

Posudek na bakalářskou práci	
<input type="checkbox"/> školitelský posudek <input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: František Liška Datum: 21. 5. 2021
Autor: Eliška Kopicová	
Název práce: Molekulární podstata vývojových odchylek pohlaví u člověka	
<input checked="" type="checkbox"/> Práce je literární rešerší ve smyslu zveřejněných požadavků (pravidel). <input type="checkbox"/> Práce obsahuje navíc i vlastní výsledky.	
Cíle práce (předmět rešerše, pracovní hypotéza...) Cílem práce je popsat současný stav poznání mechanismů patogeneze poruch vývoje pohlaví u člověka	
Struktura (členění) práce: Po úvodu následují tři oddíly popisující poruchy vývoje pohlaví podle etiologie (chromozomální aberace, monogenní/mendelovská onemocnění a poruchy funkce hormonů). Následuje závěr.	
Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? Literatura je přiměřeného rozsahu a relevantní k zpracovávanému tématu. Formální úroveň však není dokonalá. Formát bibliografie (seznamu literatury na konci práce) je nejednotný a obsahuje chyby. Očividně nebyl ani použit software na organizování citací ani nebyla provedena ruční kontrola před odevzdáním práce. Pro zajímavost dva příklady: 1) Anita K et al. - Anita je křestní jméno. 2) Myslím, že jsem našel i ekvivalent slavného badatele O. Uplavici - viz citace "Geschlechtsentwicklung, D., Verlag, M., & Zabransky, S. (2013). Proceedingband 2013."	
Pokud práce obsahuje (nadstandardně) i vlastní výsledky, jsou tyto výsledky adekvátním způsobem získány, zhodnoceny a diskutovány? Práce neobsahuje originální výsledky	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Obrazová dokumentace je přiměřená, z mého pohledu by mohla být i rozsáhlejší, ale jsem si vědom toho, že jsem osobně nadměru vizuální typ. Proto mi vadí i nízké rozlišení obrázků, které je mnohdy hluboko pod doporučovaným minimem 300 dpi. Množství překlepů je poměrně velké. Mnohé formulace jsou neobratné, často jsem se musel podívat do citovaného zdroje, abych pochopil význam.	
Splnění cílů práce a celkové hodnocení: Literární rešerše ohledně chromozomálních abnormalit a monogenních onemocnění je přiměřeného rozsahu a poskytuje dobrý přehled běžnějších i vzácných poruch vývoje pohlaví u člověka. Výhrady mám k úrovni popisu patogeneze poruch, která je leckdy nejasná, možná	

i zavádějící (příklady viz v sekci otázky a připomínky oponenta). Bylo by také vhodné lépe oddělit znalosti, které jsme získali přímo studiem lidských onemocnění a pomocí pokusů na zvířatech. Kapitola o hormonálních poruchách mohla být zařazena do monogenních onemocnění, neboť na úrovni onemocnění popisuje právě jen genetické poruchy. Celkově se domnívám, že cíle práce byly splněny a doporučuji ji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky jsou řazeny podle výskytu v textu, a poněkud mi nabobtnaly, prosím tedy o reakci jen na stěžejní připomínky, podle uvážení autorky, tam kde je možno při obhajobě odpovědět na otázku nebo uvést nějakou nejasnost na pravou míru.

- 1) U seznamu zkratk by bylo vhodné buď napsat původní anglickou frázi, např. AHC = adrenal hypoplasia, congenital, nebo alespoň česky uvést přesně jako vrozenou hypoplázi nadledvin (v textu uvedeno jako „hypoplázie nadledvin“).
- 2) anglický slovosled - česky není správně Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrom, ale syndrom Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (neshodný přívlastek patří dozadu)
- 3) "Protein SRY kóduje transkripční faktory rodiny HMG (high mobility group)" správně "Gen SRY kóduje (jeden) transkripční faktor rodiny HMG".
- 4) "dochází tak ke vzniku prospermatogonie." těmto buňkám se tradičně říká gonocyty.
- 5) "ovlivňují diferenciaci Leydigových buněk" - slušelo by se říci, že to dělají pomocí DHH, viz např. Yao HH, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. Genes Dev. 2002 Jun 1;16(11):1433-40. doi: 10.1101/gad.981202. PMID: 12050120; PMCID: PMC186321.
- 6) „5 α -androstenediol“ je patrně androst-5-en-3 β ,17 β -diol (zkráceně 5-androstendion, v češtině nepíšeme němé e na konci, a pokud je v daném místě dvojná vazba, nelze mít konfiguraci ani α , ani β), vzhledem k tomu, že se má jednat o metabolit vznikající pomocí 3 α -hydroxysteroid dehydrogenázy.
- 7) U sestupu varlat by bylo dobré zmínit, že zde existuje také částečná závislost na testosteronu, který podmiňuje degeneraci kraniálního ligamenta, INSL3 pak způsobuje diferenciaci kaudálního igamenta v gubernakulum, které provede druhou, aktivní fázi sestupu (závislou na aktivitě buněk hladkého svalu tamtéž).
- 8) Kapitola „Poruchy pohlavních chromozomů“ - slušelo by se podotknout/zdůraznit, že za strukturální aberace mohou zlomy DNA s jejich následnou chybnou opravou, numerické aberace jsou poruchou buněčného dělení. Mozaiky a chiméry mohou obsahovat jak numerické, tak strukturální aberace.
- 9) „Důsledkem chybějícího druhého pohlavního chromosomu dochází ke změně methylace DNA, což hraje významnou roli při genové expresi, také jsou zde objeveny histonové modifikace (Sagi L et al., 2007). Tyto histonové modifikace jsou reversibilní a proměňují konformaci chromatinu což souvisí se změnou jeho exprese. Během posttranslačních modifikací dochází k umlčování za pomoci microRNA (miRNA) (Library et al., 2016). V DNA dochází k hypomethylaci v promotorové oblasti a následným částečným či úplným delecím sekvencí DNA, často se tak stává již v embryu, v rámci embryonálních kmenových buněk. A jsou shodné s úplnou či částečnou delecí sekvencí z DNA z jednoho z X chromosomů. To může mít za následek předčasně selhání vaječníků, kongenitální malformace či aneurysma aorty (Álvarez-Nava & Lanes, 2018).“. Tento odstavec by si zasluhoval mnohem lepší formulaci, až po několikátém přečtení mi došlo, že se patrně bude jednat o to, že u Turnerova syndromu dochází k změně epigenetické regulace zbývajícího chromozomu X:
- 10) "Absence genu SHOX ovlivňuje mnoho projevů Turnerova syndromu, jako je například malý vzrůst. Gen SHOX je spjat s Madelungovou deformitou," ... 1) nejedná se o absenci, jen haploinsuficienci; 2) jako teoretik jsem si musel najít, co to znamená Madelungova deformita - slušelo by se ji několika slovy vysvětlit.
- 11) "U žen a dívek s tímto syndromem se vyskytují dva hlavní projevy, malý vzrůst a ovariální dysgeneze. Ovariální dysgeneze je dále zodpovědná za dílčí projevy jako je primární amenorrhea, opožděný či neúplný vývoj pohlavních znaků, reprodukční porucha a v konečném důsledku i arterioskleróza, kterou ovlivňuje i nižší hladina estrogenu." Zde

- by bylo také vhodné uvést zdroj.
- 12) Klinefelterův syndrom "kdy pravděpodobnost chybného dělení zygoty stoupá v souvislosti s věkem." Jedná se o zygotu nebo o vajíčko, tj. o mozaicismus nebo prostou aneuploidii?
 - 13) "Díky existenci genu SHOX právě v oblasti PAR1 dochází ke klinickému projevu vyšším vzrůstem." ... díky zvýšenému počtu kopií genu SHOX...
 - 14) "poruchy abnormálního vývoje řeči." - takže nakonec přes všechnu snahu je vývoj řeči normální?
 - 15) Superfemale - mají tyto ženy vyšší vzrůst, jak by se dalo očekávat, díky vyššímu počtu kopií SHOX?
 - 16) "Bylo to dokázáno za pomoci řetězové reakce polymerázou s reverzní transkriptázou, SRY tak bylo objeveno v hypotalamu a kůře mozku. Otevřený čtecí rámec lidského genu SRY lze rozdělit do tří oblastí, těmi jsou HMG oblast, oblast C-terminální domény a oblast N-terminální domény. Do skupiny HMG patří gen SOX9. Doména HMG s transkripčním faktorem SOX9 má afinitu k TAACAAT vazebnému motivu DNA, dochází tak k zvýšené fosforylaci proteinkinázou A, což vede k translokaci do jádra (A. Jo et al., 2014)". 1) exprese v mozku nemusí být prvoplánově relevantní, hlavně by neměla být zmíněna, aniž je zmíněna exprese v prekurzorech Sertoliho buněk. Mimochodem exprese v mozku byla objevena pomocí RT-PCR, tedy po reverzní transkripci RNA a polymerázové řetězové reakci, není mi nutné vymýšlet novou terminologii. Průkaz pomocí PCR je mimochodem velice slabý, spousta genů vykazuje nízkou úroveň exprese v mnoha tkáních, kde patrně nemá žádnou funkci, neboť úroveň exprese je nízká, jsou to jednotky transkriptů na buňku, často ani nedochází k translaci. 2) SRY a SOX9 jsou dva různé geny, jejichž proteinové produkty mají doménu typu HMG pro vazbu na DNA. V textu to vypadá, jakoby SOX9 byl produktem SRY. Asi by v tomto odstavci neměl být SOX9 vůbec zmíněn.
 - 17) "rozvíjí se namísto Sertoliho buněk samičí buňky" to by měly být konkrétně folikulární buňky, nebo jsem ve škole nedával pozor?
 - 18) Obr. 4 obsahuje lidský protein SRY, nikoli gen
 - 19) "Gen SOX9 patří do rodiny HMG boxu a je SRY závislý" Exprese SOX9 je přímo indukována SRY v Sertoliho buňkách. V témže oddílu je uvedeno mnoho informací ke gen SRY. Proč nejsou v oddílu věnujícímu se právě SRY?
 - 20) "U jedinců s karyotypem XX a mutací genu SOX9 vzniká zvrát female-to-male, tedy zvrát v mužské pohlaví, dochází ke zvýšení exprese genu. Tento projev se nazývá Campomelická dysplázie. U jedinců s karyotypem XY a mutací genu SOX9 vzniká zvrát male-to-female, tedy zvrát v ženské pohlaví, dochází ke snížení exprese genu (Sry & Sry, n.d.), tento projev se nazývá Swyerův syndrom.". Nikoli, kampomelická dysplázie je způsobena haploinsuficiencí SOX9, Swyerův syndrom je způsobený také ztrátovými mutacemi SRY a dalších genů (viz OMIM 400044), včetně delece regulačního elementu SOX9, to vše vede k ženskému fenotypu u osob s karyotypem 46, XY, Naproti tomu duplikace nebo triplicace regulačního elementu SOX9 vede k opačné poruše pohlaví (viz OMIM 278850). Zajímavé je, že kritický úsek pro deleci a ztrátu exprese u poruchy XY->žena je odlišný oproti úseku, jehož zvýšení počtu kopií zvýší expresi SOX9 a vede tak k poruše XX->muž (viz OMIM 608160, a literatura tam se nacházející).
 - 21) "Pokud nedojde k produkci anti-Müllerického hormonu do prvních osmi týdnů těhotenství, automaticky se začne vyvíjet Müllerův vývod a buňky Wolffových vývodů které jsou odpovědné za vznik mužského reprodukčního systému podlehnou apoptóze.". 1) proč by to nemohl být jen Müllerův vývod. 2) involuce Wolffových vývodů souvisí s nedostatečnou produkcí testosteronu, na AMH by měla být tedy alespoň zčásti nezávislá.
 - 22) "AMH je exprimováno i granulocími buňkami ovarií" - jak to souvisí s tím, že je Müllerův vývod u ženských embryí zachován?
 - 23) "Při nedostatku AMH v průběhu vývoje může dojít k mutaci." To je obrácení kauzality na hlavu, jakási zvrácená forma Lamarckizmu. Proč by nešlo jednoduše napsat, že perzistence Müllerových vývodů (OMIM 261550) je způsobena ztrátou funkce AMH

- nebo jeho receptoru?, vyskytuje se pochopitelně u mužů (karyotyp 46, XY, varlata, mužský externí genitál)
- 24) "Při vyšetření se prokáže přítomnost Mülleriánského vývodu, který je pozůstatkem vývojové vady a zároveň průkazem karyotypu 46,XY."
 - 25) Jsou to ženy a mají dělohu a vejcovody, které se z Mülleroва vývodu vyvinuly. Jsou schopny otěhotnět na podkladě embryotransferu a patričné hormonální substituce.
 - 26) „nonsense“...dvakrát po sobě
 - 27) DAX1 - oficiální symbol genu je NR0B1. V odstavci o DAX1 mi chybí popis logiky interakce DAX1/SRY, relevantní článek je např. Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P. et al. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391, 761–767 (1998). <https://doi.org/10.1038/35799>.
 - 28) "WNT4 interaguje během vývoje s RSPO1 a společně se podílí na vývoji pohlaví. Společně jsou antagonisté k působení SRY a SOX9, následky jejich přetlačování mohou vést k hypoplázii varlat, ovšem není možné, aby následkem byla změna pohlaví, jelikož se to neodehrává v Leydigových buňkách, ty tak zůstávají stejné (Chassot et al., 2012)." Toto je velmi zmatené tvrzení, zejména část o Leydigových buňkách, které jsou indukovány pomocí signalizace ze Sertoliho buněk (pomocí Dhh, viz např. výše zmíněnou práci Yao et al., 2002 nebo Clark AM, Garland KK, Russell LD. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod.* 2000 Dec;63(6):1825-38. doi: 10.1095/biolreprod63.6.1825. PMID: 11090455). Pokud by došlo k supresi exprese Sox9 dostatečně brzy, Sertoliho buňky by nevznikly a Leydigovy buňky by vůbec nebyly indukovány.
 - 29) "V případě funkce WNT4 u mužů je nutná přítomnost FGF2, což má za následek potlačování WNT4 a díky tomu vznik mužských reprodukčních pohlavních orgánů. Pokud není u muže s karyotypem XY přítomen FGF2, dochází k částečnému zvratu pohlaví, pokud není přítomen FGF9 dochází k úplnému zvratu pohlaví. To lze ale napravit absencí WNT4, tímto dochází k existenci takzvaných dvojitých mutantů (Jameson et al., 2012)." Nehledě na zanedbání rozdílu mezi FGF a FGFR (jak je možno se přesvědčit v citované práci, jedná se o Fgfr2), text budí zdání, že se jedná o pozorování u člověka, jsou však prezentovány experimentální výsledky u myši.
 - 30) "způsobena mutací genu WNT4 a jeho expresí" - mutací nebo snížením jeho exprese
 - 31) Funkce genu WNT4, oddíly 3.4.1. a 3.4.2. - teprve porovnáním těchto odstavců s databází OMIM a literaturou jsem zjistil, že v prvním odstavci se jedná o haploinsuficienci WNT4 (AD), zatímco těžší postižení zahrnující i další orgány (SERKAL) v druhém odstavci, je úplná ztráta (AR). Formulace "mutace genu WNT4 způsobuje intraexonický homozygotní přechod C na T" je přinejmenším neobratná. Nebo že by opět Lamarck?
 - 32) "V případě, že se mutace projevuje pouze u reprodukčních orgánů". Tato formulace tahá za uši i v případě genetického onemocnění, jedná se přece o fenotyp, u syndromu s možnou negenetickou etiologií je to ještě horší
 - 33) "CYP21A2 je protein kódující gen ležící na krátkém raménku chromosomu 6, který produkuje 21-hydroxylázu, 17 α -hydroxylázu, 11-hydroxylázu či 3 β HSD,". Zmíněný gen rozhodně kóduje jen první z vyjmenovaných enzymů!
 - 34) "21-hydroxyláza se podílí na přeměně 17 α -hydroxylázy v 11-hydroxylázu, tím je ovlivněna syntéza kortisolu (Laji et al., 2002)" Proboha!
 - 35) "Androgenní receptory obsahují repetitivní sekvence CAG, které mohou ovlivňovat citlivost na receptor" ... receptoru na androgeny "estrone" v češtině se nepíše němé e na konci
 - 36) "Estrogeny snadno prochází buněčnými membránami za pomoci estrogenových receptorů." ... bez komentáře
 - 37) "u mužů tato rezistence způsobuje neukončený růst epifýzy" úmysl bych patrně říci, že nedochází k uzavření růstových plotének (na rozhraní diafýzy a epifýzy/epifýz) dlouhých kostí.
 - 38) Syndrom necitlivosti k androgenům je vysvětlován na několika různých místech.

39) V závěru by neškodilo proškrtat zbytečné opakování patogeneze poruch pohlaví způsobených aneuploidii pohlavních chromozomů.

Návrh hodnocení školitele nebo oponenta

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis školitele/opponenta:

V Praze 21. 5. 2021 František Liška

Instrukce pro vyplnění:

- Prosíme oponenty i školitele o co nejstručnější a nejvýstižnější komentáře k jednotlivým bodům (dodržujte rozsah), tučně vyznačené rubriky jsou povinnou součástí posudku.
- Při posuzování je nutno zohlednit požadavky stanovené pro vypracování bakalářských prací – viz <https://www.natur.cuni.cz/biologie/studium/2018-pravidla.pdf>
- Posudek se odevzdává (zasílá) v elektronické podobě na adresu: daniela.hornikova@natur.cuni.cz (pro účely zveřejnění na internetu), a dále podepsaný v 1 výtisku (jako součást protokolu o obhajobě) na adresu: Dr. Daniela Horníková, Katedra fyziologie, Viničná 7, 128 44 Praha 2 nebo osobně na obhajobu.