

## Oponentský posudek dizertační práce

### Význam různých zdrojů a sekvenačních protokolů při zvyšování přesnosti NGS analýz v diagnostických aplikacích

Autor: **Mgr. Kateřina Kvapilová**

Studium: Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Oponent: prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D., Středoevropský technologický institut (CEITEC) a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

V rámci svojí dizertační práce autorka vyhodnocovala význam různých druhů biologického materiálu jako zdroje gDNA (genomové DNA) a různých sekvenačních protokolů (od přípravy sekvenační knihovny přes vlastní sekvenování až po analýzu dat) pro přesnost NGS analýzy v diagnostických aplikacích. Práce má dva základní cíle a je tvořená dvěma nezávislými studiemi, které jsou zaměřeny na řešení těchto dvou cílů. První studie byla prováděna v době pandemie Covid-19 a autorka se zde zaměřila na vývoj a srovnávání různých protokolů sekvenování nové generace (NGS) vhodných pro analýzu celého genomu viru SARS-CoV-2. Ve druhé studii následně ověřovala využitelnost slin jako zdroje lidské genomové DNA (gDNA), přičemž srovnávala varianty identifikované pomocí celoexomového sekvenování (WES) a celogenomového sekvenování (WGS) při použití gDNA získané ze slin s variantami nalezenými pomocí WES a WGS z gDNA získané z periferních leukocytů.

Práce o rozsahu 89 stran je členěná standardním způsobem a její součástí je také úctyhodných 222 literárních odkazů, vesměs recentních. Publikační aktivitu související s tématem dizertační práce představují 2 původní práce *in extenso* v časopise *Diagnostics* (cíl číslo jedna, IF=3,6, Q2, studentka je členkou autorského týmu, originální práce) a *BMC Genomics* (cíl číslo dva, IF=4,4, Q1, studentka je první autorkou, originální práce). Kvalitu publikačních výstupů, především toho druhého, hodnotím jako velice dobrou.

Dizertační práce a obě dvě studie, které obsahuje, mají díky svému zaměření společný teoretický úvod, který je postupně členěn na kapitoly zaměřenou na historii sekvenování

**Masarykova univerzita, Lékařská fakulta**

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 2910, E: [info@med.muni.cz](mailto:info@med.muni.cz), [www.med.muni.cz](http://www.med.muni.cz)

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

V odpovědi, prosím, uvádějte naše číslo jednací.

lidského genomu, srovnání různých sekvenačních technologií včetně NGS a různých variant jejich využití. Navazují kapitoly zaměřené na vlastní experimentální postupy sekvenace od přípravy sekvenační knihovny po bioinformatickou analýzu. Závěrečná kapitola teoretického úvodu je potom zaměřena na využití NGS v diagnostice a hlavní metodická úskalí, kterým v této oblasti čelíme. Teoretický úvod o rozsahu 23 stran obsahuje také několik souhrnných tabulek a ilustračních schémat, je přehledný, vystihuje podstatu dizertační práce, umožňuje potřebný vhled do problematiky a dokládá autorčinu dobrou orientaci v teoretických aspektech její dizertační práce. Následují cíle dizertační práce, které jsou definovány jasně, přičemž dva hlavní cíle jsou dále rozděleny na tři, respektive pět podcílů.

Další část práce označená jako Experimenty představuje popis použitých metodických přístupů. Tato část zahrnuje popis souboru klinických vzorků, různé metodiky použité pro přípravu sekvenačních knihoven pro sekvenaci virového genomu (capture vs. amplikonové sekvenování) i lidského genomu/exomu, sekvenaci na různých sekvenátorech (iSeq, MiSeq, NovaSeq 6000) až po detailní popis použitých bioinformatických nástrojů a statistického zhodnocení. Jednotlivé kapitoly zaměřené na metodiku jsou zpracovány dostatečně detailně a umožňují bezproblémové opakování prováděných experimentů a také provádění pokročilé bioinformatické analýzy.

Následují vlastní výsledky práce, které jsou členěny podle jednotlivých cílů a podcílů, jsou uvedeny konkrétně a srozumitelně a doplněny řadou přehledných tabulek. Vzhledem k tomu, že výsledky již byly publikovány v časopisech s impakt faktorem a prošly recenzním řízením, je v nich odkazováno na obrázky uvedené v těchto publikacích. Navazující diskuze je členěná na dva hlavní cíle, kde autorka postupně interpretuje a kriticky hodnotí vlastní výsledky v souvislosti s nejnovějšími poznatky v dané oblasti. Obě části diskutující dosažené výsledky jsou dostatečně detailní a poskytují čtenáři možnost zařadit výsledky práce do kontextu současného stupně poznání. Je diskutován jak metodický přístup, tak konkrétní výsledky. Práce je psána kvalitní angličtinou s minimálním počtem překlepů nebo drobných jazykových nepřesností. Z formálního ani věcného hlediska v práci jsem v práci nenalezl žádné zásadní nedostatky. Za nešťastné považuji použití odkazů na obrázky z originálních publikací autorky. Jejich vložení přímo do vlastní dizertační práce by umožnilo snazší orientaci, větší přehlednost a plynulejší čtení výsledkové části práce.

## **Nové poznatky a jejich využitelnost**

Autorka dospěla k několika novým, především metodicko-technologickým poznatkům, které umožní zdokonalit či zjednodušit použití NGS v mikrobiologické a humánní DNA diagnostice:

- 1) V rámci celogenomového sekvenování viru SARS-CoV-2 prokázala superioritu sekvenačního přístupu založeného na použití technologie capture (vychytávání) nad přístupem založeným na amplikonech.
- 2) Ve druhé studii prokázala, že varianty (SNVs, indels) nalezené pomocí WES a WGS u gDNA získané ze slin a z krve vykazují vysokou míru shody, a to i na úrovni klinicky významných genů definovaných ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics). Tato skutečnost poukazuje na použitelnost slin jako zdroje gDNA v rozsáhlých populačních genetických studiích nebo obecně tam kde je obtížné zajistit vzorek krve.

## **Význam pro společenskou praxi a další rozvoj vědy**

Výsledky práce byly publikovány v časopisech s IF – lze tedy očekávat citovanost. Práce vedla ke vzniku nových poznatků o možnostech aplikace sekvenačních technologií v diagnostice a stane se cenným zdrojem informací pro výzkumníky v daném oboru. Skutečnost, že sliny lze použít jako zdroj gDNA pro WES a WGS ve srovnatelné kvalitě jako v případě plné krve umožní zcela neinvazivní získávání gDNA pro populační genetické studie, ale také pro humánní DNA diagnostiku.

## **Otázky do diskuze**

- 1) Jaké potenciální rizika sebou přináší použití slin jako zdroje gDNA pro účely humánní DNA diagnostiky oproti použití leukocytů periferní krve? Jaká z těchto rizik se Vám podařilo úspěšně vyvrátit ve Vaší práci?
- 2) Přestože míra shody v nalezených SNVs a indels ze slin a plné krve byla vysoká, nebyla absolutní. Byl pokles v přesnosti asociován s nějakými specifickými oblastmi genomu? Dala by se následně tato případná nepřesnost předpovědět v rámci vyhodnocování sekvenačních dat?

## **Závěr**

V závěru svého hodnocení konstatuji, že dizertační práce splňuje požadavky na ni kladené v daném oboru, po stránce obsahové má velmi dobrou úroveň a předkládá nové originální vědecké poznatky v oblasti sekvenačních technologií a jejich využití v rámci mikrobiologické a humánní DNA diagnostiky. Mgr. Kateřina Kvapilová prokázala dostatečné tvůrčí schopnosti a její dizertační práci proto doporučuji k obhajobě, a na základě úspěšné obhajoby, k udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Brně 15/06/2024



prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.  
přednosta Biologického ústavu LF MU  
vedoucí výzkumné skupiny CEITEC MU