

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha Łuczaka**

**pt. „Opracowanie zestawu polimorficznych markerów STR do genotypowania ludzi oraz jego wdrożenie do analiz pokrewieństwa w dalszych relacjach rodzinnych”**

### **Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność**

Dynamiczny rozwój genetyki molekularnej umożliwił znaczące poszerzenie możliwości wykorzystania genetyki sądowej. W związku z powyższym do dyspozycji laboratoriów jest kilkadziesiąt markerów typu STR zlokalizowanych zarówno na chromosomach autosomalnych jak i chromosomach płci. Panel ten uzupełniają badania DNA mitochondrialnego. Zaletą markerów typu STR jest zarówno sposób dziedziczenia zgodnie z prawami Mendla, wysoka polimorficzność, duża liczba tych sekwencji w genomie jak również wysoka częstość mutacji. Dzięki temu badania genetyczne stały się ważnym narzędziem w procesie wykryczym sprawców przestępstw, w sprawach o ustalenie pokrewieństwa czy identyfikacji ofiar katastrof masowych. Należy również pokreślić ważną rolę genetycznych baz danych, które są powszechnie wykorzystywane przez organy ścigania i wymiaru sprawiedliwości. W praktyce laboratoria wykonujące badania z obszaru genetyki sądowej mają do dyspozycji szereg komercyjnych zestawów odczynników produkowanych przez firmy na całym świecie. Zestawy te charakteryzują się różną liczbą i doбором STR. W związku z powyższym niezbędne było ustalenie takiej liczby loci STR, które pozwolą na międzynarodowe porównania profili DNA. W Europie wypracowano tzw. Europejski Zestaw Standardowy (ESS) a USA standardowy zestaw loci CODIS.

Warto zauważyć, że w genetyce sądowej cały czas dominuje analiza polimorficznych markerów typu STR. Takie podejście wynika z faktu, że implementacja do praktyki laboratoryjnej nowych technologii opartych na sekwencjonowaniu nowej generacji napotyka w pierwszej kolejności na bariery finansowe.

W tym kontekście wybór tematu rozprawy doktorskiej należy uznać za trafny i merytorycznie uzasadniony. Szczególnie, że praktycznym efektem pracy będzie implementacja nowego zestawu odczynników do praktyki laboratoryjnej nazwanego przez Doktoranta Kinfinder.

### **Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

Przedłożona do oceny praca zawiera 6 rozdziałów.

W rozdziale pierwszym Doktorant przedstawił charakterystykę mikrosatelitanych loci genomu człowieka wskazując obszary zastosowania STR nie tylko w genetyce sądowej ale również w badaniach populacyjnych w hodowli roślin zwierząt czy w ochronie zagrożonych gatunków objętych konwencją waszyngtońską. W kolejnej części wstępu Doktorant skoncentrował się na zastosowaniu analizy loci STR w badaniach biologicznego pokrewieństwa zwracając uwagę na trudności w badaniach w dalszych relacji rodzinnych. Ostatni część wstępu dotyczy możliwości wykorzystania alternatywnych metod analizy DNA np. sekwencjonowaniu nowej generacji czy analizy pojedynczych nukleotydów (SNP) z wykorzystaniem mikromacierzy. Doktorant podkreślił, że alternatywne metody mają wysoką wartość informatywną ale ze względu na koszty nie są powszechnie stosowane.

W rozdziale drugim, Doktorant sformułował cel pracy i cele cząstkowe:

Celem niniejszego doktoratu wdrożeniowego było opracowanie nowej metody do badania biologicznego pokrewieństwa w dalszych relacjach rodzinnych. Ta nowa metoda o nazwie Kinfinder miała zostać wdrożona w Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed, w oparciu o reakcję multipleks-PCR oraz elektroforezę kapilarną. Takie podejście pozwoliłoby na stosowanie metody bez konieczności ponoszenia dodatkowych nakładów inwestycyjnych w nową aparaturę, przestrzeń laboratoryjną oraz w szkolenia pracowników.

Cel pracy został uzupełniony o następujące cele cząstkowe:

- zidentyfikowanie w genomie człowieka najbardziej polimorficznych loci STR,
- przeprowadzenie badań przesiewowych w celu oszacowania heterozygotyczności wytypowanych loci STR oraz rozpiętości ich alleli w populacji polskiej,
- zaprojektowanie dwóch reakcji multipleks-PCR umożliwiających równoczesną amplifikację 2 x 25 loci STR w jednym procesie analitycznym,
- opracowanie drabiny allelicznej,
- opracowanie odczynnika do kalibracji spektralnej analizatora genetycznego,
- ewaluację metody Kinfinder przez jej porównanie z wiodącym zestawem komercyjnym,

- wdrożenie metody do rutynowej pracy Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed w badaniach pokrewieństwa w różnych relacjach rodzinnych.

W rozdziale trzecim został scharakteryzowany materiał i metody. Do badań wykorzystano w sumie 200 izolatów DNA pobranych od zanonimizowanych klientów Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed oraz 3 pracowników tego laboratorium. Próbki DNA izolowano z wymazów z jamy ustnej. Dawcy wyrazili pisemną zgodę na wykorzystanie ich materiału genetycznego do badań naukowych. W tej części rozprawy Doktorat szczegółowo opisał kolejne etapy działań poczynając od identyfikacji nowych polimorficznych loci STR zarówno z dostępnych baz danych jak danych literaturowych. Do projektowania starterów wykorzystano programy i narzędzia bioinformatyczne: Primer 3, primerBlast oraz Blast. Kolejne etapy obejmowały przygotowanie puli matrycowego DNA testowanie polimorfizmu loci STR metodą PCR a następnie amplifikację w dwóch multipleksowych reakcjach PCR. Amplifikacja obejmowała 50 loci STR. Elektroforezę produktów multipleksowej reakcji PCR przeprowadzono przy użyciu 16-kapilarnego sekwenatorem 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems). Dodatkowo wykonano sekwencjonowanie nowo opracowanych loci STR co miało pozwolić na weryfikację poprawności amplifikacji, Do sekwencjonowania wybrano amplikony od osób homozygotycznych. Końcowymi etapami procesu badawczego było szacowanie heterozygotyczności loci STR, analiza statystyczna ukierunkowana na analizę wyników badań pokrewieństwa oraz przyjęcie schematu nazewnictwa nowo scharakteryzowanych loci STR.

Rozdział czwarty zatytułowany Wyniki zawiera dziewięć podrozdziałów. Treść rozdziału jest ilustrowana 14 tabelami i 26 rycinami. W podrozdziale pierwszym Doktorant zaprezentował listę wybranych STR spełniających założone kryteria. Tabela nr 2 zawiera ogółem 183 STR z podaniem najważniejszych informacji charakteryzujących poszczególne loci. Kolejny podrozdział dotyczył testowania zaprojektowanych starterów do amplifikacji loci STR z wykorzystaniem metody M-13 -tailing. Analiza wyników badań spowodowała zmniejszenie liczby STR do 172. Trzeci etap to szacowanie heterozygotyczności wybranych loci STR w populacji Polski. Uzyskane częstości porównywano z wynikami badań znajdujących się w pracy Ossowski i in. (2017). Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorant wybrał 50 STR, które zostały ostatecznie zakwalifikowane do przygotowania nowego zestawu Kinfinder. W kolejnym podrozdziale przedstawiono wyniki dwóch multipleksowych reakcji PCR z wykorzystaniem 50 loci STR. Kluczową kwestią było takie zaprojektowanie reakcji multipleks PCR aby pomiędzy amplikonami poszczególnych loci (znakowanych tym samym barwnikiem fluorescencyjnym w jednej reakcji PCR) istniały przerwy wielkości 10-20pz.

Takie zaprojektowanie zestawu pozwala na zidentyfikowanie rzadkich niezidentyfikowanych alleli. Warty podkreślenia jest pomysł włączenia do obu zestawów po jednym loci z systemu CODIS co ma umożliwić dodatkową kontrolę procesu badawczego. Następnym etapem była analiza czułości metody Kinfinder. Z uzyskanych badań wynika, że pełen profil DNA w reakcjach PCR uzyskano dla izolatów zawierających 0,125 ng DNA. Następnie Doktorat zaprezentował na 5 rycinach drabiny alleliczne wybranych loci STR na których znajdują się amplikony od 13 do 21 alleli. W celu weryfikacji poprawności reakcji PCR właściwych loci STR przeprowadzono sekwencjonowanie metodą Sangera. Wyniki sekwencjonowania przedstawiono na pięciu elektroforegramach. Przedostatni podrozdział omawia wyniki analizy informatywności metody Kinfinder w odniesieniu do pokrewieństwa dla różnych relacji rodzinnych. Symulacje trzech stopni pokrewieństwa. Biologiczne pokrewieństwo analizowano poprzez obliczenie ilorazu wiarygodności LR. W ostatnim dziesiątym zaprezentowano trzy przykłady zastosowania zestawu w praktyce laboratoryjnej. Rozdział piąty obejmuje dyskusję. Rozdział ten składa się z siedmiu podrozdziałów. W pierwszej kolejności Doktorat opisał kryteria wyboru loci STR do badań pokrewieństwa wskazując na cztery, jego zdaniem, kluczowe parametry wyboru potencjalnych loci STR do tworzonego zestawu. Wybór obejmował loci STR o długości motywu tandemowo powtórnego od 3 do 5 par zasad, o maksymalnej heterozygotyczności wybranych loci. Kolejnym kryterium było wykluczenie z tworzonego zestawu sekwencji zawierających mono i dinukleotydowych w sekwencjach flankujących oraz sekwencji wielokrotnie powtórzonych w genomie w sekwencjach flankujących locus STR. Ostatnim kryterium wyboru locus była możliwie mała rozpiętość długości sekwencji pomiędzy najkrótszym a najdłuższym allelem danego locus. W kolejnym podrozdziale omówiono wyniki badań przesiewowych wybranych loci STR koncentrując się na weryfikacji heterozygotyczności wyselekcjonowanych loci STR. Podrozdział trzeci odnosił się do metodyki tworzenia zestawu Kinfinder umożliwiającego przeprowadzenie dwóch reakcji multipleks PCR z jednoczesną analizą 25 loci STR w każdej reakcji. Czwarty podrozdział nosi tytuł „Sekwencje opracowywanych loci STR” i odnosił się do nazewnictwa dla wszystkich analizowanych alleli. Podrozdział piąty charakteryzował częstości występowania alleli 50 STR w populacji polskiej. Badania potwierdziły wysoką heterozygotyczność badanych loci. Podrozdział szósty prezentuje wyniki symulacji badań pokrewieństwa z wykorzystaniem zestawu Kinfinder porównując wyniki z zestawem GlobalFiler™ PCR Amplification Kit firmy Thermo Fisher Scientific. Ostatni podrozdział opisuje wdrożenie metody Kinfinder do rutynowej pracy laboratoryjnej.

Rozdział szósty zawiera wnioski, które zostały przedstawione w dziesięciu punktach:

Baza danych projektu 1000 Genomes zawiera istotne informacje odnośnie do polimorficznych loci STR, jednakże dane są niepełne. Baza zawiera pełne informacje na temat krótkich loci STR, długie sekwencje są nieobecne lub dane są tym silniej zniekształcone im locus zawiera dłuższe allele.

Baza WebSTR (<https://webstr.ucsd.edu/>) jest doskonałym narzędziem do wyszukiwania potencjalnie polimorficznych sekwencji STR w genomie ludzkim.

Genom człowieka zawiera dużą liczbę polimorficznych loci STR, jednak elementy ich sekwencji flankujących, takie jak obecność: sekwencji wielokrotnie powtórzonych w genomie, sprzężonych sekwencji zawierających powtórzenia mono- i dinukleotydowe oraz sekwencji wykazujących wysoki polimorfizm w populacji utrudniający zaprojektowanie starterów może utrudniać lub nawet uniemożliwiać wykorzystanie tych loci w badaniach pokrewieństwa.

Opracowana w tej rozprawie doktorskiej, nowatorska metoda badań przesiewowych umożliwia szybką selekcję polimorficznych loci STR zawierających powtórzenia tri- tetra- i pentanukleotydowe. Ze względu na uniwersalne właściwości sekwencji STR, metoda ta może być wykorzystana do testowania polimorfizmu loci STR u innych organizmów w trakcie opracowywania analogicznych metod badania pokrewieństwa zwierząt hodowlanych, identyfikacji odmian roślin i in.

Opracowanie reakcji multiplex PCR jest trudnym wyzwaniem rosnącym wraz z liczbą produktów generowanych w reakcji, jednak stworzenie reakcji do jednoczesnej analizy 25 loci STR jest możliwe.

Średnia heterozygotyczność nowo scharakteryzowanych loci STR wykorzystywanych w metodzie Kinfinder w populacji polskiej wynosi 88,07% i jest znacząco wyższa niż heterozygotyczność loci CODIS wynosząca 78,95%.

Sekwencjonowanie alleli STR sugeruje, że przynajmniej część z nich oprócz polimorfizmu długości sekwencji wykazuje także polimorfizm sekwencji nukleotydowej.

Nowo opracowana metoda analizy pokrewieństwa Kinfinder wykorzystująca analizę 50 wysoce polimorficznych loci STR cechuje się bardzo wysoką informatywnością w badaniach pokrewieństwa.

Metoda Kinfinder wykorzystuje analizę autosomalnych loci STR, a przez to nie ma ograniczeń związanych z analizą chromosomów płci, wobec czego można ją wykorzystać w badaniach pokrewieństwa w dowolnej relacji rodzinnej.

Wdrożenie metody Kinfinder w laboratoriach genetycznych jest bezproblemowe, gdyż metoda wykorzystuje powszechnie stosowaną w laboratoriach genetyczno-sądowych technologię reakcji PCR w multipleksie w połączeniu z elektroforezą kapilarną.

Z obowiązku Recenzenta wynika konieczność omówienia spostrzeżeń dotyczących rozprawy: Doceniając zaangażowanie Doktorantka w przygotowaniu niniejszej dysertacji chciałbym zwrócić uwagę na kilka kwestii.

1. We wstępie Doktorant obszernie charakteryzuje sekwencje mikrosatelitarne natomiast brakuje szerszego odniesienia do komercyjnych zestawów STR rutynowo stosowanych w praktyce laboratoryjnej. Moim zdaniem krytyczna analiza ich możliwości identyfikacyjnych dobitniej wskazywałaby na celowość opracowania nowego zestawu odczynników szczególnie w badaniach pokrewieństwa w dalszych relacjach rodzinnych.
2. Na stronie 18 znajduje się informacja, że w badaniach wykorzystano 200 izolatów DNA. Jak rozumiem osoby od których pobrano materiał były niespokrewnione. Brak jest informacji z jakiego regionu dawcy pochodzą. Co jest istotne np. w odniesieniu do badań populacyjnych.
3. Standardowym działaniem w implementacji nowego zestawu odczynników do praktyki laboratoryjnej jest przeprowadzenie walidacji. Jest to działanie standardowo poprzedzające wdrożenie odczynników do praktyki laboratoryjnej. Warto podkreślić, że takie organizacje jak Society for Forensic Genetics (ISFG), The European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) oraz Scientific Working Group for DNA Analysis Methods (SWGDM) opracowały rekomendacje w jaki sposób walidację należy przeprowadzić, Na przykład w dokumencie Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA profiling Process (ENFSI) znajdują się zalecenia do walidacji nowych zestawów multipleksowych. W związku z powyższym analiza czułości dwóch zaprojektowanych multipleksów PCR jest dalece niewystarczająca.
4. Kolejną kwestią wymagającą poruszenia jest analiza statystyczna prezentowana w dysertacji. Biorąc pod uwagę, że nowy zestaw ma być wykorzystany do badań pokrewieństwa warto byłoby oprócz parametru heterozygotyczności obliczyć np. wskaźnik informacji o polimorfizmie (PIC), teoretyczną szansę wykluczenia (MEC) oraz siły dyskryminacji (PD), prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności (MP) oraz typowy indeks ojcostwa (TPI).

5. W wynikach badań znajdują się opisy spraw w których wykorzystano zestaw Kinfinder, które moim zdaniem, można było zastąpić bardziej przekonującymi przykładami. Na przykład sprawa nr 1 została wyjaśniona za pomocą SNP i indeli, a w trzecim przykładzie użycie YSTR mogło wpłynąć na uzyskanie wyniku rozstrzygającego.
6. W wynikach na stronie 78 znajduje się odniesienie do częstości mutacji z publikacji AABB z roku 2004 co warto byłoby zastąpić aktualnymi danymi.
7. W rozdziale pt. Dyskusja jest zbyt dużo treści, które odnoszą się do informacji już wcześniej zasygnalizowanych w pracy, łącznie z prezentacją wyników na rycinach. Przykładem może być podrozdział Kryteria wyboru loci STR do badań pokrewieństwa, który odnosi się do treści prezentowanych w rozdziale trzecim Materiał i metody. Podobnie jest z innym podrozdziałami, które w niewielkim zakresie odnoszą się do danych literaturowych również krajowych. Brak jest, na przykład, konkretnych informacji dotyczących wdrożenia metody Kinfinder do rutynowej praktyki laboratoryjnej.
8. We wnioskach trzy pierwsze punkty nie odnoszą się do celów pracy. Brak jest odniesienia do jednego ze szczegółowych celów pracy jakim miała być „ewaluacja metody Kinfinder przez porównanie z wiodącym zestawem komercyjnym”. Tak na marginesie trudno zgodzić się z określeniem wiodący zestaw bez sprecyzowania jakim cechami ten zestaw wyróżnia się od innych dostępnych na rynku.

### **Ocena formalna rozprawy:**

Rozprawa ma charakter monotematycznej monografii liczącej łącznie 107 stron. W pracy znajduje się 16 tabel i 33 ryciny, które ułatwiają merytoryczną interpretację warstwy tekstowej. Praca została napisana poprawnym językiem polskim w formie wydruku komputerowego. Praca posiada właściwy układ rozdziałów, typowy dla rozpraw na stopień doktora nauk medycznych. Treść wniosków końcowych jest adekwatna do założeń i celu rozprawy oraz znajduje pełne uzasadnienie w uzyskanych wynikach badań. Układ redakcyjny pracy obejmuje: wstęp, cele pracy, materiał i metody prezentację wyników badań, omówienie wyników badań, i dyskusję, wnioski oraz streszczenie. Pracę dopełnia bibliografia. Konstrukcja oraz sposób przedstawienia wyników badań nie budzi zastrzeżeń. Bibliografia zawiera ogółem 88 pozycje w języku polskim i angielskim, które są prawidłowo cytowane w treści pracy. D

Z obowiązku Recenzenta wynika konieczność drobnych mankamentów rozprawy:

1. W pracy brak jest wykazu tabel, rycin i stron internetowych z których Doktorant korzystał w swojej pracy. Również spis treści znalazł się na stronie 8 dysertacji poprzedzony streszczeniem w języku polskim i angielskim co moim zdaniem nie jest dobrym rozwiązaniem.
2. Ryciny nie zawierają informacji o autorze jak również niektóre z nich są mało czytelne np. od 6 do 16.
3. Na str.95 zostali wymienieni partnerzy firmy GenMed z gdzie przy nazwach znajduje się (link) zamiast adresu strony.

### **Wniosek końcowy**

Lektura dysertacji pozwala na wsunięcie wniosku, że Doktorant posiada obszerną wiedzę praktyczną i teoretyczną w obszarze zagadnień poruszanych w dysertacji. W ocenie merytorycznej stwierdzam, że problem zawarty w przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej został jednoznacznie sprecyzowany i uzasadniony. Założenia pracy w relacji do stanu wiedzy są poprawne, zaś aktualność i znaczenie tych badań zarówno poznawcza i praktyczna w pełni odpowiadają problemom współczesnej genetyki sądowej.

Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (j.t. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571).

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej dyscypliny nauki biologiczne o dopuszczenie Pana mgr Wojciecha Łuczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**KIEROWNIK PRACOWNI GENETYCZNEJ  
Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
dr hab. n. med. Ireneusz Sołtyszewski**



## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha Łuczaka**

**pt. „Opracowanie zestawu polimorficznych markerów STR do genotypowania ludzi oraz jego wdrożenie do analiz pokrewieństwa w dalszych relacjach rodzinnych”**

### **Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność**

Dynamiczny rozwój genetyki molekularnej umożliwił znaczące poszerzenie możliwości wykorzystania genetyki sądowej. W związku z powyższym do dyspozycji laboratoriów jest kilkadziesiąt markerów typu STR zlokalizowanych zarówno na chromosomach autosomalnych jak i chromosomach płci. Panel ten uzupełniają badania DNA mitochondrialnego. Zaletą markerów typu STR jest zarówno sposób dziedziczenia zgodnie z prawami Mendla, wysoka polimorficzność, duża liczba tych sekwencji w genomie jak również wysoka częstość mutacji. Dzięki temu badania genetyczne stały się ważnym narzędziem w procesie wykryczym sprawców przestępstw, w sprawach o ustalenie pokrewieństwa czy identyfikacji ofiar katastrof masowych. Należy również pokreślić ważną rolę genetycznych baz danych, które są powszechnie wykorzystywane przez organy ścigania i wymiaru sprawiedliwości. W praktyce laboratoria wykonujące badania z obszaru genetyki sądowej mają do dyspozycji szereg komercyjnych zestawów odczynników produkowanych przez firmy na całym świecie. Zestawy te charakteryzują się różną liczbą i doбором STR. W związku z powyższym niezbędne było ustalenie takiej liczby loci STR, które pozwolą na międzynarodowe porównania profili DNA. W Europie wypracowano tzw. Europejski Zestaw Standardowy (ESS) a USA standardowy zestaw loci CODIS.

Warto zauważyć, że w genetyce sądowej cały czas dominuje analiza polimorficznych markerów typu STR. Takie podejście wynika z faktu, że implementacja do praktyki laboratoryjnej nowych technologii opartych na sekwencjonowaniu nowej generacji napotyka w pierwszej kolejności na bariery finansowe.

W tym kontekście wybór tematu rozprawy doktorskiej należy uznać za trafny i merytorycznie uzasadniony. Szczególnie, że praktycznym efektem pracy będzie implementacja nowego zestawu odczynników do praktyki laboratoryjnej nazwanego przez Doktoranta Kinfinder.

### **Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

Przedłożona do oceny praca zawiera 6 rozdziałów.

W rozdziale pierwszym Doktorant przedstawił charakterystykę mikrosatelitanych loci genomu człowieka wskazując obszary zastosowania STR nie tylko w genetyce sądowej ale również w badaniach populacyjnych w hodowli roślin zwierząt czy w ochronie zagrożonych gatunków objętych konwencją waszyngtońską. W kolejnej części wstępu Doktorant skoncentrował się na zastosowaniu analizy loci STR w badaniach biologicznego pokrewieństwa zwracając uwagę na trudności w badaniach w dalszych relacji rodzinnych. Ostatni część wstępu dotyczy możliwości wykorzystania alternatywnych metod analizy DNA np. sekwencjonowaniu nowej generacji czy analizy pojedynczych nukleotydów (SNP) z wykorzystaniem mikromacierzy. Doktorant podkreślił, że alternatywne metody mają wysoką wartość informatywną ale ze względu na koszty nie są powszechnie stosowane.

W rozdziale drugim, Doktorant sformułował cel pracy i cele cząstkowe:

Celem niniejszego doktoratu wdrożeniowego było opracowanie nowej metody do badania biologicznego pokrewieństwa w dalszych relacjach rodzinnych. Ta nowa metoda o nazwie Kinfinder miała zostać wdrożona w Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed, w oparciu o reakcję multipleks-PCR oraz elektroforezę kapilarną. Takie podejście pozwoliłoby na stosowanie metody bez konieczności ponoszenia dodatkowych nakładów inwestycyjnych w nową aparaturę, przestrzeń laboratoryjną oraz w szkolenia pracowników.

Cel pracy został uzupełniony o następujące cele cząstkowe:

- zidentyfikowanie w genomie człowieka najbardziej polimorficznych loci STR,
- przeprowadzenie badań przesiewowych w celu oszacowania heterozygotyczności wytypowanych loci STR oraz rozpiętości ich alleli w populacji polskiej,
- zaprojektowanie dwóch reakcji multipleks-PCR umożliwiających równoczesną amplifikację 2 x 25 loci STR w jednym procesie analitycznym,
- opracowanie drabiny allelicznej,
- opracowanie odczynnika do kalibracji spektralnej analizatora genetycznego,
- ewaluację metody Kinfinder przez jej porównanie z wiodącym zestawem komercyjnym,

- wdrożenie metody do rutynowej pracy Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed w badaniach pokrewieństwa w różnych relacjach rodzinnych.

W rozdziale trzecim został scharakteryzowany materiał i metody. Do badań wykorzystano w sumie 200 izolatów DNA pobranych od zanonimizowanych klientów Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed oraz 3 pracowników tego laboratorium. Próbki DNA izolowano z wymazów z jamy ustnej. Dawcy wyrazili pisemną zgodę na wykorzystanie ich materiału genetycznego do badań naukowych. W tej części rozprawy Doktorat szczegółowo opisał kolejne etapy działań poczynając od identyfikacji nowych polimorficznych loci STR zarówno z dostępnych baz danych jak danych literaturowych. Do projektowania starterów wykorzystano programy i narzędzia bioinformatyczne: Primer 3, primerBlast oraz Blast. Kolejne etapy obejmowały przygotowanie puli matrycowego DNA testowanie polimorfizmu loci STR metodą PCR a następnie amplifikację w dwóch multipleksowych reakcjach PCR. Amplifikacja obejmowała 50 loci STR. Elektroforezę produktów multipleksowej reakcji PCR przeprowadzono przy użyciu 16-kapilarnego sekwenatorem 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems). Dodatkowo wykonano sekwencjonowanie nowo opracowanych loci STR co miało pozwolić na weryfikację poprawności amplifikacji, Do sekwencjonowania wybrano amplikony od osób homozygotycznych. Końcowymi etapami procesu badawczego było szacowanie heterozygotyczności loci STR, analiza statystyczna ukierunkowana na analizę wyników badań pokrewieństwa oraz przyjęcie schematu nazewnictwa nowo scharakteryzowanych loci STR.

Rozdział czwarty zatytułowany Wyniki zawiera dziewięć podrozdziałów. Treść rozdziału jest ilustrowana 14 tabelami i 26 rycinami. W podrozdziale pierwszym Doktorant zaprezentował listę wybranych STR spełniających założone kryteria. Tabela nr 2 zawiera ogółem 183 STR z podaniem najważniejszych informacji charakteryzujących poszczególne loci. Kolejny podrozdział dotyczył testowania zaprojektowanych starterów do amplifikacji loci STR z wykorzystaniem metody M-13 -tailing. Analiza wyników badań spowodowała zmniejszenie liczby STR do 172. Trzeci etap to szacowanie heterozygotyczności wybranych loci STR w populacji Polski. Uzyskane częstości porównywano z wynikami badań znajdujących się w pracy Ossowski i in. (2017). Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorant wybrał 50 STR, które zostały ostatecznie zakwalifikowane do przygotowania nowego zestawu Kinfinder. W kolejnym podrozdziale przedstawiono wyniki dwóch multipleksowych reakcji PCR z wykorzystaniem 50 loci STR. Kluczową kwestią było takie zaprojektowanie reakcji multipleks PCR aby pomiędzy amplikonami poszczególnych loci (znakowanych tym samym barwnikiem fluorescencyjnym w jednej reakcji PCR) istniały przerwy wielkości 10-20pz.

Takie zaprojektowanie zestawu pozwala na zidentyfikowanie rzadkich niezidentyfikowanych alleli. Warty podkreślenia jest pomysł włączenia do obu zestawów po jednym loci z systemu CODIS co ma umożliwić dodatkową kontrolę procesu badawczego. Następnym etapem była analiza czułości metody Kinfinder. Z uzyskanych badań wynika, że pełen profil DNA w reakcjach PCR uzyskano dla izolatów zawierających 0,125 ng DNA. Następnie Doktorat zaprezentował na 5 rycinach drabiny alleliczne wybranych loci STR na których znajdują się amplikony od 13 do 21 alleli. W celu weryfikacji poprawności reakcji PCR właściwych loci STR przeprowadzono sekwencjonowanie metodą Sanger. Wyniki sekwencjonowania przedstawiono na pięciu elektroforegramach. Przedostatni podrozdział omawia wyniki analizy informatywności metody Kinfinder w odniesieniu do pokrewieństwa dla różnych relacji rodzinnych. Symulacje trzech stopni pokrewieństwa. Biologiczne pokrewieństwo analizowano poprzez obliczenie ilorazu wiarygodności LR. W ostatnim dziewiątym zaprezentowano trzy przykłady zastosowania zestawu w praktyce laboratoryjnej. Rozdział piąty obejmuje dyskusję. Rozdział ten składa się z siedmiu podrozdziałów. W pierwszej kolejności Doktorant opisał kryteria wyboru loci STR do badań pokrewieństwa wskazując na cztery, jego zdaniem, kluczowe parametry wyboru potencjalnych loci STR do tworzonego zestawu. Wybór obejmował loci STR o długości motywu tandemowo powtórnego od 3 do 5 par zasad, o maksymalnej heterozygotyczności wybranych loci. Kolejnym kryterium było wykluczenie z tworzonego zestawu sekwencji zawierających mono i dinukleotydowych w sekwencjach flankujących oraz sekwencji wielokrotnie powtórzonych w genomie w sekwencjach flankujących locus STR. Ostatnim kryterium wyboru locus była możliwie mała rozpiętość długości sekwencji pomiędzy najkrótszym a najdłuższym allelem danego locus. W kolejnym podrozdziale omówiono wyniki badań przesiewowych wybranych loci STR koncentrując się na weryfikacji heterozygotyczności wyselekcjonowanych loci STR. Podrozdział trzeci odnosił się do metodyki tworzenia zestawu Kinfinder umożliwiającego przeprowadzenie dwóch reakcji multiplex PCR z jednoczesną analizą 25 loci STR w każdej reakcji. Czwarty podrozdział nosi tytuł „Sekwencje opracowywanych loci STR” i odnosił się do nazewnictwa dla wszystkich analizowanych alleli. Podrozdział piąty charakteryzował częstości występowania alleli 50 STR w populacji polskiej. Badania potwierdziły wysoką heterozygotyczność badanych loci. Podrozdział szósty prezentuje wyniki symulacji badań pokrewieństwa z wykorzystaniem zestawu Kinfinder porównując wyniki z zestawem GlobalFiler™ PCR Amplification Kit firmy Thermo Fisher Scientific. Ostatni podrozdział opisuje wdrożenie metody Kinfinder do rutynowej pracy laboratoryjnej.

Rozdział szósty zawiera wnioski, które zostały przedstawione w dziesięciu punktach:

Baza danych projektu 1000 Genomes zawiera istotne informacje odnośnie do polimorficznych loci STR, jednakże dane są niepełne. Baza zawiera pełne informacje na temat krótkich loci STR, długie sekwencje są nieobecne lub dane są tym silniej zniekształcone im locus zawiera dłuższe allele.

Baza WebSTR (<https://webstr.ucsd.edu/>) jest doskonałym narzędziem do wyszukiwania potencjalnie polimorficznych sekwencji STR w genomie ludzkim.

Genom człowieka zawiera dużą liczbę polimorficznych loci STR, jednak elementy ich sekwencji flankujących, takie jak obecność: sekwencji wielokrotnie powtórzonych w genomie, sprzężonych sekwencji zawierających powtórzenia mono- i dinukleotydowe oraz sekwencji wykazujących wysoki polimorfizm w populacji utrudniający zaprojektowanie starterów może utrudniać lub nawet uniemożliwiać wykorzystanie tych loci w badaniach pokrewieństwa.

Opracowana w tej rozprawie doktorskiej, nowatorska metoda badań przesiewowych umożliwia szybką selekcję polimorficznych loci STR zawierających powtórzenia tri- tetra- i pentanukleotydowe. Ze względu na uniwersalne właściwości sekwencji STR, metoda ta może być wykorzystana do testowania polimorfizmu loci STR u innych organizmów w trakcie opracowywania analogicznych metod badania pokrewieństwa zwierząt hodowlanych, identyfikacji odmian roślin i in.

Opracowanie reakcji multipleks PCR jest trudnym wyzwaniem rosnącym wraz z liczbą produktów generowanych w reakcji, jednak stworzenie reakcji do jednoczesnej analizy 25 loci STR jest możliwe.

Średnia heterozygotyczność nowo scharakteryzowanych loci STR wykorzystywanych w metodzie Kinfinder w populacji polskiej wynosi 88,07% i jest znacząco wyższa niż heterozygotyczność loci CODIS wynosząca 78,95%.

Sekwencjonowanie alleli STR sugeruje, że przynajmniej część z nich oprócz polimorfizmu długości sekwencji wykazuje także polimorfizm sekwencji nukleotydowej.

Nowo opracowana metoda analizy pokrewieństwa Kinfinder wykorzystująca analizę 50 wysoce polimorficznych loci STR cechuje się bardzo wysoką informatywnością w badaniach pokrewieństwa.

Metoda Kinfinder wykorzystuje analizę autosomalnych loci STR, a przez to nie ma ograniczeń związanych z analizą chromosomów płci, wobec czego można ją wykorzystać w badaniach pokrewieństwa w dowolnej relacji rodzinnej.

Wdrożenie metody Kinfinder w laboratoriach genetycznych jest bezproblemowe, gdyż metoda wykorzystuje powszechnie stosowaną w laboratoriach genetyczno-sądowych technologię reakcji PCR w multipleksie w połączeniu z elektroforezą kapilarną.

Z obowiązku Recenzenta wynika konieczność omówienia spostrzeżeń dotyczących rozprawy: Doceniając zaangażowanie Doktorantka w przygotowaniu niniejszej dysertacji chciałbym zwrócić uwagę na kilka kwestii.

1. We wstępie Doktorant obszernie charakteryzuje sekwencje mikrosatelitarne natomiast brakuje szerszego odniesienia do komercyjnych zestawów STR rutynowo stosowanych w praktyce laboratoryjnej. Moim zdaniem krytyczna analiza ich możliwości identyfikacyjnych dobitniej wskazywałaby na celowość opracowania nowego zestawu odczynników szczególnie w badaniach pokrewieństwa w dalszych relacjach rodzinnych.
2. Na stronie 18 znajduje się informacja, że w badaniach wykorzystano 200 izolatów DNA. Jak rozumiem osoby od których pobrano materiał były niespokrewnione. Brak jest informacji z jakiego regionu dawcy pochodzą. Co jest istotne np. w odniesieniu do badań populacyjnych.
3. Standardowym działaniem w implementacji nowego zestawu odczynników do praktyki laboratoryjnej jest przeprowadzenie walidacji. Jest to działanie standardowo poprzedzające wdrożenie odczynników do praktyki laboratoryjnej. Warto podkreślić, że takie organizacje jak Society for Forensic Genetics (ISFG), The European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) oraz Scientific Working Group for DNA Analysis Methods (SWGDM) opracowały rekomendacje w jaki sposób walidację należy przeprowadzić, Na przykład w dokumencie Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA profiling Process (ENFSI) znajdują się zalecenia do walidacji nowych zestawów multipleksowych. W związku z powyższym analiza czułości dwóch zaprojektowanych multipleksów PCR jest dalece niewystarczająca.
4. Kolejną kwestią wymagającą poruszenia jest analiza statystyczna prezentowana w dysertacji. Biorąc pod uwagę, że nowy zestaw ma być wykorzystany do badań pokrewieństwa warto byłoby oprócz parametru heterozygotyczności obliczyć np. wskaźnik informacji o polimorfizmie (PIC), teoretyczną szansę wykluczenia (MEC) oraz siły dyskryminacji (PD), prawdopodobieństwa przypadkowej zgodności (MP) oraz typowy indeks ojcostwa (TPI).

5. W wynikach badań znajdują się opisy spraw w których wykorzystano zestaw Kinfinder, które moim zdaniem, można było zastąpić bardziej przekonującymi przykładami. Na przykład sprawa nr 1 została wyjaśniona za pomocą SNP i indeli, a w trzecim przykładzie użycie YSTR mogło wpłynąć na uzyskanie wyniku rozstrzygającego.
6. W wynikach na stronie 78 znajduje się odniesienie do częstości mutacji z publikacji AABB z roku 2004 co warto byłoby zastąpić aktualnymi danymi.
7. W rozdziale pt. Dyskusja jest zbyt dużo treści, które odnoszą się do informacji już wcześniej zasygnalizowanych w pracy, łącznie z prezentacją wyników na rycinach. Przykładem może być podrozdział Kryteria wyboru loci STR do badań pokrewieństwa, który odnosi się do treści prezentowanych w rozdziale trzecim Materiał i metody. Podobnie jest z innymi podrozdziałami, które w niewielkim zakresie odnoszą się do danych literaturowych również krajowych. Brak jest, na przykład, konkretnych informacji dotyczących wdrożenia metody Kinfinder do rutynowej praktyki laboratoryjnej.
8. We wnioskach trzy pierwsze punkty nie odnoszą się do celów pracy. Brak jest odniesienia do jednego ze szczegółowych celów pracy jakim miała być „ewaluacja metody Kinfinder przez porównanie z wiodącym zestawem komercyjnym”. Tak na marginesie trudno zgodzić się z określeniem wiodący zestaw bez sprecyzowania jakim cechami ten zestaw wyróżnia się od innych dostępnych na rynku.

### **Ocena formalna rozprawy:**

Rozprawa ma charakter monotematycznej monografii liczącej łącznie 107 stron. W pracy znajduje się 16 tabel i 33 ryciny, które ułatwiają merytoryczną interpretację warstwy tekstowej. Praca została napisana poprawnym językiem polskim w formie wydruku komputerowego. Praca posiada właściwy układ rozdziałów, typowy dla rozpraw na stopień doktora nauk medycznych. Treść wniosków końcowych jest adekwatna do założeń i celu rozprawy oraz znajduje pełne uzasadnienie w uzyskanych wynikach badań. Układ redakcyjny pracy obejmuje: wstęp, cele pracy, materiał i metody prezentację wyników badań, omówienie wyników badań, i dyskusję, wnioski oraz streszczenie. Pracę dopełnia bibliografia. Konstrukcja oraz sposób przedstawienia wyników badań nie budzi zastrzeżeń. Bibliografia zawiera ogółem 88 pozycje w języku polskim i angielskim, które są prawidłowo cytowane w treści pracy. D

Z obowiązku Recenzenta wynika konieczność drobnych mankamentów rozprawy:

1. W pracy brak jest wykazu tabel, rycin i stron internetowych z których Doktorant korzystał w swojej pracy. Również spis treści znalazł się na stronie 8 dysertacji poprzedzony streszczeniem w języku polskim i angielskim co moim zdaniem nie jest dobrym rozwiązaniem.
2. Ryciny nie zawierają informacji o autorze jak również niektóre z nich są mało czytelne np. od 6 do 16.
3. Na str.95 zostali wymienieni partnerzy firmy GenMed z gdzie przy nazwach znajduje się (link) zamiast adresu strony.

### **Wniosek końcowy**

Lektura dysertacji pozwala na wsunięcie wniosku, że Doktorant posiada obszerną wiedzę praktyczną i teoretyczną w obszarze zagadnień poruszanych w dysertacji. W ocenie merytorycznej stwierdzam, że problem zawarty w przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej został jednoznacznie sprecyzowany i uzasadniony. Założenia pracy w relacji do stanu wiedzy są poprawne, zaś aktualność i znaczenie tych badań zarówno poznawcza i praktyczna w pełni odpowiadają problemom współczesnej genetyki sądowej.

Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (j.t. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571).

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej dyscypliny nauki biologiczne o dopuszczenie Pana mgr Wojciecha Łuczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**KIEROWNIK PRACOWNI GENETYCZNEJ**  
**Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej**  
**Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**  
**dr hab. n. med. Ireneusz Soltyszewski**