momencie publikacji pracy N1 (2012) liczba narzędzi do analizy struktur białek była dużo większa niż do RNA. Opisany w N1 program RNAmapp2D był jednym z pierwszych narzędzi do analizy struktur RNA i kompleksów RNA-białko, na dodatek łatwym, powszechnie dostępnym i działającym na wszystkich systemach operacyjnych komputerów. To praca metodyczna, nie dostarcza nowej hipotezy badawczej, natomiast umożliwia i przyspiesza badania, a jej znaczenie może być niedoszacowane (19 cytowań).

Do pewnego stopnia kontynuacją czy rozszerzeniem tematu podjętego w omawianej już pracy N4 jest pięć in. artykułów nt. „świata RNA” (N5-N9). Nie mogę się wypowiadać merytorycznie na temat ich bioinformatycznej zawartości, ale dostrzegam, że sumarycznie stanowią prawdziwe ćwiczenie pluralizmu metodologicznego – łączą matematyczne modele, symulacje, analizy koncepcyjne i filozoficzne podejście do życia – wszystko (prawie wszystko?), co jest potrzebne, by lepiej zrozumieć problem genezy życia.

Habilitationka nie omawia pracy N10, pójdę w jej ślady.

Trzy prace N11-N13 pokazują, że kluczową rolę w kancerogenezie lub stabilności genomu odgrywają nie tylko mutacje sekwencji kodujących, ale także mutacje w regulatorowych regionach niekodujących (N12: w 50% przypadków raka podstawnokomórkowego mutacje zachodzą w UTRach, intronach), ich polimorfizmy (N11: polimorfizm rs12976445 w genie kodującym miR-125a może poprzez zmianę struktury pre-miR wpływać na efektywność dojrzewania tego miRNA, który z kolei reguluje ekspresję genu receptora HER2 ważnego w diagnostyce i leczeniu nowotworów piersi.), czy potranskrypcyjne modyfikacje [N13: o transpozycji L1, częstej przyczyny kancerogenezy, nie decyduje ilość transkryptów tego retropozonu, lecz dynamika długości i urydlacji ogona poli(A)]. W praktyce oznacza to, że badania genetyczne nowotworów nie powinny ograniczać się tylko do sekwencjonowania egzomów,

bo można przeoczyć istotne zmiany regulacyjne. Takie prace przyczyniają się do rozwoju nowoczesnych biomarkerów i spersonalizowanych terapii.

Z kolei artykuł N14 poświęcony przewidywaniom struktury RNA w oparciu o uczenie maszynowe nawiązuje do tematyki podjętej w N3, zaś o znaczeniu struktury RNA przekonują nas m.in. konkluzje pracy N11.

Podsumowując chcę raz jeszcze podkreślić wielotorowość i wielośrodkowość badań, prowadzonych przez dr Szóstak, łączenie w nich, niejednokrotnie nowatorskie, metod bioinformatyki z metodologią innych dziedzin nauki. Jej prace pokazują, a czasem tworzą, nie tylko metody badania struktur RNA i kompleksów rybonukleoproteinowych, mykobioty i ich powiązań z naszym zdrowiem, chorobami, odpowiedzią immunologiczną i skutecznością terapii, ale też ich praktyczne zastosowanie jako markerów w diagnostyce, przewidywaniu zapadalności na choroby i skuteczności terapii. Bardziej teoretyczne prace dot. początków życia to także wynik wielodyscyplinarnego podejścia i takiejże współpracy. Habilitantka ma też na koncie osiągnięcia dydaktyczne i organizacyjne oraz sporą listę nagród, wyróżnień i stypendiów.

Wskazane do oceny osiągnięcie naukowe Habilitantki stanowi w mojej opinii znaczący wkład w rozwój nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych. Przedkładam zatem Komisji Habilitacyjnej wniosek o nadanie dr Natalii Szóstak stopnia doktora habilitowanego.

*Podpisuje
z Cencert*



Podpisany elektronicznie przez
Anna Maria Goc
09.12.2025
15:38:33 +01'00'