

Gdańsk, 20 września 2021 r.

dr hab. n. med. Krzysztof Rębała
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3A
80-210 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kukli-Bartoszek
**„Genetic prediction of human pigmentation characteristics – implementation
of the HIrisPlex-S predictive tool and searching for improvements”**
sporządzona zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki biologiczne
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
z dnia 29.06.2021 r.

Badania nad predykcją cech wyglądu fizycznego człowieka na podstawie polimorfizmu DNA stanowią obecnie bardzo intensywnie rozwijającą się gałąź genetyki sądowej. Opracowany w 2011 r. zestaw IrisPlex umożliwiał przewidywanie koloru oczu na podstawie genotypu 6 markerów SNP. W 2013 r. zestaw ten został poszerzony o 18 markerów SNP, tworząc nowy zestaw o nazwie HIrisPlex do jednoczesnej predykcji koloru oczu i włosów. Wdrożenie, walidacja i praktyczne wykorzystanie nowego zestawu o nazwie HIrisPlex-S, obejmującego kolejnych 17 markerów SNP i opracowanego pod kątem jednoczesnej predykcji koloru oczu, włosów i skóry na podstawie analizy DNA, a także zidentyfikowanie jego słabych stron i poszukiwanie możliwości jego udoskonalenia, stały się tematem przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

Oceniana praca składa się z 6 wieloautorskich artykułów naukowych, opublikowanych w latach 2018–2021 w czasopismach z listy filadelfijskiej, w tym 5 artykułów opublikowanych w czasopiśmie „*Forensic Science International: Genetics*”, będącym wiodącym czasopismem naukowym z kategorii „*Medicine, legal*”, obecnie klasyfikowanym na pierwszym miejscu spośród 17 czasopism przypisanych do tej kategorii. Do publikacji dołączone zostały oświadczenia współautorów o indywidualnym udziale w powstaniu pracy, a także streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, dyskusja oraz wydruki załączników opublikowanych online jako uzupełnienie artykułów naukowych. Cała rozprawa, z wyjątkiem wspomnianego streszczenia, przygotowana została w języku angielskim.

Pierwsza publikacja wchodząca w skład recenzowanej dysertacji dotyczy opracowania zestawu HIrisPlex-S do jednoczesnej predykcji koloru oczu, włosów i skóry na podstawie analizy DNA, opierającej się na minisekwencjonowaniu z użyciem zestawu SNaPshot (Thermo Fisher Scientific) i elektroforezie kapilarnej, który to zestaw stanowi uzupełnienie opracowanego wcześniej zestawu HIrisPlex do przewidywania koloru oczu i włosów. Autorzy wykazali, że zestaw ten charakteryzuje się wysoką czułością i spełnia wszystkie wymagania

niezbędne do jego praktycznego stosowania w genetyce sądowej. Opracowany test HirisPlex-S stanowi pierwszy zwalidowany pod kątem badań genetyczno-sądowych zestaw do przewidywania koloru skóry na podstawie polimorfizmu DNA, a także pierwszy zwalidowany zestaw do jednoczesnej predykcji koloru oczu, włosów i skóry.

W drugiej publikacji, która wchodzi w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej, z uwagi na niską przepustowość badania opartego na minisekwencjonowaniu i elektroforezie kapilarnej opracowano rozwiązanie pod kątem dostosowania testu HirisPlex-S do dwóch najczęściej używanych technologii masowego sekwencjonowania równoległego (MPS), tj. Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific) i MiSeq (Illumina). W odróżnieniu od pierwotnie opracowanego testu HirisPlex-S wykorzystującego minisekwencjonowanie i elektroforezę kapilarną, wymagającego dwóch niezależnych amplifikacji, nowo opracowane zestawy HirisPlex-S wykorzystujące technologię MPS umożliwiają badanie wszystkich 41 markerów SNP w pojedynczym teście. Autorzy wykazali, że zestaw HirisPlex-S oparty na technologii Ion Torrent charakteryzuje się wyższą czułością w porównaniu do technologii MiSeq (100 pg vs. 250 pg DNA). Ponadto opracowano protokół bioinformatyczny do półautomatycznej analizy wyników sekwencjonowania i zaproponowano innowacyjne narzędzie do separacji mieszanin DNA pochodzących od dwóch osób.

W kolejnej publikacji mgr Kukla-Bartoszek wykazała przydatność testu HirisPlex-S opartego na technologii Ion Torrent do analizy zdegradowanego DNA izolowanego z kości pod kątem wykorzystania w badaniach identyfikacyjnych w przypadkach, kiedy nie jest dostępny materiał porównawczy. Badany DNA pochodził z 63 próbek kostnych, dla których interwał pośmiertny wynosił od 1 do 78 lat. Doktorantka wykazała możliwość uzyskania pełnych profili w zakresie markerów SNP wchodzących w skład testu HirisPlex-S z zaledwie 49 pg DNA oraz możliwość predykcji cech pigmentacyjnych nawet w przypadku profili częściowych. Wskazała również na konieczność ponownego zaprojektowania starterów dla 3 markerów SNP służących do predykcji koloru skóry, dla których regularnie nie uzyskiwano genotypów w przypadku zdegradowanego DNA izolowanego z kości.

W następnym etapie, który zaowocował kolejnymi 3 publikacjami naukowymi z doktorantką jako pierwszą autorką, mgr Kukla-Bartoszek zajęła się identyfikacją ograniczeń i możliwością udoskonalenia predykcji cech pigmentacyjnych człowieka. W pierwszym z 3 wspomnianych artykułów doktorantka zbadała wpływ zjawiska ciemnienia włosów w okresie dzieciństwa na dokładność predykcji koloru włosów, wykazując, że u większości z 476 dzieci z populacji polskiej, które włączono do projektu i u których doszło do ciemnienia włosów wraz z wiekiem, zestaw HirisPlex przewiduje kolor włosów obserwowany we wczesnym dzieciństwie. W kolejnej publikacji opracowała model do predykcji piegów w oparciu o analizę polimorfizmu 97 markerów SNP wykazujących związek z cechami pigmentacyjnymi u 960 osób z populacji polskiej. W ostatniej pracy, wieńczącej cykl publikacji stanowiących rozprawę doktorską mgr Kukli-Bartoszek, doktorantka zidentyfikowała 27 nowych markerów SNP, wykazujących związek z kolorem oczu, które wraz ze 114 znanymi wariantami genetycznymi odpowiedzialnymi za zróżnicowanie cech pigmentacyjnych poddała modelowaniu predykcyjnemu w oparciu o genotypy i fenotypy 849 osób z populacji polskiej, wskazując na wysoki potencjał markera rs2253104 zlokalizowanego w obrębie genu *ARFIP2* w zwiększeniu dokładności przewidywaniu koloru oczu u ludzi.

Wszystkie artykuły naukowe wchodzące w skład ocenianej rozprawy doktorskiej stanowią prace eksperymentalne, które przed publikacją zostały zrecenzowane przez kompetentnych recenzentów. Z tego względu swoje uwagi ograniczę do streszczenia, wstępu, dyskusji i oświadczeń współautorów.

Doktorantka w swojej dysertacji biele posługuje się naukowym językiem angielskim, praca napisana jest bardzo starannie i praktycznie bez błędów, czyta się ją z przyjemnością. Niestety, nie można tego samego powiedzieć o krótkim streszczeniu w języku polskim, w którym pojawiają się sformułowania o charakterze kalek z języka angielskiego, do złudzenia przypominających przetłumaczone przez automatyczny translator zdania ze streszczenia w języku angielskim. Przykładem jest sformułowanie „testy genetyczne pokrywające wszystkie 41 markerów”. W języku polskim czasownik „pokrywać” ma wiele znaczeń, jednak żadne z nich nie pasuje do cytowanego fragmentu. Zamiast tego należałoby napisać o testach obejmujących lub zawierających wszystkie 41 markerów. Kolejne sformułowanie „wyniki dały obszar do dalszych badań” również nie brzmi dobrze, gdyż zwrotu „dać obszar do badań” w języku polskim się nie używa. Zamiast tego należałoby napisać, że wyniki dały podstawy albo impuls do dalszych badań. Z kolei zwrot „polskie próbki” jest bardzo dużym skrótem myślowym, który, żeby był w pełni poprawny i zrozumiały, należałoby zastąpić bardziej opisowym sformułowaniem „próbki DNA osób z populacji polskiej”.

We wstępie do dysertacji doktorantka profesjonalnie wprowadza w temat predykcji cech wyglądu człowieka na podstawie analizy DNA, przedstawiając stan wiedzy przed rozpoczęciem własnych badań, przy czym na pierwszej stronie wstępu pojawia się pojęcie „*single nuclear polymorphisms*” (pojedyncze polimorfizmy jądrowe), które nie jest używane w języku naukowym. Autorce chodziło o pojęcie „*single nucleotide polymorphisms*” (polimorfizmy pojedynczego nukleotydu).

Kolejna istotna uwaga dotyczy oświadczeń współautorów publikacji „*The challenge of predicting human pigmentation traits in degraded bone samples with the MPS-based HIrisPlex-S system*”. Z oświadczenia doktorantki wynika, że uczestniczyła ona w przygotowaniu manuskryptu („*I participated in the manuscript preparation*”), co sugeruje udział w tym etapie pracy więcej niż jednej osoby, natomiast żaden inny współautor nie przyznaje się do napisania lub udziału w napisaniu artykułu.

Moją uwagę zwrócił również stosunkowo niewielki udział doktorantki w dwóch pierwszych publikacjach. W pierwszej z 6 publikacji wchodzących w skład recenzowanej dysertacji mgr Kukla-Bartoszek jest na szóstym miejscu wśród 12 autorów. Jej udział w powstaniu pracy, szacowany na 3%, polegał na genotypowaniu próbek do badań walidacyjnych i wygenerowaniu wyników predykcji pod kątem porównania genotypów uzyskanych przy użyciu zestawu HIrisPlex-S w 5 różnych laboratoriach badawczych uczestniczących w projekcie. W drugiej publikacji mgr Kukla-Bartoszek jest piątym spośród 19 współautorów. Jej główną rolą było genotypowanie próbek do badań walidacyjnych i wygenerowanie wyników predykcji. Jej udział w powstaniu pracy został oszacowany na poziomie 5%.


Wszystkie moje uwagi nie umniejszają jednak znacząco wartości pracy naukowej mgr Kukli-Bartoszek. Mimo że jej wkład w powstanie dwóch pierwszych publikacji naukowych opublikowanych w czasopiśmie „*Forensic Science International: Genetics*” jest niewielki i dotyczył jedynie udziału w większych projektach, był on bardzo ważny do osiągnięcia celów

postawionych sobie przez naukowców kierujących projektem. Należy również podkreślić, że w kolejnych 4 publikacjach doktorantka jest głównym badaczem, na co wskazuje pierwsza pozycja na listach współautorów oraz udział w powstanie publikacji, szacowany na poziomie od 30% do 52%. Już te 4 publikacje pierwszego autorstwa mgr Kukli-Bartoszek mogłyby stać podstawą dysertacji doktorskiej na bardzo wysokim poziomie.

W podsumowaniu pragnę podkreślić ogromną wartość naukową i praktyczną ocenianej rozprawy doktorskiej jako oryginalnej i nowatorskiej pracy, która spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule zawodowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i w pełni uzasadnia nadanie mgr Magdalenie Kukli-Bartoszek stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego oraz potwierdza imponującą wiedzę doktorantki w jej dyscyplinie naukowej, umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej i opanowanie wielu zaawansowanych technik laboratoryjnych i metod analizy wyników. Tym samym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Magdaleny Kukli-Bartoszek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość ocenianej rozprawy, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o jej wyróżnienie.

dr hab. n. med. KRZYSZTOF RĘBAŁA

10877


DIAGNOSTA LABORATORYJNY
specjalista laboratoryjnej genetyki medycznej
i laboratoryjnej genetyki sądowej