

OPONENTSKÝ POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

zpracovala: Mgr. Halina Šimková

název práce: Detection of CNV polymorphisms in regions of forensically significant STR loci in the Czech population

autorka práce: Lejla Salihagić

Předložená diplomová práce studuje možnost užití metody ddPCR (droplet digital PCR) k hlubšímu studiu trialelických STR patternů vzácně se vyskytujících ve standardních autozomálních identifikačních STR profilech.

Výrazně vyzdvihují jazykovou úroveň práce a výborné vyjadřovací schopnosti autorky – text je hutný, logický, a přitom zcela srozumitelný a čtivý. Teoretická část je zpracována přehledně, je uvedeno vše podstatné. Počet věcných chyb, které unikly autorčině pozornosti při kontrole, je minimální (zmíním str. 17 – „If the three alleles in Type 2 pattern have the same number of repeats, one large peak is generated on electropherogram, which is almost undistinguishable from normal heterozygote.“ – má být nepochybně *homozygote*, nicméně zjevně jde jen o upsání se, nikoliv neznalost). Práce cituje dostatečné množství původních pramenů, formát citací je správný.

Cílem práce bylo optimalizovat ddPCR protokol pro detekci počtu kopií (CNV) v oblastech těsně vázaných k STR lokusům a otestovat funkčnost metody na reálných forenzních vzorcích, v nichž byly předchozí fragmentovou analýzou detekovány trialelické patterny. Tento cíl je v práci srozumitelně definován a je splnitelný, koncept zpracování je jednoduchý a logický, práce má v případě úspěšného dosažení cíle jednoznačný praktický výstup.

Postup zpracování práce je z mého pohledu v zásadě správný a po technické/technologické stránce nemám žádné výhrady, mám ale některé námitky či připomínky k designu a interpretaci dat, které uvádím v bodech:

- **Výběr suspektních vzorků** – v práci je jako zvolené kritérium výběru vzorku pro testování uvedeno pouze „Electropherogram indicates potential presence of tri-allelic pattern...“, což nepochybně není z hlediska požadavků na experimentální design dostatečné. Mělo by být lépe popsáno, co už bylo považováno za potenciální tri-alelický pattern a co ještě nikoliv, zvláště s ohledem na to, že metoda ddPCR tyto triplikace zhusta nepotvrdila.
- **Srovnání původních STR profilů s daty z ddPCR** – v práci nejsou (ani jako příloha) uvedeny STR profily všech suspektních vzorků; jsou zde formou obrázku (Figure 11, 12, 13, 14) výběrově ukázány pouze ty trialelické STR patterny, u kterých poskytla ddPCR vysokou hodnotu. Nelze si tak vůbec udělat představu o tom, jak moc koreluje data fragmentové STR analýzy a ddPCR; není nijak statisticky zpracována ani diskutována souvislost mezi *Peak Area Ratio* v STR profilu a *Copy Number/Ratio STR:AP381* u ddPCR. To je velká škoda, protože tím zcela mizí možnost odpovědět na otázku, zda se nějak liší trialelické STR patterny vzorků, u kterých ddPCR ukázala vyšší CN, od zbytku. Viz otázka na studentku.
- **Interpretace (srovnání souborů suspektních a kontrolních vzorků)** – výsledek M-W U testu říká, že nelze zamítnout hypotézu, že získané CN jsou v obou souborech stejně distribuovány, a mezi soubory tedy v tomto ohledu není rozdíl. To lze ale interpretovat jen dvěma způsoby. První možné vysvětlení (autorka kolem něj v diskusi krouží, ale nepojmenovává ho přímo) je, že metoda na daném typu vzorků nefunguje, tedy v zásadě nerozlišuje mezi vzorky s dvěma a třemi kopiemi studovaného místa. Druhé (autorkou nezmiňované) je, že původní trialelické patterny mohou být často spíše artefakty a nemusejí odrážet skutečný počet kopií. Je škoda, že se tomuto autorka nijak dále nevěnovala – minimálně tak, že přičítá-li velký rozptyl ve vzorcích získaných z KÚ jejich nízké kvalitě, bylo by vhodné ověřit toto tvrzení analýzou souboru kvalitních vzorků pomocí již optimalizované ddPCR, to se ale nestalo. Viz otázka na studentku.

Otázky:

- 1) Liší se nějak trialelické STR patterny těch vzorků, u kterých ddPCR ukázala vyšší hodnotu ddPCR, než trialelické patterny zbylých vzorků? Můžete tuto existenci či naopak neexistenci rozdílu nějak komentovat?
- 2) Jak byste postupovala, pokud byste měla podezření, že původní trialelické STR patterny, zjištěné na KÚ, jsou spíše artefakty a skutečný genotyp je bi-alelický?

Přes některé uvedené výhrady považuji práci jako celek za zdařilou, byť se nemohu zbavit dojmu, že byla nakonec úspěšána, a doporučuji ji k obhajobě. Práci navrhuji hodnotit známkou **velmi dobře**.

V Plchu 6.9.2022

Halina Šimková