Oponentský posudek diplomové práce

Název: **STR genotypizace středověké české populace: polykulturní lokalita Mlékojedy (okr. Litoměřice)**
Autorka: **Veronika Brynychová**
Vedoucí práce: **Mgr. Martin Hájek, Ph.D.**
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra antropologie a genetiky člověka, 2010

Předkládaná diplomová práce Veroniky Brynychové spadá do kategorie prací navázaných do většího multidisciplinárního výzkumného celku, v tomto případě komplexní analýzy raně středověkého pohřebiště. Genetickou analýzu kosterních nálezů lze jistě směle označit za jeden z hitů současné archeologie (vzhledem k možnostem, jež nabízí), ovšem překypující celou řadou úskalí, těžkostí a záludností, jak se měla možnost přesvědčit i autorka oponované práce.

U tohoto typu studií bývá někdy tendencí (a to bohužel i ze strany samotných autorů) soustředit se pouze na vlastní výsledek, pokud možno co nejúspěšnější a nejoslnivější. To je ovšem velmi chybné a často to vede k odborným pochybením, někdy i zásadním. **Mé hodnocení práce se tedy v žádném případě nebude odvíjet od toho, jak „úspěšná" analýza byla**, z kolika procent zkoumaného materiálu byla získána analyzovatelná DNA a jak líbivé novinové titulky by se mohly na základě provedené studie objevit v Litoměřickém deníku (*„Mlékojedští jsou potomky královny ze Sáby, říkají vědci"*). **To, co je pro hodnocení podstatné, je především způsob, jakým se autorka vyrovnala se zmiňovanými úskalími, těžkostmi a záludnostmi.**

Autorka se v práci zabývá molekulárně genetickou analýzou pohlaví (amelogeninu) a vybraných autozomálních STR lokusů (TH01, D21S11, D8S1179 a vWA) z materiálu skeletálních pozůstatků 23 jedinců subadulního věku z různých částí pohřebiště. **Cílem práce byla tzv. „genetická charakteristika" tohoto souboru, zahrnující zaprvé stanovení genetické diverzity a distribuce alel včetně srovnání s již publikovanými obdobnými studiemi z jiných nalezišť a též s recentní populací, zadruhé bližší určení možné příbuznosti těchto jedinců.**

První ze stanovených cílů považuji za jasný a legitimní, ke druhému – hodnocení příbuznosti – bych měla námitky. Zpracovávaný materiál a zvolená metodika totiž již *a priori* dávají mizivou naději na jeho splnění. I u tak vysoce polymorfních lokusů, jakými jsou STR, je při určování možného biologického vztahu třeba k dosažení smysluplné hladiny spolehlivosti analyzovat více těchto markerů. 4 STR lokusy mohou stačit nanejvýše na vyloučení vztahu-rodič potomek (a i zde bude celá řada falešných inkluzí, tj. vztah nebude vyloučen, ačkoli ve skutečnosti hypotéza o něm neplatí). Potvrzení rodičovství není za této situace možné, relevantnější hodnocení jakýchkoli nepřímých příbuzenství není možné, a to ani u bezproblémových recentních vzorků. Vzhledem k tomu, že se jedná o soubor subadultů, nelze mezi nimi přímé příbuzenství (rodič-potomek) předpokládat;

očekávat naopak lze úplné a poloviční sourozenectví, potažmo vzdálenější příbuzenské vztahy. Rozpoznání úplných sourozenců bude zcela nespolehlivé, rozpoznání polovičních sourozenců už bude spadat do kategorie sci-fi. Připojí-li se k tomu ještě neduhy analýzy aDNA, tedy neúspěch při analýze některých lokusů a nejistota správného genotypování způsobená drop-outy a drop-iny, **je vytyčený cíl za daných okolností prakticky nedosažitelný**. Analýzu by bylo třeba rozšířit o několik dalších STR markerů, výborné by bylo samozřejmě doplnění o HVR mtDNA, případně Y-chrz STR/SNP markery. Je ovšem nasnadě, že by to znamenalo několikanásobné navýšení vynaložených finančních prostředků, což zřejmě nebylo možné.

Práce působí velmi uceleným dojmem, je logicky členěna do standardních kapitol a obsahuje bohatý doplňkový materiál v podobě příloh. Je psána srozumitelně, odborně na dobré úrovni, stylisticky působí příjemně. Autorce bych vytkla pouze občasné pravopisné chyby hrubšího zrna (soubor tvořili děti – s. 26, 60, publikované výzkumy zaznamenali snížení – s.61, ranně středověký – s. 10, 58...), a také její dosti liberální přístup k používání interpunkce, což jsou ovšem v zásadě marginálie.

V Úvodu se autorka věnuje jednak popisu zdrojové archeologické lokality, jednak problematice analýzy tzv. aDNA. **Tato teoretická část je zpracována kvalitně a pokrývá všechna teoretická východiska práce. Čtenář neznalý problematiky zde získá ucelenou a logicky členěnou informaci, podanou přehledně a srozumitelně**. Zcela drobounkou výtku zaslouží uvedení nesprávného názvu instituce na str. 10 (*Ústav archeologie a památkové péče severozápadních Čech*, správně *Ústav archeologické památkové péče severozápadních Čech*) a užití zastaralejší literatury v kap. 1.2.1, týkající se historie osídlení na Litoměřicku (Zápotocký 1965) – vhodnější by bylo např. *Kotyza, O. – Smetana, J. – Tomas, J. a kol. 1997: Dějiny města Litoměřic. Litoměřice, s. 95-98.* V části věnované genetické problematice poukazuji pouze na dvě drobnější nepřesnosti, a to na nesprávný termín *Jednoduché nukleotidové polymorfizmy* na str. 14 (termín se nepoužívá, správně *jednonukleotidové polymorfismy* nebo nepřekládat) a na nesprávnou formulaci na str. 17 „*Konvenční způsob odhadování příbuznosti genetickými metodami mezi dvěma jedinci je založen na pravděpodobnosti výskytu dvou daných genotypů za předpokladu určitého příbuzenského vztahu*“ – správně *...na pravděpodobnosti dané míry shody těchto genotypů*... (zní to podobně, statisticky je to ovšem zcela jinde).

V části Materiál a metody je popsáno nálezové místo, výběr jedinců zavzatých do testování, charakter kosterního materiálu, způsob výběru vzorků a dále jsou podrobně popsány užité metody analýzy DNA. **Tato pasáž je opět přehledně a kvalitně zpracována, v principu může sloužit jako velmi dobrý „manuál“ pro autorčiny následovníky**. To, že autorka namísto komerčně dostupných (a finančně velmi nákladných) specializovaných kitů užívala k analýze jejich individuálně připravované alternativy, bylo v tomto případě nanejvýš vhodné, neboť jí to pomohlo osvojit si celou řadu laboratorních dovedností, například optimalizace PCR včetně vylaďování multiplexových reakcí.

Kapitola Autentizace výsledků se zabývá zcela zásadní oblastí analýzy aDNA, což je ověření pravosti výsledků analýzy. **Přístupy a postupy použité autorkou jsou správné, logické, je zřejmé, že autorka se dobře seznámila s potenciálními riziky a snažila se jim vyhnout účinnými opatřeními.** V této souvislosti mám dotaz pouze ke konstatování na straně 36 a obdobnému konstatování na straně 47 – *„Amplifikace byly opakovány v případě výskytu silné inhibice s vyšším počtem jednotek polymerázy a/nebo s přidáním bovinního sérového albuminu (BSA, 20 mg/ml, Fermentas) v koncentraci od 0,3–0,8 μg/μl.“* – v práci jsem nenašla (přehlédla?), jak bylo určeno, že se u negativního výsledku PCR jedná o inhibici a nikoli o nepřítomnost analyzovatelné DNA, případně jiný problém.

Část Výsledky přehledně a podrobně popisuje získané výsledky včetně logických „statistických výstupů“, jako je úspěšnost amplifikace. **Autorka zde principiálně dobře pracuje s neidentickými výsledky analýzy paralelních vzorků, hodnotí je kriticky a správně rozpoznává nespolehlivá data od spolehlivých.** Opět je nutno konstatovat, že pokud by měla možnost použít ještě další metody, výrazně by to mohlo napomoci spolehlivosti dat – např. u vzorků s mírně nejistým určením pohlaví by bylo ideální doplnit studii o analýzu Y-markerů. Pasáž 5.2 týkající se zjištěné genetické diverzity a srovnání s jinými datovými soubory je nutno považovat za výhradně „cvičnou“, sloužící k osvojení daných postupů, jako skutečný výstup vědecké studie by neměla obstát (byť se tak u obdobných studií občas děje). Je postavena na datech 12 jedinců, což je pro tento typ hodnocení opravdu málo, aplikované statistické postupy ztrácejí svou vypovídací hodnotu. (Pro ilustraci: heterozygozita lokusu TH01 se u recentních evropských populací pohybuje v rozmezí 0,76-0,80. Budeme-li mít soubor 12 jedinců, pak u něj nikdy nemůžeme zjistit heterozygotnost spadající do tohoto rozmezí: bude-li heterozygotních 9 z 12, bude H_O=0,75, bude-li heterozygotních 10 z 12, bude H_O=0,83).

V Diskusi se autorka zcela správně soustřeďuje spíše na neúspěšná a problematická místa studie a analyzuje jejich možné příčiny. Zároveň odhaduje, které faktory a alternativy postupů úspěšnost analýzy zlepšovaly, a navrhuje možná řešení do budoucna, což je nejlepší cesta k budoucím laboratorním úspěchům. Prosím o doplňující komentář ke snímku gelu na obr. 2 na str. 58 – ukázka kontaminace, neboť mi připadá krajně nepravděpodobné, aby u kontaminované negativní amplifikační kontroly (NKP – na snímku zcela vpravo) s tak silným signálem Y-fragmentu X-fragment zcela absentoval.

Seznam literatury je obsáhlý a je zjevné, že autorka se tématu podrobně věnovala a pracovala s celou řadou původních odborných studií.

Přílohy jsou zapracovány jako podstatná součást práce a lze v nich nalézt velké množství podrobných informací. Výhradu mám ke kvalitě fotografické dokumentace vzorků (autorství není uvedeno) – mají-li mít snímky skutečnou dokumentační hodnotu a obsahovat nezkreslenou vizuální informaci, musí být dodrženy určité zásady (nepoužívání integrovaného, ale externího bipolárního či cirkulárního blesku, zásadně vkládání měřítka do roviny ostření kolmo na osu objektivu, nikoli před či za, u objektů s dutinou v ose objektivu užití vyššího clonového čísla pro dosažení potřebné hloubky ostrosti atd.) Dále prosím o

doplňující komentář k obrázku č. 13 na straně 14 příloh – co je výrazný band na cca 60 bp v negativní PCR kontrole (NKP)?

Přes uvedené výtky, připomínky a poznámky (povinnost to oponentova) je předložená diplomová práce studentky Veroniky Brynychové zdařilá, studentka plně prokázala schopnost orientovat se v problematice, kriticky hodnotit data, analyzovat problémy a navrhovat jejich řešení, a práce je tudíž dobrým základem pro budoucí samostatnou vědeckou práci autorky. Jako oponentka ji ráda doporučuji k obhajobě.

V Plchu 7.září 2010

Halina Šimková