

Recenzja rozprawy doktorskiej

UNIwersytet IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

Tytuł: *Opracowanie zestawu polimorficznych markerów STR do genotypowania ludzi oraz jego wdrożenie do analiz pokrewieństwa w dalszych relacjach rodzinnych*

Autor: mgr Wojciech Łuczak

Dyscyplina: nauki medyczne

Promotor: prof. UAM dr hab. Mirosława Dabert

Recenzent: dr hab. n. med. Magdalena Spólnicka

Data: 08.02.2025 r.

Centrum Nauk Sądowych, Uniwersytet Warszawski

Wprowadzenie

W ostatnich latach genetyka sądowa i analiza pokrewieństwa nabrały szczególnego znaczenia, głównie za sprawą dynamicznego rozwoju technik molekularnych i bioinformatycznych. Metody oparte na krótkich powtórzeniach tandemowych (STR, *Short Tandem Repeats*) stały się jednymi z kluczowych narzędzi w badaniach biologicznych oraz w praktyce sądowej. Ich popularność wynika z wysokiej czułości, wartości informacyjnej oraz zdolności do analizy nawet zdegradowanego DNA.

Jednak w przypadku dalszych relacji rodzinnych standardowe markery STR, takie jak system CODIS, często okazują się niewystarczające, co stwarza potrzebę opracowania bardziej precyzyjnych narzędzi. Rozprawa doktorska mgr Wojciecha Łuczaka podejmuje to zagadnienie, koncentrując się na wykorzystaniu polimorficznych markerów STR w analizie pokrewieństwa.

Doktorant opracował nowy zestaw markerów STR, który zwiększa moc dyskryminacyjną analiz pokrewieństwa oraz optymalizuje procedury laboratoryjne związane z genotypowaniem DNA. Opracowana metoda, nazwana *Kinfinder*, ma na celu poprawę skuteczności analiz poprzez zastosowanie starannie wyselekcjonowanych loci STR, zoptymalizowanych warunków amplifikacji PCR oraz walidację w populacji polskiej.

Praca ma zarówno charakter naukowy, obejmujący selekcję i analizę nowych markerów STR, jak i wdrożeniowy, co podkreśla jej znaczenie aplikacyjne. Zastosowanie metody *Kinfinder*

w rutynowych badaniach Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed potwierdza jej praktyczną wartość.

Celem rozprawy było opracowanie metody *Kinfinder*, obejmującej 50 wysoko polimorficznych loci STR, oraz jej wdrożenie do praktyki laboratoryjnej. Autor przyjął kompleksowe podejście, uwzględniając identyfikację nowych loci STR, optymalizację reakcji multipleks-PCR, analizę populacyjną oraz ocenę przydatności metody w rzeczywistych badaniach pokrewieństwa.

Praca została zaprezentowana w klasycznej strukturze rozprawy doktorskiej, obejmującej *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Dyskusję* oraz *Wnioski*, co sprzyja jej przejrzystości. W niniejszej recenzji dokonano szczegółowej analizy merytorycznej poszczególnych sekcji oraz oceny wkładu rozprawy w rozwój genetyki sądowej i badań pokrewieństwa.

Ocena merytoryczna

1. Wstęp

Wstęp zawiera szerokie omówienie mikrosatelitarnych loci DNA (STR), ze szczególnym uwzględnieniem ich biologicznych właściwości, historii odkrycia oraz wszechstronnych zastosowań w genetyce sądowej, populacyjnej, ewolucyjnej i medycznej. Autor, korzystając z licznych źródeł literaturowych, starannie wprowadza czytelnika w problematykę pracy, podkreślając znaczenie analizowanych markerów genetycznych.

Jednym z największych atutów tej części rozprawy jest obszerny przegląd literatury. Autor odwołuje się do licznych, wiarygodnych źródeł naukowych, ukazując rozwój badań nad loci STR oraz ich interdyscyplinarne znaczenie. Przedstawienie mechanizmów reakcji PCR, takich jak poślizg polimerazy, jest szczególnie wartościowe, ponieważ świadczy o dobrym zrozumieniu technicznych aspektów badanej problematyki. Również część poświęcona zastosowaniom loci STR w genetyce sądowej jest merytorycznie poprawna i oparta na aktualnych metodach, w tym analizach pokrewieństwa oraz systemach identyfikacyjnych, takich jak Combined DNA Index System (CODIS).

Pomimo licznych zalet wstęp nie jest pozbawiony pewnych mankamentów. Przede wszystkim brakuje w nim wyraźnego powiązania z celem rozprawy doktorskiej. Obszerna analiza kontekstu biologicznego loci STR, w tym szczegółowe omówienie historii pojęcia *satelitarny DNA*, choć interesująca, może wydawać się nadmiernie rozbudowana i niezwiązana bezpośrednio z głównym zakresem badawczym pracy.

Dodatkowo wstęp nie zawiera odniesień do międzynarodowych standardów obowiązujących w analizie STR, takich jak wytyczne *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* (SWGDM) czy *European Network of Forensic Science Institutes* (ENFSI). Ich pominięcie może sugerować, że autor nie uwzględnił kluczowych rekomendacji przy projektowaniu badań, co może wpłynąć na praktyczną wartość uzyskanych wyników.

Pewne wątpliwości budzi także odniesienie do badań *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) metodą mikromacierzy jako potencjalnej alternatywy dla analizy STR w genetyce sądowej. Choć SNP znajdują zastosowanie w niektórych aspektach badań DNA, mikromacierze nie są powszechnie stosowane w kryminalistyce ze względu na swoje ograniczenia technologiczne. Stwierdzenie to może zostać poddane krytyce jako nie do końca zgodne z aktualnym stanem wiedzy.

Pod względem stylistycznym wstęp miejscami jest rozwlekły, a niektóre pojęcia, np. *zwartość locus STR*, są żargonowe i mogą być niejasne dla czytelnika.

Podsumowując, wstęp rozprawy doktorskiej przedstawia solidną podstawę teoretyczną i ukazuje szeroką wiedzę autora na temat loci STR, jednak niektóre elementy wymagają dopracowania. Brak jednoznacznego powiązania z celem pracy, pominięcie międzynarodowych standardów oraz problematyczne sformułowania dotyczące SNP mogą stać się przedmiotem polemiki w procesie oceny rozprawy.

2. Cel pracy

Cel pracy został sformułowany w sposób jasny i precyzyjny, z uwzględnieniem aspektu aplikacyjnego badań. Autor jednoznacznie określił, że dąży do opracowania nowej metody analizy pokrewieństwa oraz jej wdrożenia do praktyki laboratoryjnej, co świadczy o pragmatycznym podejściu do problematyki.

Pewnym niedociągnięciem jest jednak brak jednoznacznego określenia cech, które powinny wyróżniać metodę *Kinfinder* na tle istniejących rozwiązań. Choć założono, że nowy panel markerów STR będzie charakteryzował się wyższą informatywnością niż system CODIS, nie sprecyzowano jednoznacznych kryteriów oceny skuteczności metody. Brakuje jasno określonych parametrów, takich jak siła wykluczenia (*PE*), wskaźnik informatywności polimorficznej (*PIC*) czy wartości prawdopodobieństwa pokrewieństwa (*LR*), co utrudnia obiektywną weryfikację założeń badawczych i ocenę rzeczywistej wartości metody.

Ponadto nie odniesiono się do międzynarodowych standardów walidacji metod STR, co może budzić wątpliwości dotyczące możliwości implementacji systemu *Kinfinder* na szerszą skalę, zwłaszcza w kontekście badań kryminalistycznych.

3. Materiały i metody

Rozdział metodologiczny został opracowany w sposób szczegółowy i dobrze skonstruowany. Autor kompleksowo przedstawił proces projektowania markerów STR, optymalizację reakcji PCR oraz analizę statystyczną. Opis procedur laboratoryjnych, w tym kalibracji analizatora genetycznego i opracowania drabin allelicznych, świadczy o wysokiej jakości przeprowadzonych badań.

Sekcja została opracowana rzetelnie, a zastosowane procedury badawcze umożliwiają ocenę poprawności metodologicznej pracy. Autor wykorzystał standardowe techniki analizy loci STR, takie jak multipleksowa reakcja PCR, elektroforeza kapilarna oraz sekwencjonowanie metodą Sangera do opracowania drabin allelicznych. Podejście to jest zgodne z aktualnym stanem wiedzy i stosowanymi metodami w badaniach pokrewieństwa.

Na szczególną uwagę zasługuje precyzyjne projektowanie starterów oraz optymalizacja warunków amplifikacji, uwzględniające długość starterów, temperaturę topnienia i analizę potencjalnych polimorfizmów SNP w miejscach ich przyłączenia. Dobór 200 izolatów DNA umożliwił ocenę heterozygotyczności oraz rozpiętości allelicznej nowo wytypowanych markerów STR, a walidacja metody poprzez porównanie z komercyjnym zestawem zwiększyła wiarygodność wyników.

Pomimo wysokiej jakości opisu metodyki, pewne elementy wymagają uzupełnienia. W pracy podano, że do badań wykorzystano 200 izolatów DNA klientów laboratorium oraz próbki od trzech ochotników, którzy wyrazili zgodę na ich użycie do celów naukowych. Nie wspomniano jednak o zgodzie komisji bioetycznej, co rodzi wątpliwości, czy procedury poboru i wykorzystania materiału biologicznego były zgodne z obowiązującymi regulacjami. W przypadku badań na materiale ludzkim, nawet jeśli próbki są zanonimizowane, taka zgoda jest zazwyczaj wymagana. Należało zatem podać numer zgody komisji bioetycznej lub wyjaśnić, dlaczego nie była ona konieczna.

W pracy podano, że izolację DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu *Swab (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska)*, jednak nie określono, z jakiego materiału biologicznego pochodziły próbki. Brak tej informacji uniemożliwia ocenę efektywności izolacji DNA oraz jej wpływu na wyniki analizy STR.

Metoda *Kinfinder*, opracowana na potrzeby badań pokrewieństwa, nie uwzględniła niektórych standardowych procedur walidacyjnych stosowanych w genetyce sądowej, co może ograniczać jej zastosowanie w szerszym kontekście. Nie przeprowadzono testów specyficzności tkankowej, co oznacza, że nie określono, czy metoda działa równie skutecznie na DNA

pochodzące z różnych tkanek, np. kości, włosów czy krwi. Kluczowe byłoby również sprawdzenie skuteczności metody w analizie zdegradowanego DNA, co ma istotne znaczenie w badaniach identyfikacyjnych. W takich przypadkach wytyczne *SWGAM* i *ENFSI* zalecają testowanie systemów STR pod kątem skuteczności analizy pofragmentowanego materiału genetycznego.

Istotnym aspektem walidacji jest także określenie specyficzności gatunkowej, aby potwierdzić, że metoda amplifikuje wyłącznie ludzkie DNA i nie prowadzi do amplifikacji sekwencji pochodzących od zwierząt lub mikroorganizmów. Brak takich testów może ograniczać użyteczność systemu *Kinfinder* w analizie śladów biologicznych z miejsc katastrof masowych i innych zdarzeń kryminalistycznych.

Wytyczne *SWGAM* określają wymagania dotyczące walidacji systemów STR, obejmujące m.in. powtarzalność wyników, precyzję oznaczeń alleli oraz minimalną ilość DNA potrzebną do skutecznej amplifikacji. Choć w pracy testowano czułość metody, nie podano wartości granicznej, poniżej której metoda przestaje być skuteczna. Nie odniesiono się również do analizy mieszanin DNA, co – choć nie jest kluczowe w badaniach pokrewieństwa – mogłoby być istotne w przypadku potencjalnego zastosowania metody w genetyce sądowej.

Brak odniesienia do międzynarodowych wytycznych może budzić pytania o możliwość wykorzystania metody w laboratoriach genetyki sądowej. Wskazanie, które elementy walidacji przeprowadzono zgodnie z zaleceniami *SWGAM/ENFSI*, a które pominięto ze względu na specyfikę badań pokrewieństwa, zwiększyłoby transparentność metodologii.

Nie podano również pochodzenia geograficznego uczestników badania. Nie wiadomo, czy próbki reprezentują całą populację Polski, czy jedynie wybrany region, co może wpływać na reprezentatywność uzyskanych częstości allelicznych. W przypadku badań populacyjnych istotne jest także wykluczenie pokrewieństwa między uczestnikami, ponieważ uwzględnienie spokrewnionych osób może prowadzić do zawyżenia częstości niektórych alleli.

Dodatkowo nie określono struktury płciowej próby, co może prowadzić do nierównomiernej reprezentacji alleli w populacji. W badaniach genetycznych istotne jest, by proporcja kobiet i mężczyzn była znana i uwzględniona w analizach statystycznych.

W pracy zastosowano własne oznaczenia markerów STR, które odbiegają od standardów zalecanych przez *International Society for Forensic Genetics (ISFG)*, *SWGAM* oraz *European DNA Profiling Group (EDNAP)*. Brak ustandaryzowanego nazewnictwa utrudnia porównywanie wyników z innymi bazami danych oraz może prowadzić do nieścisłości w analizie międzylaboratoryjnej. Zastosowanie powszechnie przyjętej nomenklatury zwiększyłoby użyteczność markerów w szerokim kontekście badań genetycznych.

4. Wyniki i ich interpretacja

Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej dostarczają szczegółowej analizy procesu selekcji i walidacji nowych markerów STR oraz opracowania metody Kinfinder do badań biologicznego pokrewieństwa. Wykorzystana metodologia, obejmująca analizę baz danych STRCatalog i WebSTR oraz przegląd literatury, pozwoliła na identyfikację 172 potencjalnie wartościowych loci, które następnie zostały poddane testom przesiewowym w populacji polskiej.

Dobór markerów został przeprowadzony w sposób metodyczny i konsekwentny, przy uwzględnieniu ich polimorficzności, szerokiego zakresu długości allelicznych oraz stabilności flankujących sekwencji. Dzięki temu nowo wytypowane loci STR posiadają potencjał do zastosowania w analizach pokrewieństwa, a ich charakterystyka może umożliwić bardziej precyzyjne określanie stopnia biologicznego pokrewieństwa niż w przypadku standardowych zestawów markerów.

Ocena przydatności wybranych loci STR została przeprowadzona na obszernej grupie 200 próbek DNA, co pozwoliło na dokładną analizę heterozygotyczności oraz rozkładu alleli w badanej populacji. Dodatkowo, weryfikacja wyników poprzez porównanie z zestawem standardowych loci CODIS zwiększa wiarygodność metody i umożliwia jej przyszłe zastosowanie w praktyce laboratoryjnej.

Proces projektowania starterów do amplifikacji nowych loci STR został przeprowadzony z dużą starannością. Wykorzystanie metod *in silico* oraz empirycznych testów optymalizacyjnych pozwoliło na uzyskanie wysokiej specyficzności reakcji oraz skutecznej amplifikacji w układzie multipleks-PCR, co ma kluczowe znaczenie w analizach genetycznych wymagających równoczesnego badania wielu markerów.

W rozprawie przeprowadzono szczegółową analizę statystyczną, obejmującą symulacje różnych scenariuszy pokrewieństwa oraz wyliczenie wartości wskaźnika prawdopodobieństwa (Likelihood Ratio, LR). Wyniki wykazały, że metoda Kinfinder znacząco poprawia zdolność do rozróżniania dalszych relacji rodzinnych w porównaniu z zestawem GlobalFiler, co czyni ją cennym narzędziem w analizach genealogicznych i sądowych.

Istotnym elementem pracy jest praktyczna implementacja opracowanej metody w analizach sądowych. Przedstawione przypadki, obejmujące m.in. złożone sprawy dotyczące ustalenia pokrewieństwa, dowodzą użyteczności zestawu Kinfinder w rzeczywistych warunkach badawczych. Szczegółowa analiza jednego z przypadków, w którym konieczne było

rozszerzenie liczby badanych loci oraz ekshumacja, wskazuje zarówno na zalety, jak i pewne ograniczenia standardowego podejścia do analizy pokrewieństwa.

Zestaw Kinfinder został zaprojektowany głównie do badań pokrewieństwa, jednak w pracy nie przeprowadzono testów specyficzności tkankowej, które mogłyby potwierdzić skuteczność analizy DNA pochodzącego z różnych rodzajów tkanek (np. krwi, kości, włosów). Brak testów amplifikacji na DNA innych gatunków może stanowić ograniczenie, jeśli metoda miałaby być stosowana w analizach kryminalistycznych, gdzie istotne jest wykluczenie niespecyficznej amplifikacji sekwencji zwierzęcych lub mikroorganizmów.

Opracowane loci STR zostały oznaczone w sposób odbiegający od międzynarodowych standardów zalecanych przez ISFG, SWGDAM i EDNAP, co może utrudniać porównywanie wyników z innymi bazami danych i systemami analitycznymi. Stosowanie ustandaryzowanej nomenklatury zwiększyłoby praktyczną wartość nowo wytypowanych markerów w badaniach pokrewieństwa i identyfikacji.

Nie przeprowadzono testów zgodności rozkładu alleli z równowagą Hardy'ego-Weinberga, co jest kluczowym elementem oceny populacyjnej markerów STR. Odchylenia od równowagi HWE mogą wskazywać na wpływ czynników takich jak efekt założyciela, dryf genetyczny lub dobór próbkowy, co powinno zostać zweryfikowane w dalszych badaniach.

W pracy nie podano porównania wartości H_e i H_o , co uniemożliwia ocenę polimorficzności loci STR i ewentualnych różnic wynikających z heterogeniczności populacji. Takie zestawienie byłoby przydatne w ocenie jakości nowych markerów.

5. Dyskusja i wnioski

Dyskusja stanowi istotny element pracy, pozwalający na osadzenie uzyskanych wyników w kontekście aktualnej literatury naukowej, a także na ocenę ich znaczenia oraz potencjalnych ograniczeń. W przedstawionej rozprawie doktorant wykazał się dobrą znajomością badań z zakresu genetyki sądowej i populacyjnej, odwołując się do kluczowych projektów, takich jak 1000 Genomes, STRCatalog oraz WebSTR. Ponadto, autor trafnie odniósł się do ograniczeń technologii sekwencjonowania krótkich odczytów, co ma istotne znaczenie w kontekście opracowywania nowych markerów STR.

Dyskusja wyników zawiera liczne odniesienia do wcześniejszych badań, co potwierdza dobre zrozumienie zagadnienia oraz umiejętność krytycznej analizy literatury. Autor szczegółowo opisuje zastosowanie technik multipleks-PCR, zwracając uwagę na trudności związane z projektowaniem starterów, unikanie ich wzajemnych oddziaływań oraz eliminację nakładania

się alleli w jednym kanale fluorescencyjnym. Wskazanie na problem alleli zerowych oraz polimorfizmów SNP w miejscach wiązania starterów świadczy o zaawansowanym podejściu do analizy technicznej.

Istotnym elementem dyskusji jest podkreślenie, że metoda Kinfinder została wdrożona w Laboratorium Diagnostyki Molekularnej GenMed, gdzie przeszła testy w rzeczywistych przypadkach sądowych i diagnostycznych. Omówienie praktycznego zastosowania nowych markerów STR oraz ich implementacji w analizach pokrewieństwa potwierdza wartość użytkową opracowanej metody.

Dyskusja w sposób szczegółowy omawia porównanie wyników badań pokrewieństwa uzyskanych przy użyciu GlobalFiler oraz nowego systemu Kinfinder. Autor wskazuje, że standardowe markery CODIS mają ograniczoną wartość w analizie dalszych relacji rodzinnych, podczas gdy zestaw Kinfinder pozwala na uzyskanie bardziej precyzyjnych wyników. Podkreślono również wyższą heterozygotyczność nowo opracowanych markerów, co sugeruje ich potencjalnie większą przydatność w analizach genealogicznych i sądowych.

Rozszerzenie kontekstu zastosowań nowej metody poza standardowe badania pokrewieństwa i uwzględnienie możliwości jej wykorzystania w identyfikacji ofiar katastrof masowych, wojen czy totalitaryzmów podkreśla jej potencjalne znaczenie w praktyce sądowej i historycznej.

Choć autor szczegółowo analizuje przydatność opracowanej metody, w dyskusji zabrakło odniesienia do kluczowych wytycznych organizacji zajmujących się walidacją markerów STR, takich jak SWGDAM, ISFG oraz EDNAP. Brak porównania wyników do międzynarodowych standardów ogranicza możliwość oceny zgodności metody z wymaganiami laboratoriów genetyki sądowej.

Dyskusja koncentruje się na zaletach nowej metody, jednak w niewielkim stopniu omawia jej potencjalne ograniczenia. Chociaż wskazano trudności związane z projektowaniem multipleks-PCR, nie przeanalizowano ewentualnych problemów z amplifikacją w przypadku zdegradowanego DNA oraz potencjalnego wpływu polimorfizmów SNP na skuteczność amplifikacji. W kontekście genetyki sądowej istotne byłoby omówienie, w jakim stopniu metoda Kinfinder sprawdza się w analizie śladów biologicznych o niskiej jakości.

Autor trafnie wskazuje ograniczenia standardowych systemów STR, jednak nie odnosi się do alternatywnych metod analizy pokrewieństwa, takich jak analiza wariantów SNP czy techniki Next-Generation Sequencing (NGS). Choć metoda Kinfinder została zaprojektowana jako rozszerzenie klasycznej analizy STR, warto byłoby wskazać, w jakich przypadkach mogłaby być uzupełnieniem, a w jakich konkurencją dla nowszych technologii.

W dyskusji zabrakło odniesienia do analizy sprzężeń między nowo wytypowanymi markerami STR. W przypadku loci STR znajdujących się blisko siebie na chromosomie może dochodzić do dziedziczenia haplotypowego, co wpływa na ich niezależność statystyczną. Brak tej analizy utrudnia ocenę przydatności zestawu Kinfinder w badaniach pokrewieństwa oraz w analizach statystycznych stosowanych w genetyce sądowej.

W pracy podkreślono wysoką jakość amplifikacji markerów STR, jednak nie przeanalizowano stabilności tych markerów w różnych typach materiału biologicznego. W kontekście identyfikacji osób zmarłych istotne byłoby sprawdzenie, czy amplifikacja jest równie efektywna w próbkach krwi, śliny, kości czy włosów.

6. Bibliografia

Ocena bibliografii wypada pozytywnie – praca zawiera 107 pozycji literaturowych, w tym 28 pozycji pochodzi z lat 2019–2024, co stanowi około 26% całkowitej liczby źródeł. Pozostałe 79 pozycji obejmuje wcześniejsze publikacje, w tym kluczowe prace z zakresu genetyki sądowej, analizy STR oraz metod sekwencjonowania.

Bibliografia obejmuje zarówno klasyczne prace, jak i najnowsze publikacje, jednak brakuje cytowanych dokumentów wyznaczających międzynarodowe standardy walidacji markerów STR.

Chociaż 26% literatury pochodzi z ostatnich 5 lat, co świadczy o aktualności badań, warto zauważyć, że pewne kluczowe aspekty pracy, takie jak walidacja metod STR według standardów ISFG, SWGDAM czy EDNAP, mogłyby zostać lepiej uzupełnione o odniesienia.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Wojciecha Łuczaka stanowi istotny wkład w rozwój metod genetycznych w analizie pokrewieństwa. Opracowana metoda Kinfinder wykazuje wysoką efektywność, a jej wdrożenie w laboratorium potwierdza praktyczne znaczenie badań.

Mimo licznych zalet, praca zawiera pewne niedociągnięcia, w tym brak pełnej analizy statystycznej markerów STR oraz niektórych testów walidacyjnych wymaganych w genetyce sądowej. Nie wpływa to jednak na ogólną wartość naukową pracy, która spełnia wymogi stawiane doktoratom wdrożeniowym.

Ocena końcowa

Po zapoznaniu się z rozprawą stwierdzam, że spełnia ona wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 Ustawy o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018

(Dz.U. 2023 poz. 742) i wnoszę o dopuszczenie Pana mgr Wojciecha Łuczaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Podpis recenzenta

dr hab. n. oed. Magdalena Spólnicka

