



Genetyczne podłoże zaburzeń determinacji płci i rozwoju gonad

Genetic background of sex determination and gonadal development disorders

Rafał Piotr Piprek

Zakład Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie

Zaburzenia interseksualne, których przyczyny są często trudne do zdiagnozowania, zazwyczaj wynikają z nieprawidłowości w determinacji płci i rozwoju gonad lub z zaburzeń funkcji endokrynych tych organów. Dlatego zrozumienie etiopatogenezy interseksualizmu powinno się opierać na analizie genetycznej kontroli determinacji płci, różnicowania gonad oraz przede wszystkim kontroli różnicowania się i funkcji komórek steroidogennych w gonadach. Powyższe procesy zachodzą w gonadach zarodków, co ma związek z niewielką ilością danych dotyczących rozwoju gonad ludzkich. Istnieją jednak liczne badania ekspresji genów w gonadach myszy, które ujawniły udział wielu genów kluczowych dla determinacji i różnicowania się gonad. Badania przeprowadzone na myszach zdecydowanie pozwoliły lepiej zrozumieć molekularne podłoże determinacji i różnicowania płci człowieka, chociaż skutki wyłączenia ekspresji tych genów u myszy nie zawsze w pełni odpowiadają przypadkom mutacji ich homologicznych genów u ludzi. Niniejszy artykuł stanowi zestawienie wyników badań ujawniających istnienie wielu genów decydujących o płci zarówno człowieka, jak i myszy, na które powinno się zwrócić uwagę podczas diagnozowania zaburzeń interseksualnych u ludzi. Dotychczas nie opisano u ludzi mutacji niektórych genów kontrolujących rozwój gonad u myszy. Sugeruje to konieczność podjęcia prób szerszej analizy genetycznej osób z zaburzeniami interseksualnymi. (*Endokrynol Pol* 2008; 59 (6): 502-514)

Słowa kluczowe: determinacja płci, rozwój gonad, hermafrodytyzm, odwrócenie płci, SRY

Abstract

Intersexual disorders, the causes of which are frequently difficult to diagnose, usually result from the disruption of sex determination and gonadal development or from impairment in function of endocrine organs such as gonads and adrenal glands. Thus consideration of etiopathogenesis of intersexuality should be based on an analysis of the genetic control of sex determination, gonadal differentiation and first of all molecular regulation of steroidogenic cell differentiation and functioning. These processes take place in the fetal gonads, which explains the small amount of data concerning the development of human gonads. However, numerous investigations of gene expression in murine gonads have revealed a complicated machinery involved in sex determination and gonadal differentiation. Moreover, data obtained from mice have led to a better understanding of the molecular background of sex determination and gonad differentiation in humans. Nevertheless, the interpretation of mouse gene knock-outs does not always reflect mutations of their homologues in man. This article compares data in humans and mice, revealing the existence of many sex-determining genes in both, which should be taken into consideration during the diagnosis of intersexual disorders. Mutations of some genes controlling murine gonad development have not been described in humans so far. This indicates the necessity of conducting extensive genetic analysis of individuals with intersexual disorders. (*Pol J Endocrinol* 2008; 59 (6): 502-514)

Key words: sex determination, gonadal development, hermaphroditism, sex reversal, SRY

Wstęp

Określenie płci osobnika bywa czasami dość trudne, co wynika z występowania kilku poziomów płci. U ssaków, tak jak u innych organizmów o płci determinowanej genetycznie, płeć osobnika zostaje określona już w momencie wnikięcia plemnika do komórki jajowej. Obecność dwóch chromosomów X lub jednego X i jednego Y w genomie stanowi o tak zwanej płci genetycznej. To właśnie od płci zapisanej w genach bezpośrednio zależy różnicowanie komórek somatycznych gonad

w komórki pęcherzykowe lub komórki Sertoliego, które z kolei odpowiadają za różnicowanie bipotencjalnej gonady w jajnik lub jądro, czyli za wykształcenie płci gonadalnej. Kolejnym etapem rozwoju płciowego jest kształtowanie płci somatycznej, na którą składa się ogół cech płciowych organizmu indukowanych poprzez hormony produkowane w gonadach. Różnicowanie to dotyczy także wykształcenia różnic w budowie mózgu kobiety i mężczyzny, z których wynika płeć psychiczna.

U ssaków płeć męska jest płcią nadrzędną, ponieważ do rozwoju płciowego osobnika o genotypie XY



Mgr Rafał Piprek, Zakład Anatomii Porównawczej Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków, tel.: 606 949 081, e-mail: rafalpiprek@wp.pl

konieczne są czynniki wywołujące. Różnicowanie się jąder inicjuje czynnik SRY (*sex-determining region on the Y chromosome*) [1, 2], natomiast kształtowanie męskich cech ciała wywołuje testosteron. Z kolei każdy osobnik ma wrodzoną zdolność do różnicowania się w kierunku żeńskim przy braku czynników wywołujących, dlatego płęć żeńską ssaków zwykle się nazywa płcią podstawową, bądź bierną [3]. Jednakże wyniki ostatnich badań pokazują, że rozwój płci żeńskiej stanowi w pełni aktywnie kontrolowany proces.

Zarys zaburzeń determinacji i różnicowania płci

Zaburzenia determinacji i różnicowania płci u ludzi najczęściej diagnozuje się na podstawie obojnaczych narządów płciowych, maskulinizacji ciała u kobiet i feminizacji u mężczyzn, których obecność świadczy o wystąpieniu u pacjenta szeroko pojętego interseksualizmu (ryc. 1, 2). Trudniejsze do zdiagnozowania wydaje się całkowite odwrócenie płci (rewersja płci), kiedy to pacjent wykazuje poważne zaburzenie czynności reprodukcyjnych — bezpłodność, jednak ciało nie wykazuje cech biseksualnych.

Jednym z zaburzeń determinacji i różnicowania płci jest hermafrodytyzm prawdziwy. Charakteryzuje się on współistnieniem jądra i jajnika w jednym organizmie lub rozwojem gonady obupłciowej (*ovotestis*). Kolejnym zaburzeniem jest hermafrodytyzm rzekomy zwany także pseudohermafrodytyzmem, w obrębie którego wyróżnia się hermafrodytyzm rzekomy męski, cechujący się męskim genotypem, obecnością gonady męskiej lub jej szczątków oraz większym lub mniejszym stopniem feminizacji ciała. Obojnactwo rzekome męskie może wynikać z zaburzeń rozwoju gonad, zaburzeń endokrynych, takich jak upośledzenia syntezy testosteronu, zaburzeń funkcjonowania 5α -reduktazy, niewrażliwości na androgeny (mutacje receptorów androgenów) lub z braku syntezy czynnika antymüllerowskiego (AMH, *anti-müllerian hormone*). Hermafrodytyzm rzekomy żeński polega na występowaniu genotypu żeńskiego oraz często gonady żeńskiej z jednoczesną maskulinizacją ciała. Przyczyną takich zaburzeń może być niewłaściwa synteza androgenów, przyjmowanie leków o działaniu androgennym przez matkę w ciąży, nowotwory nadnerczy lub gonad wydzielające androgeny u płodu lub u matki [4].

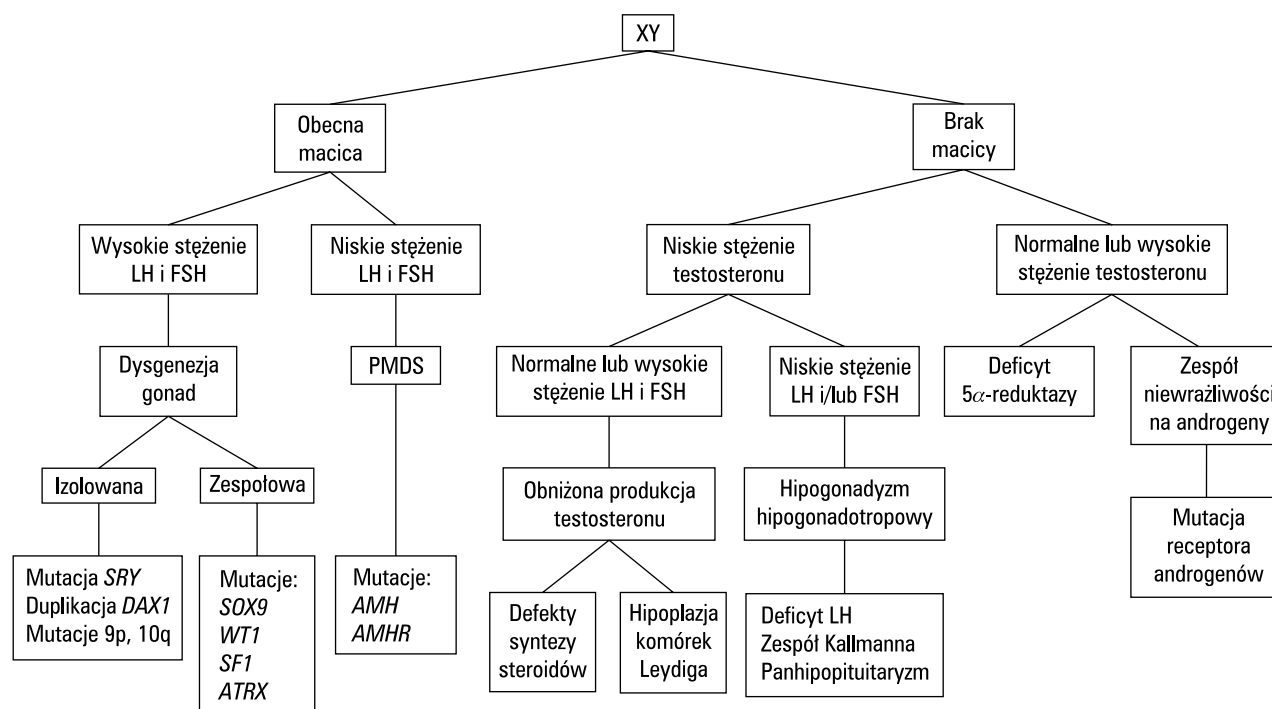
Zaburzenia tworzenia się gonad mogą skutkować rozwojem gonady o nie w pełni wykształconej strukturze. Takie gonady nazywa się gonadami dysgenetycznymi. Wyróżnia się czystą, a więc całkowitą dysgenezję gonad, gdzie po obu stronach ciała pozostaje z gonad jedynie łącznotkankowe podścielisko — tak zwana gonada pasmowata. U osobników o męskim genotypie w takiej gonadzie mogą różnicować się nieliczne ko-

mórki Leydiga produkujące testosteron, co może prowadzić do obojnactwa rzekomego. Przy czystej dysgenezji gonad osobników 46,XY, a więc i przy braku testosteronu taki organizm rozwija się w osobnika żeńskiego charakteryzującego się całkowitym odwróceniem płci, co nazywa się zespołem Swyera. Mieszana dysgenezję gonad cechuje występowanie dysgenetycznej gonady po jednej stronie i słabo rozwiniętej gonady po drugiej, co może prowadzić do obojnactwa rzekomego. Częściowa dysgenezja gonad cechuje się obustronnymi niecałkowitymi zaburzeniami dysgenetycznymi gonad [4]. Zaburzenia takie skutkują bardziej lub mniej znaczącymi cechami obojnaczymi w zależności od aktywności hormonalnej dysgenetycznych gonad.

Genetyczna kontrola determinacji płci

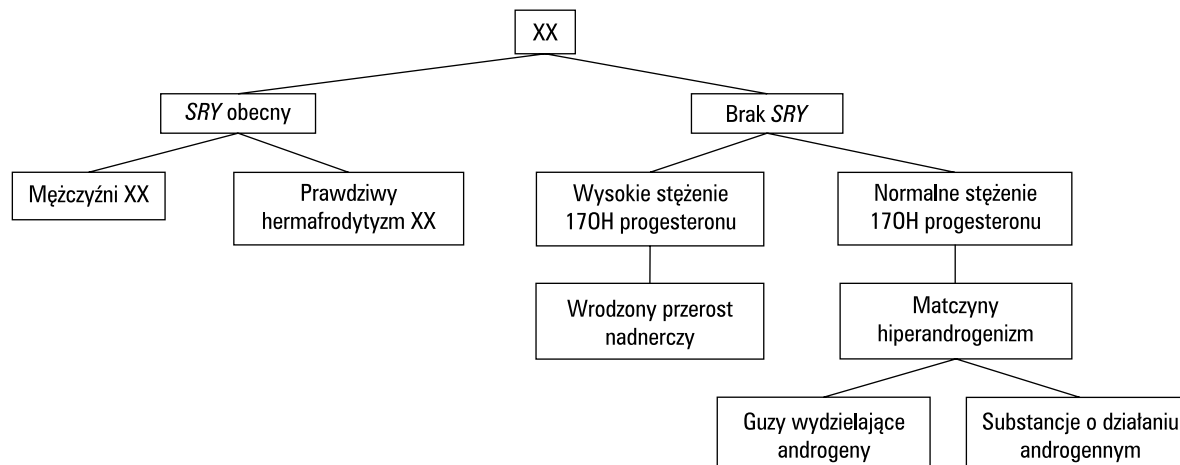
Prawidłowa genetyczna kontrola determinacji płci i różnicowania gonad zapewnia wykształcenie gonad o płci zgodnej z płcią genetyczną danego osobnika. Brak takiej zgodności, zwany odwróceniem płci, zazwyczaj jest przyczyną bezpłodności. Zaburzenia determinacji płci u ludzi występują u 1 noworodka na 20 000 urodzeń [5]. Natomiast zaburzenia różnicowania płci, przejawiające się wadami narządów płciowych są częstsze i dotyczą 0,77 na 100 000 urodzeń według rejestru wad wrodzonych EUROCAT. W Polsce niektóre rejestry wskazują na występowanie takich wad z częstością 24/10 000 urodzeń. Zaburzenia takie częściej dotyczą osobniki o genotypie męskim, a więc XY. Odwrócenia płci męskiej w żeńską występują w 1 na 3000 urodzeń na rok, natomiast żeńskiej w męską tylko 1 na 20 000 na rok [6]. Wynika to z większego skomplikowania szlaku męskiego i występowania większej liczby zagrożeń dla tego szlaku, przez co szlak męski może być łatwo wyparty przez szlak żeński. Ponadto do zainicjowania szlaku męskiego potrzebny jest czynnik wywołujący, czyli czynnik SRY, którego niewłaściwe działanie skutkuje przejściem kontroli nad gonadą XY przez szlak żeński, natomiast szlak żeński nie potrzebuje takiego czynnika wywołującego.

Pierwszym etapem rozwoju gonady jest powstanie bipotencjalnego grzebienia płciowego, który jest formowany pod kontrolą czynników, takich jak: WT1 (*Wilms' tumour suppressor 1*), SF1 (*steroidogenic factor 1*), EMX2 (*empty spiracles homologue 2*), M33 (*chromobox homologue 2*), LHX9 (*LIM homeobox protein 9*) [7]. O różnicowaniu się takiej bipotencjalnej gonady w jądro bądź jajnik decyduje ekspresja genu SRY/Sry, zachodząca przede wszystkim w komórkach somatycznych zawiązku gonady [8]. Gen ten położony jest na krótkim ramieniu chromosomu Y, dlatego czynnik SRY może pojawić się jedynie u osobników posiadających chromosom Y w swoim genomie, pod warunkiem, że wcześniej nie doszło do jego translokacji. Czynnik SRY wygina łańcuch



Rycina 1. Algorytm diagnozowania zaburzeń determinacji i różnicowania płci u pacjentów o genotypie XY charakteryzujących się feminizacją ciała (z Fleming i Vilain 2004 [5], zmienione)

Figure 1. Diagnostic algorithm of sex determination disorders in feminized patients with XY genotype (after Fleming and Vilain 2004 [5], changed)



Rycina 2. Algorytm diagnozowania zaburzeń determinacji i różnicowania płci u pacjentów o genotypie XX charakteryzujących się maskulinizacją ciała (z Fleming i Vilain 2004 [5], zmienione)

Figure 2. Diagnostic algorithm of sex determination disorders in masculinized patients with XX genotype (after Fleming and Vilain 2004 [5], changed)

DNA w odpowiednim miejscu, doprowadzając do zmiany w ekspresji genów [9]. W ten sposób włącza męski szlak molekularny kierujący różnicowaniem pewnej części somatycznych komórek gonady w komórki Sertoliego. Szlak ten musi zostać zainicjowany wystarczająco wcześnie, by „wyprzedzić” szlak żeński, który jest

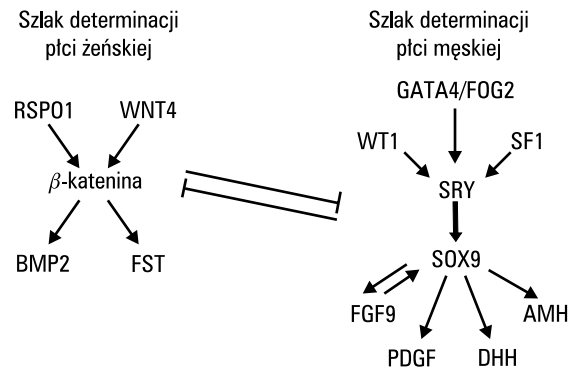
włączany nieco później niż męski i w dodatku ma zdolność pojawienia się w każdym osobniku, ponieważ szlak ten tworzą prawie wyłącznie geny autosomowe. Tłumaczy to zdolność każdego osobnika do rozwoju w osobnika żeńskiego. Tak więc ekspresja genów szlaku żeńskiego musi być efektywnie wyciszana w gonadzie

osobnika o męskim genotypie. Sugeruje to, że istnieją antagonistyczne interakcje pomiędzy męskim i żeńskim szlakiem determinacji płci, co pozwala na rozwój gonady o płci zgodnej z płcią zapisaną w genach [10]. Brak takiej zgodności zazwyczaj skutkuje bezpłodnością, dlatego konieczne jest istnienie ścisłej kontroli molekularnych procesów kierujących różnicowaniem się gonad.

Wynika z tego, że zbyt późne lub zbyt wczesne włączenie szlaku męskiego pozwoliłoby na przejście przez szlak żeński kontroli nad rozwojem gonady i w efekcie doprowadziłoby do rewersji płciowej, dlatego rozpoczęcie ekspresji genu *Sry* w odpowiednim czasie i miejscu ma istotne znaczenie dla skutecznego działania szlaku męskiego. Wykazano, że u myszy za kontrolę ekspresji *Sry* odpowiadają czynniki, takie jak SF1, WT1, GATA4/FOG2 (*GATA binding protein 4/zinc finger protein 2*) oraz receptory insulinopodobnych czynników wzrostu [11].

Czynnik SRY prawdopodobnie bezpośrednio doprowadza do podwyższenia ekspresji genu *Sox9* (*Sry-like HMG-box protein 9*), a ten z kolei pobudza ekspresję *Fgf9* (*fibroblast growth factor 9*), który zwrótnie podwyższa ekspresję *Sox9* [12] (ryc. 3). W ten sposób gwałtownie wzrasta stężenie czynników szlaku męskiego po pojawieniu się czynnika SRY w gonadzie XY, co z jednej strony jest konieczne do efektywnego obniżenia ekspresji genów szlaku żeńskiego, a z drugiej do włączenia ekspresji czynników bezpośrednio kierujących różnicowaniem się jądra. Symptomami różnicowania się gonady męskiej jest proliferacja komórek somatycznych, migracja komórek ze śródnercza do gonady, tworzenie się sznurów jądrowych i naczynia celomatycznego, a także steroidogeneza oraz brak mejozy [13]. Komórki germinalne gonady męskiej nie mogą wejść w mejozę, ponieważ doprowadziłoby to do degeneracji sznurów płciowych płodowych jąder.

Osiową część genetycznej kontroli determinacji płci żeńskiej i różnicowania się jajnika stanowi szlak sygnalizacyjny WNT4 (*wingless-type MMTV integration site 4*). Czynnik WNT4 łączy się z receptorem błonowym komórek somatycznych gonady i prawdopodobnie przez inhibowanie rozkładu β -kateniny doprowadza do regulacji ekspresji genów, a w szczególności do podwyższenia ekspresji genów szlaku żeńskiego, takich jak *Bmp2* (*bone morphogenesis protein 2*) i *Fst* (*follistatin*) oraz do wyciszenia ekspresji genów szlaku męskiego [14] (ryc. 3). Okazuje się, że sam czynnik WNT4 nie jest w stanie powstrzymać „samonakręjącego się” szlaku męskiego (SOX9-FGF9) w gonadzie XX. Wymagana jest R-spondyna1, która współdziała z WNT4. Różnicowanie się jajnika stanowi proces aktywnie regulowany na poziomie molekularnym i polega na zahamowaniu proliferacji komórek gonady, zablokowaniu migracji komórek ze śródnerczy, zahamowaniu tworzenia naczynia ce-



Rycina. 3. Hipotetyczny model interakcji głównych czynników determinacji płci ssaków. Główne czynniki determinacji płci żeńskiej, RSP01 i WNT4, stabilizują β -kateninę, hamującą ekspresję genów męskiego szlaku determinacji płci i podwyższającą ekspresję genów BMP2 i FST, które kontrolują rozwój jajników. W przypadku genotypu XY czynniki WT1, SF1 i GATA4, współdziałający z FOG2, podwyższają ekspresję genu SRY, który podnosi ekspresję genu SOX9, a ten z kolei indukuje ekspresję FGF9. Prawdopodobnie czynnik FGF9 hamuje ekspresję genów żeńskiego szlaku determinacji płci. SOX9 działa jako główny włącznik ekspresji genów kierujących rozwojem jądra, takich jak DHH i PDGF

Figure 3. Hypothetical model of interaction of main sex-determining factors in mammals. The main factors of female sex determination, RSP01 and WNT4, stabilize β -catenin that inhibits expression of genes of male sex determination and up-regulates expression of genes such as BMP2 and FST which control ovary development. In XY case, WT1, SF1 and GATA4 with FOG2 up-regulate expression of SRY which increases expression of SOX9 that induces FGF9 expression. Probably, FGF9 inhibits expression of female sex-determining genes. SOX9 acts as the main switch that up-regulates expression of genes controlling testis development, such as DHH and PDGF

matycznego i steroidogenezy. Ponadto w różnicującym się jajniku komórki linii płciowej wchodzi w mejozę, co jest konieczne dla utrzymania struktury i funkcjonowania jajnika w okresie postnatalnym. W procesie determinacji płci bierze udział wiele genów, których mutacje opisano zarówno u myszy, jak i u ludzi (tab. I).

Mutacje genów kontrolujących rozwój zawiązków gonad

Mutacje genów *M33*, *Emx2*, *Lhx9*, *Sf1*, *Wt1* doprowadzają u myszy do regresji gonady, ponieważ geny te odpowiadają za wykształcenie zawiązków gonad [7]. Spośród tych genów jedynie mutacje SF1 i WT1 prowadzą do zaburzeń rozwoju gonad, takich jak dysgenезja jąder [15, 16]. Jednak brak danych dotyczących obecności dysgenезji jajników u kobiet z mutacjami SF1 lub WT1 wskazuje, że geny te nie są kluczowe dla kształtowania zawiązków gonad ludzkich, ale mogą uczestniczyć w dalszym rozwoju jąder. Wykazano bowiem obecność miejsc wiązania czynnika SF1 z promotorem

Tabela I. Porównanie efektów mutacji głównych genów determinacji płci myszy i człowieka

Table I. The comparison of mutation effects of main genes involved in mouse and human sex determination

Gen	Mutacja u myszy	Mutacja u ludzi
<i>SF1</i>	regresja zawiązków gonad	zaburzenia rozwoju jąder i nadnerczy
<i>WT1-KTS</i>	regresja zawiązków gonad	— dysgeneza jąder — zespół Denysa-Drasha — odwrócenie płci męskiej w żeńską
<i>WT1+KTS</i>	odwrócenie płci męskiej w żeńską	— zespół Frasiera — odwrócenia płci męskiej w żeńską
<i>SRY</i>	— odwrócenie płci męskiej w żeńską — nadekspresja u XX — odwrócenie płci żeńskiej w męską	— odwrócenie płci męskiej w żeńską u XY — nadekspresja u XX — odwrócenie płci żeńskiej w męską
<i>SOX9</i>	— zaburzenie różnicowania komórek Sertoliego — nadekspresja u XX — odwrócenie płci żeńskiej w męską	— kobiety XY z dysplazją kampakomiczną — duplikacja — mężczyźni XX
<i>DAX1</i>	mutacja — samice XY nadekspresja — samice XY	— mutacja — hipogonadyzm hipogonadotropowy — nadekspresja — kobiety XY
<i>DHH</i>	zaburzenia różnicowania sznurów jądrowych i komórek Leydiga	odwrócenie płci męskiej w żeńską
<i>ARX</i>	zaburzenie różnicowania komórek Leydiga	nieprawidłowy rozwój jąder
<i>RSP01</i>	częściowe odwrócenie płci u XX	całkowite odwrócenie płci u XX
<i>WNT4</i>	— XX — maskulinizacja gonad żeńskich — XY — spóźnione różnicowanie komórek Sertoliego	— mutacja u XX — maskulinizacja — nadekspresja u XY — odwrócenie płci męskiej w żeńską

genu *SRY* u ludzi i świń [17, 18]. U myszy brak czynników *SF1* i *WT1* skutkuje obniżeniem ekspresji genu *Sry*, co wskazuje, że czynniki te są istotne dla determinacji płci męskiej. Być może taką samą funkcję spełniają w gonadzie męskiej człowieka. Mutacje ludzkich genów *EMX2*, *LHX9* nie doprowadzają do zaburzeń w rozwoju gonad, więc nie wiadomo czy uczestniczą one w kontroli rozwoju gonad u ludzi.

Udział *SF1* w determinacji płci męskiej

Gen *Sf1* koduje receptor jądrowy, którego ligandu dotychczas nie poznano. Ulega on ekspresji w tkankach steroidogennych (nadnercza i gonady) oraz w tkankach kontrolujących funkcjonowanie organów steroidogennych, takich jak brzuszno-środkowe jądro podwzgórza i przedni płat przysadki mózgowej. Homozygotyczne mutacje genu *Sf1* u myszy są przyczyną całkowitej dysgenezy gonad, co jedynie u osobników XY prowadzi do odwrócenia płci męskiej w żeńską zgodnie z założeniem, że płeć żeńska jest płcią podstawową. Mutacja *Sf1* powoduje także kompletną agnezję nadnerczy, zaburzenia rozwojowe podwzgórza i dysfunkcje organów gonadotropowych [19].

U ludzi opisano do tej pory cztery przypadki mutacji genu *SF1* [5]. Trzy z nich charakteryzowała niewydolność nadnerczy, spośród których osoba 46,XX posiadała typowo rozwinięte jajniki, natomiast dwoje pozostałych pacjentów o genotypie 46,XY wykazywało odwrócenia

płci, będące następstwem zaburzeń rozwoju gonad [15, 20, 21]. Tłumaczy to zdolność różnicowania się wszystkich osobników ssaków w samice przy braku czynników wywołujących. Czwarta osoba miała genotyp 46,XY i charakteryzowała się odwróceniem płci na skutek dysgenezy gonad, jednak funkcja nadnerczy nie była u niej zaburzona [22]. U ludzi mutacja już w jednym z dwu alleli genu *SF1* prowadzi do zaburzeń w różnicowaniu się tkanek steroidogennych, w przeciwieństwie do myszy, u których obydwa allele genu *Sf1* muszą ulec mutacji, aby ujawniła się ona w postaci patologicznej. Świadczy to o tym, że funkcja czynnika *SF1* u ludzi bardziej zależy od jego ilości niż u myszy [5]. Zasada ta dotyczy także innych genów kontrolujących rozwój gonad u myszy i u ludzi.

Udział genu *WT1* w rozwoju gonady

Gen *WT1* koduje co najmniej 24 izoformy, spośród których dwie mają istotne znaczenie w rozwoju gonady [23]. Krótsza izoforma *WT1-KTS* uczestniczy w tworzeniu zawiązku gonady jako czynnik transkrypcyjny. Unieczynnienie izoformy *WT1-KTS* prowadzi do regresji gonad, co u osobników XY skutkuje rewersją płci. Wykazano, że brak tego białka nie zaburza ekspresji genu *Sry* u myszy, co wskazuje, że *WT1-KTS* nie uczestniczy w determinacji płci [24]. Jednak odnaleziono miejsca wiązania tego czynnika w promotorze genu *SRY* u ludzi. Dłuższa izoforma *WT1+KTS* uczestniczy ra-

czej w procesie dojrzewania mRNA, a jej brak doprowadza do znacznego obniżenia stężenia białka SRY [25]. W związku z tym osiągnięcie wysokiego stężenia białka SRY, konieczne do włączenia szlaku determinacji płci męskiej, jest zapewnione nie tylko przez podwyższenie poziomu transkrypcji, ale także przez stabilizację mRNA SRY lub podwyższenie poziomu translacji, za co odpowiada czynnik WT1+KTS.

U ludzi mutacje w genie *WT1* wywołują różnorodne efekty fenotypowe związane z zaburzeniami rozwojowymi nerek i gonad, którym często towarzyszy guz Wilmsa. Gen *WT1* jest właśnie jego supresorem. Mutacja w 9 intronie genu *WT1*, którego sekwencja umożliwia wprowadzenie tripeptydu KTS, doprowadza do zaburzenia proporcji izoformy +KTS do -KTS. W przypadku opisanej mutacji brakuje izoformy WT1+KTS, jednak nie pojawia się białko o nieprawidłowej sekwencji [26]. Skutkiem tego jest zespół Frasiera, który charakteryzuje się niewłaściwym formowaniem gonad oraz kłębuszków nerkowych. Rozwój dysgenезji gonad skutkuje brakiem produkcji hormonów steroidowych w tych gruczołach. Doprowadza to do częściowego odwrócenia płci osobników XY, przejawiającej się obojnaczymi wewnętrznymi i zewnętrznymi narządami rozrodczymi. Jako, że płeć żeńska jest u ssaków płcią podstawową, obojnactwo nie występuje w przypadku osobników XX z mutacją w genie *WT1*, podobnie jak przy mutacji genu *SF1*. Stanowi to przyczynę trudności w zdiagnozowaniu zespołu Frasiera u pacjentów o płci żeńskiej. W przypadku tego zespołu ryzyko wystąpienia guza Wilmsa nie zwiększa się, ponieważ izoforma WT1-KTS nie ma zdolności supresji rozwoju tego nowotworu. Jednak w zahamowanej w rozwoju dysgenetycznej gonadzie mogą zachodzić procesy nowotworzenia, które są częste w tkankach odróżnicowujących się. Nowotworem rozwijającym się w takiej gonadzie jest między innymi nowotwór pochodzący z płodowych sznurów płciowych — gonadoblastoma, a także inne nowotwory pochodzące z komórek płciowych (*germ cell tumour*), takie jak nasieniaki (*seminoma*) i nienasieniaki (*nonseminoma*) [27].

Kolejnym przykładem mutacji genu *WT1* jest punktowa, nonsensowa mutacja w 8. lub 9. egzonie, które kodują odpowiednio 2. i 3. palec cynkowy białka WT1. Mutacja w tym regionie doprowadza do utraty funkcji regulatorowych każdej z 24 izoform WT1, czego następstwem jest rozwój zespołu Denysa-Drasha (DDS, *Denys-Drash syndrome*). Zespół ten charakteryzuje się zaburzeniami rozwoju gonad i nerek. W odróżnieniu od zespołu Frasiera często towarzyszy mu guz Wilmsa [28]. Dysgenезja gonad osobnika XY prowadzi do obojnactwa rzekomego męskiego. Gonady mogą przyjmować postać pasmowatych resztkowych jajników z pierwotnymi pęcherzykami lub pasmowatych gonad ze stromą

przypominającą jajnik pozbawiony pęcherzyków, ale zawierający resztkowe kanaliki nasienne, albo dysgenetycznych lub atroficznych jąder umieszczonych w jamie ciała.

Delecja regionu 11p13 ludzkiego genomu prowadzi do rozwoju zespołu WAGR, który charakteryzuje się wystąpieniem guza Wilmsa (*Wilms' tumor*), wrodzonego braku tęczówki (*aniridia*), wrodzonymi wadami układu moczowo-płciowego (*genitourinary malformations*) oraz opóźnieniem umysłowym (*mental retardation*). Delecja ta obejmuje między innymi gen *WT1*, którego mutacja odpowiada tu za zaburzenia układu moczowo-płciowego oraz gen *PAX6* odpowiadający za rozwój oka. Wady układu rozrodczego o charakterze interseksualizmu dotyczą jedynie osobników o genotypie XY i przejawiają się wnetrostwem — czyli brakiem zstępowania jąder do moszny, a także spodziectwem — czyli otwarciem cewki moczowej po spodniej stronie prącia. Natomiast u osobników XX zaburzeniom rozwoju gonad mogą towarzyszyć nieprawidłowości w rozwoju macicy i pochwy. Zarówno u osobników XX, jak i XY na terenie dysgenetycznej gonady może rozwijać się gonadoblastoma [28].

Mutacje genów determinacji płci

Decydujący gen determinacji płci męskiej — SRY
Pierwotny gen determinujący płeć męską zidentyfikowano podczas badań pewnego fragmentu ludzkiego chromosomu Y, którego translokacja skutkuje rozwojem osobników 46,XX w mężczyzn, natomiast delecja powoduje rozwój osobników 46,XY w kobiety [1, 2]. Badania przeprowadzone na myszach potwierdziły, że genem decydującym o płci jest u ssaków gen położony na krótkim ramieniu chromosomu Y. Czynnikiem kodowany przez ten gen zawiera domenę HMG, dzięki której może się wiązać z DNA i regulować ekspresję genów przez wygięcie nici DNA. W ten sposób odkryte białko SRY okazało się czynnikiem transkrypcyjnym. Mutacje w genie *SRY* zaburzające jego wiązanie się z DNA, wyginanie nici DNA, jak również transport jądrocy czynnika SRY zazwyczaj prowadzą do odwrócenia płci osobników XY w osobniki żeńskie [11]. Mutacje takie są jedną z przyczyn zespołu Swyera. Translokacja genu *SRY* na chromosom X lub autosom prowadzi do rozwoju osobnika XX charakteryzującego się bardziej lub mniej męskimi cechami w postaci hermafrodytyzmu prawdziwego. Analiza sekwencji chromosomu Y wskazuje, że odwrócenia płci wynikające z translokacji genu *SRY/Sry* powinny być częstsze u ludzi niż u myszy. Wynika to z faktu bliskiego sąsiedztwa ludzkiego genu *SRY* z regionem pseudoautosomalnym, w obrębie którego dochodzi do koniugacji chromosomu Y z chromosomem X. Tak więc niewłaściwy,

„głęboki” *crossing-over* może doprowadzić do translokacji genu *SRY* na chromosom X i tym samym może spowodować odwrócenie płci osobników 46,XX^{SRY} i 46,XY^{SRY}. U myszy duża odległość genu *Sry* od regionu rekombinacji zmniejsza częstość występowania odwróceń płci.

Źródło hermafrodytyzmu prawdziwego, czyli współobecności jądra i jajnika lub gonady obupłciowej, wydaje się najbardziej tajemnicze. Część z pacjentów wykazuje obecność genu *SRY* w chromosomie X, mutacje *RSPOL*, natomiast niektórych charakteryzuje mazaicyzm — na przykład XX/XY. Wykazano, że gonada męska różnicuje się wówczas, gdy znajduje się w niej powyżej 20–30% komórek o genotypie męskim, co dotyczy zarówno ludzi, jak i myszy [29, 30]. Procent taki świadczy o progowym mechanizmie determinacji płci, który polega na działaniu czynników sygnalizacyjnych, takich jak *fibroblastyczny czynnik wzrostu* (FGF9, *fibroblast growth factor*) i prostaglandyna D₂, odpowiedzialnych za promowanie różnicowania się komórek Sertoliego [8, 10, 12]. Interesujące, że rozmieszczenie żeńskiej i męskiej gonady u osobników hermafrodytycznych jest asymetryczne. U ludzi jajnik pojawia się zazwyczaj po lewej stronie ciała, a jądro po prawej, natomiast odwrotnie u myszy [31].

W genetycznych badaniach osób z zaburzeniami interseksualnymi przede wszystkim zwraca się uwagę na translokacje i inne mutacje dotyczące genu *SRY*, jako że jest to decydujący gen determinacji płci. Statystyczne dane częstości mutacji genu *SRY*, jako źródła zaburzeń determinacji płci, wskazują na duży udział innych czynników w takich patologiach. Otóż jedynie 8% mężczyzn o genotypie 46,XX, a więc z całkowitym odwróceniem płci, nie posiada genu *SRY*, natomiast aż 91% hermafrodytycznych mężczyzn z genotypem 46,XX nie wykazuje obecności genu *SRY*, a 84% pacjentów z hermafrodytyzmem prawdziwym w ogóle nie posiada tego genu [32]. Dodatkowo jedynie 15% kobiet o męskim genotypie 46,XY posiada mutacje genu *SRY* [33].

Kluczowy gen determinacji płci męskiej — SOX9

Tuż po rozpoczęciu ekspresji genu *SRY/Sry* w gonadzie wzrasta poziom ekspresji genu *SOX9/Sox9* zarówno u myszy, jak i u ludzi; w tym czasie stężenie czynnika *SOX9* zmniejsza się w gonadzie XX [8]. Sugeruje to, że *SRY* bezpośrednio podwyższa ekspresję genu *Sox9*, choć brak na to niezbitych dowodów. Okazało się, że czynnik *SOX9* jest niezbędny i kluczowy dla różnicowania się jądra u większości kręgowców, podczas gdy znane są przypadki różnicowania się jądra ssaków bez udziału czynnika *SRY*. Świadczy to o tym, że gen *Sox9* jest kluczowym genem determinacji płci kręgowców. Gen *Sox9*, tak jak *Sry*, należy do rodziny genów *SOX*, tak więc koduje domenę HMG, dzięki której białko

przyłącza się do określonej sekwencji DNA. Pozostałe domeny w białku *SOX9*, jak również *SRY*, umożliwiają transport tych czynników do wnętrza jądra komórkowego, ich dimeryzację oraz remodeling chromatyny, który jest mechanizmem regulacji ekspresji genów. U myszy o żeńskim genotypie nadekspresja genu *Sox9* prowadzi do rozwoju organizmu w kierunku męskim, w postaci całkowitego odwrócenia płci [34]. Opisano jeden przypadek duplikacji genu *SOX9* u człowieka o genotypie 46,XX [35], który charakteryzował się męskim fenotypem mimo w pełni żeńskiego genotypu. A więc tak jak u myszy zbyt duże stężenie białka *SOX9* w komórkach somatycznych gonady ludzkiej prowadzi do inhibicji żeńskiego szlaku i różnicowania się komórek somatycznych gonady w komórki Sertoliego, przez co rozwijają się jądra, a cały organizm staje się osobnikiem męskim.

U myszy delecja jednego z dwu alleli genu *Sox9* nie zaburza rozwoju gonady, dopiero mutacje obu alleli skutkują śmiercią zarodka poprzedzającą powstanie zawiązków gonad. Wyciszenie ekspresji genu *Sox9* jedynie w gonadach myszy nie doprowadza do śmierci, dzięki czemu można zaobserwować, że mutacja taka prowadzi do zaburzeń rozwoju gonad w postaci odwrócenia płci [36]. U ludzi mutacja już jednego allelu genu *SOX9* prowadzi do dysplazji karpomelicznej charakteryzującej się zaburzeniami rozwoju szkieletu. Aż 75% osobników XY z tą dysplazją rozwija się w kobiety, wykazując odwrócenie płci. Tak więc nie każda mutacja genu *SOX9* zaburza rozwój płciowy. Jest to związane z rolą *SOX9* w formowaniu chrząstek, gdzie białko to funkcjonuje jako dimer, podczas gdy w rozwoju gonady męskiej *SOX9* prawdopodobnie działa jako monomer. Mutacja w sekwencji kodującej domenę białka odpowiedzialną za jego dimeryzację zaburza jedynie rozwój szkieletu, nie wpływając na determinację płci. Choć ostatnie badania sugerują, że *SOX9* może działać jako dimer w regulacji ekspresji genów determinacji płci [37].

Ponadto obniżenie ekspresji genu *Sox9* u myszy skutkuje obniżeniem ekspresji genu *Sox8*, co sugeruje, że działają one w jednym szlaku molekularnym. Mutacja jednego z alleli *Sox9* nie zaburza rozwoju gonady myszy, natomiast ta sama mutacja przy jednoczesnej mutacji obu alleli genu *Sox8* prowadzi do odwrócenia płci myszy [38]. Tak więc czynnik *SOX8* może wspomagać czynnik *SOX9* w rozwoju gonady, co może dodatkowo tłumaczyć występowanie zaburzeń rozwoju płciowego jedynie u części pacjentów z dysplazją karpomeliczną.

Wykazano, że mutacje w sekwencjach kodujących domeny białek *SRY* i *SOX9* odpowiedzialnych za ich transport do wnętrza jądra komórkowego (*NLS*, *nuclear localizing sequence*, sekwencje lokalizacji jądrowej)

doprowadzają do zaburzeń determinacji płci u ludzi [39–41]. Mutacje takie blokują oddziaływanie sekwencji NLS z importyną β i kalmoduliną, co powoduje spadek stężenia białek SRY i SOX9 wewnątrz jąder komórkowych, uniemożliwiając podwyższenie ekspresji pozostałych genów szlaku męskiego. I przeciwnie, zablokowanie eksportu jądrowego czynnika SOX9 doprowadza do włączenia szlaku męskiego w komórkach XX *in vitro* [41]. Tak więc regulacja transportu jądrowego może być istotnym punktem kontroli determinacji płci.

Hormon antymüllerowski (AMH)

Czynnik SOX9 pobudza ekspresję wielu genów, które kierują różnicowaniem gonady w jądro. Wykazano, że czynnik ten bezpośrednio podwyższa ekspresję genu *Amh*, który koduje czynnik wydzielany z gonady męskiej, odpowiedzialny za regresję przewodów Müllera u osobników męskich [42]. Zaburzenia determinacji płci u osobnika XY, podobnie jak mutacje w genie *AMH* lub w genie kodującym receptor AMH, prowadzą do zespołu przetrwałych przewodów Müllera (PMDS, *persistent müllerian duct syndrome*) charakteryzującego się brakiem zaniku tych przewodów, a nawet ich różnicowaniem się w jajowody, macicę i pochwę u osobników męskich. Jest to jedna z przyczyn hermafrodytyzmu rzekomego męskiego. Przy prawidłowym wydzielaniu testosteronu narządy rozrodcze zewnętrzne rozwijają się w sposób męski, a pochwa nie uchodzi na zewnątrz ciała, dlatego PMDS może być trudny do zdiagnozowania, choć współistnieniu żeńskich i męskich dróg rozrodczych może towarzyszyć wnętrostwo, a więc brak zstępowania jąder do moszny.

Udział czynników FGF9 i PDGF w rozwoju gonady męskiej

Kolejnym genem, którego ekspresja jest bezpośrednio lub pośrednio podwyższana przez czynnik SOX9, jest *Fgf9*, kodujący fibroblastyczny czynnik wzrostu. Homozygotyczna delekcja mysiego genu *Fgf9* prowadzi do rozwoju osobników XY w samice, a więc jej skutkiem jest odwrócenie płci [12]. Natomiast u ludzi nie wykazano zaburzeń determinacji płci związanych z mutacjami genu *FGF9* ani żadnego z jego receptorów. Podobnie nie wykazano, by mutacja któregośkolwiek z genów rodziny PDGF (*platelet-derived growth factor*, *płytkopochodny czynnik wzrostu*) lub ich receptorów skutkowało u ludzi zaburzeniami rozwoju gonad, podczas gdy u myszy brak receptora α dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGFR α , *platelet-derived growth factor receptor α*) prowadzi do zaburzeń proliferacji komórek gonady, migracji komórek ze śródnerczy do gonady, tworzenia sznurów jądrowych i różnicowania się komórek Leydiga [43]. Wskazuje to, że sygnalizacja PDGF jest bardzo istotna dla rozwoju gonady męskiej myszy.

Konserwatywny gen rozwoju gonady męskiej — Dmrt1

Gen *Dmrt1* (*doublesex and mab-3 related transcription factor 1*) zawiera domenę DM wspólną z genami determinacji płci u *Drosophila melanogaster* (*dsx*) oraz u *Caenorhabditis elegans* (*mab-3*) [44]. Gen ten wydaje się również kluczowy dla determinacji płci wielu kręgowców. Wykazano, że u ludzi delekcja pewnego regionu krótkiego ramienia chromosomu 9 prowadzi do zaburzeń rozwojowych układu rozrodczego, a nawet do odwrócenia płci osobników 46,XY. Ponadto *DMRT1* ulega ekspresji w tym samym czasie co *SRY*. Powyższe doniesienia sugerują, że gen ten w pewien sposób wiąże się z determinacją płci męskiej u ludzi [45–48], natomiast mysie mutanty pozbawione ekspresji *Dmrt1* ujawniły, że gen ten uczestniczy raczej w różnicowaniu gonady męskiej niż w determinacji płci [49].

Steroidogeneza w zarodkowej gonadzie

Czynnik Desert Hedgehog (DHH)

Proces różnicowania się pierwszej populacji komórek Leydiga zachodzi w zarodkowym jądrze i jest regulowany między innymi przez czynnik *Desert Hedgehog* (DHH), wydzielany przez komórki Sertoliego. Gen kodujący DHH należy do szlaku męskiego, a jego mutacja u myszy prowadzi do zaburzeń rozwoju sznurów jądrowych oraz komórek Leydiga [50]. Opisano jeden przypadek homozygotycznej mutacji ludzkiego genu *DHH*. Była to fenotypowa kobieta o męskim genotypie 46,XY, charakteryzująca się częściową dysgenезją gonad (pasmowata gonada po jednej stronie ciała i niedorozwinięte jądro po drugiej) oraz polineuropatią [51]. To odwrócenie płci świadczy o istotnej roli DHH w rozwoju gonady u człowieka.

Gen ATRX

Gen *ATRX* (*α -thalassemia, mental retardation, X-linked*) uczestniczy w rozwoju gonady męskiej, ale jego dokładny mechanizm działania jest nieznan. Jego mutacja u ludzi skutkuje różnorodnymi zaburzeniami od wnętrostwa po dysgenезję gonad współistniejących z obojnaczymi lub żeńskimi genitaliami [52]. W takich dysgenetycznych jądrach obserwuje się hipoplazję komórek Leydiga [53], co wskazuje na rolę czynnika ATRX w różnicowaniu się komórek steroidogennych. Zespół ARTX występuje jedynie u mężczyzny.

Gen ARX

Gen *ARX* (*aristaless related homeobox X-linked*) jako kolejny odpowiada za różnicowanie się komórek Leydiga. Ulega on ekspresji w niektórych komórkach interstycjalnych gonady męskiej, jednak ani komórki Leydiga ani komórki Sertoliego nie wykazują jego ekspre-

sji. Myszy z mutacją w genie *Arx* posiadają obniżoną liczbę komórek Leydiga [54]. U ludzi skutkiem mutacji genu *ARX* jest lizencefalia sprzężona z chromosomem X oraz zaburzenia rozwojowe zewnętrznych narządów płciowych.

Udział SF1 w regulacji steroidogenezy

Niektóre mutacje mysiego genu *Sfl* skutkują brakiem ekspresji genu kodującego białko ostrej regulacji steroidowej (StAR, *steroidogenic acute regulatory protein*) oraz genu kodującego enzym CYP11a1, które ulegają ekspresji w płodowych komórkach Leydiga [55]. Białko StAR odpowiada za transport cholesterolu do mitochondriów, natomiast CYP11a1 działa na pierwszych etapach steroidogenezy. Czynniki SF1 odpowiada raczej za wyspecjalizowanie komórek Leydiga w syntezie hormonów steroidowych niż za samo różnicowanie się tych komórek z niezróżnicowanych komórek interstycjalnych gonady. Jest to kolejna rola SF1 obok kontroli tworzenia zawiązku gonady i regulacji ekspresji genu *Sry*.

Myszy z brakiem ekspresji prawidłowego genu *Pod1* wykazują zwiększenie ekspresji genu *Sfl* oraz początkowy wzrost liczby komórek Leydiga w rozwijającej się gonadzie męskiej. Takie osobniki XY rozwijają się w samice, a to odwrócenie płci może być wynikiem późniejszego wymierania (agnezji) komórek Leydiga lub niekompletnego zestawu enzymów steroidogenezy [56]. Badania *in vitro* wykazują, że czynnik POD1 hamuje ekspresję genu *Sfl* przez uniemożliwienie innym czynnikiem transkrypcyjnym połączenia z promotorem *Sfl*.

Steroidogeneza nie zachodzi w tworzącym się zawiązku gonady obu płci genetycznych ani w różnicującym się jajniku. Androgeny mogłyby tu doprowadzić do niepowołanej maskulinizacji organizmu. Wykazano, że czynnik WNT4, obecny w zawiązkach gonad oraz w jajnikach, hamuje ekspresję genów kodujących enzymy 3β -dehydrogenaza hydroksysteroidowa (3β HSD, *3\beta-hydroxysteroid dehydrogenase*) oraz CYP17, które biorą udział w syntezie hormonów steroidowych. Stężenie białka WNT4 spada w różnicującym się jądrze, wzrasta natomiast ekspresja genu *Sfl*, co umożliwia syntezę hormonów płciowych [57, 58].

Mutacje genów determinacji płci żeńskiej

Przypadki mężczyzn o żeńskim genotypie 46,XX pozabawionych genu *SRY* wskazują, że istnieje hipotetyczny pierwotny czynnik stojący na szczycie szlaku kierującego różnicowaniem się jajnika. Jego unieczynnienie powinno prowadzić do odwrócenia płci żeńskiej w męską, a duplikacja odwrócenia płci męskiej w żeńską. W dodatku czynnik ten powinien działać jako represor męskiego szlaku różnicowania gonad. Początkowo sugerowano, że czynnikiem takim może być DAX1 (*dosa-*

ge-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome gene 1), a więc jądrowy receptor kodowany w specyficznym regionie chromosomu X, którego duplikacja prowadzi do odwrócenia płci męskiej w żeńską [59]. Pewne obserwacje wskazywały, że WNT4 jest kluczowym czynnikiem rozwoju jajnika, jednak ostatnie badania ujawniły, że R-spondyna 1 kodowana przez gen *RSPO1* stanowi pierwotny czynnik determinacji płci żeńskiej u ludzi, ponieważ jej mutacja doprowadza do całkowitego odwrócenia płci u osobników 46,XX.

Gen DAX1

Niektóre fenotypowe kobiety z męskim genotypem 46,XY, wykazujące czystą dysgenezę gonad, mają duplikację pewnego regionu krótkiego ramienia chromosomu X zwanego DSS (*dosage-specific sex region*). Jednak pacjenci 46,XY z delecją tego regionu rozwijają się w mężczyzn, tak więc nie wykazują zaburzeń determinacji płci [60]. Zidentyfikowano w ten sposób gen *DAX1*, którego brak powoduje wrodzoną hipoplazję nadnerczy często współistniejącą z hipogonadyzmem hipogonadotropowym i zaburzeniami spermatogenezy, ale niezwiązaną z odwróceniem płci [61].

Podobnie u myszy duplikacja genu *Dax1* prowadzi do całkowitego odwrócenia płci osobników XY. Zaskakujące, że hemizygotyczna delecja *Dax1* (*Dax1^{-/-}*) na niektórych tłach genetycznych powoduje całkowite odwrócenie płci i w efekcie rozwój osobników w samice, mimo niezaburzonej ekspresji genu *Sry*. Samice takie posiadają jajniki i jajowody, w ich gonadach różnicują się pęcherzyki jajnikowe, a od samic dzikiego typu różni je jedynie brak ciałek żółtych. Tak więc mimo genotypu XY, u takich „samic” we wczesnym okresie komórki linii płciowej wchodzi w mejozę, a w dorosłym życiu tworzą owulujące oocyty. Wskazuje to, że DAX1 bierze udział w rozwoju przede wszystkim gonad męskich. Przypuszczalnie ten czynnik uczestniczy w podwyższeniu ekspresji genu *Sox9* w sposób zależny od dawki i nie stanowi pierwotnego czynnika determinacji płci żeńskiej. Czynniki DAX1, podobnie jak SF1, bierze udział w różnicowaniu organów steroidogennych, takich jak gonady, nadnercza, ale także narządów kontrolujących ich pracę, takich jak podwzgórze i przysadka mózgowa. Ponadto czynniki SF1 i DAX1 mogą na siebie oddziaływać. Czynniki SF1 podwyższa ekspresję *Dax1*, a ten zwrótnie hamuje ekspresję *Sfl* [5].

Czynnik WNT4

Kolejnym istotnym czynnikiem w żeńskim szlaku determinacji płci jest WNT4 [62]. Samice myszy i jedna dotychczas opisana kobieta z mutacją genu kodującego białko WNT4 wykazują maskulinizację, a brak ekspresji genów różnicowania jądra wskazuje, że WNT4

nie stanowi pierwotnego czynnika determinacji płci żeńskiej [57]. Maskulinizacja u kobiety z mutacją heterozygotyczną *WNT4*^{+/-} wynika ze wzrostu syntezy androgenów [63], natomiast brak przewodów Müllera u tej kobiety wynika z roli jaką odgrywa czynnik WNT4 w tworzeniu tych narządów.

Mężczyźni z duplikacją genu *WNT4* charakteryzują się różnorodnością zaburzeń w różnicowaniu płciowym od wnętrza po obojnacze narządy płciowe [64–66]. Prawdopodobnie wynika to z obniżenia syntezy testosteronu.

Wykazano, że *WNT4* jest istotny również dla rozwoju gonady męskiej. Otóż myszy XY z homozygotyczną delecją genu *Wnt4* posiadają obniżony poziom ekspresji genu *Sox9* i dlatego wykazują zaburzenia różnicowania się komórek Sertoliego, deformacje sznurów jądrowych, jak również obniżenie liczby komórek Leydiga [58], co przypomina skutki mutacji *Dax1*^{-X} u myszy XY.

Główny gen determinacji płci żeńskiej — *RSPO1*

Badania genomu pewnej włoskiej rodziny, w której występuje skłonność do dłoniowo-podeszwowego nadmiernego rogowacenia, łuskowego nowotworu skóry oraz bezpłodności mężczyzn, wykazały, że ci mężczyźni posiadają żeński genotyp, a więc 46,XX^{Sry}. Okazało się, że takie odwrócenie płci jest spowodowane mutacją genu *RSPO1*, położonego na 1 chromosomie [67]. Ta mutacja polegała na insercji jednego nukleotydu guaninowego do czwartego kodonu piątego egzonu genu *RSPO1*. Spowodowało to przesunięcie ramki odczytu, pojawienie się kodonu stop i w efekcie skrócenie wszystkich izoform czynnika R-spondyny 1. Z kolei w innej włoskiej rodzinie delecja czwartego egzonu prowadziła do podobnych skutków [67].

W ten sposób okazało się, że R-spondyna 1, kodowana przez gen *RSPO1*, stoi na szczycie szlaku różnicowania jajnika, a jej mutacja pozwala na całkowite przejście kontroli nad gonadą XX przez szlak różnicowania jądra. Dodatkowo wykazano, że R-spondyna 1 ulega ekspresji w gonadzie XX w decydującym momencie determinacji płci żeńskiej. Niemniej jednak duplikacja regionu chromosomu 1 obejmująca gen *RSPO1* (dup1p31–35) nie powoduje całkowitego odwrócenia płci, czego należałoby się spodziewać po duplikacji pierwotnego genu determinacji płci, ale skutkuje jedynie feminizacją genitaliów osobnika o męskim genotypie [66]. U myszy XX wyłączenie ekspresji obu alleli genu *Rspo1* skutkuje częściowym odwróceniem płci [68]. Mutanty takie charakteryzują się obojnaczymi narządami płciowymi wewnętrznymi, formowaniem się unaczynienia typowego dla gonady męskiej, nadprodukcją testosteronu oraz apoptozą oocytów, co przypomina skutki mutacji genu *Wnt4*. Zastanawiające, że mutacja

genu *RSPO1* u ludzi ma poważniejsze następstwa niż mutacja genu *WNT4*, mimo że białka kodowane przez te geny działają w jednym szlaku. Być może R-spondyna 1 jest w stanie w pełni zastąpić czynnik WNT4, a ten natomiast nie może zastąpić R-spondyny 1. Kluczowe dla tych rozważań mogą być ostatnie wyniki badań ukazujące, że R-spondyna 1 odpowiada za zahamowanie zmniejszania liczby receptorów błonowych czynnika WNT4 i tym samym jest istotna dla podtrzymania jego działania [69].

Wydaje się, że musi istnieć jeszcze jeden główny gen determinacji płci żeńskiej, o czym świadczy opisana u kobiety o męskim genotypie duplikacja regionu chromosomu 1 (dup1p22.3p32.3) nieobejmująca ani genu *RSPO1*, ani *WNT4* [70].

Pozostałe geny determinacji i różnicowania płci żeńskiej

Wykazano, że szlak żeński w różnicującym się jajniku podnosi ekspresję genów hamujących proliferację komórek somatycznych gonady, migrację komórek śródnerczowych do gonady, różnicowanie komórek Leydiga oraz tworzenie unaczynienia charakterystycznego dla gonady męskiej. Do genów tych należy między innymi *Bmp2* oraz *Fst*, kodujący folistatynę. Mutacja mysiego genu *Fst* prowadzi do tworzenia się jądrowego unaczynienia w gonadzie XX [71], jednak nie opisano mutacji tego genu u ludzi.

U kóz o genotypie XX mutacja genu *Foxl2* (*forkhead transcription factor 2*) skutkuje zespołem PIS (*polled XX intersex syndrome*), któremu towarzyszy odwrócenie płci, co może wskazywać, że ten gen uczestniczy w determinacji płci [72, 73]. Unieczynnienie genu *Foxl2* u myszy prowadzi do wyzwolenia ekspresji genów męskiego szlaku w gonadzie XX oraz do zaniku oocytów w okresie okołoporodowym, co sugeruje funkcję tego genu w determinacji płci także u myszy [74]. U ludzi mutacja genu *FOXL2* prowadzi do zespołu BPES (*blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome; zwężenie szpary powiekowej-opadanie powiek-odwrócona zmarszczka nąkątna*), któremu towarzyszy degeneracja pierwotnych pęcherzyków jajnikowych, lecz nie odwrócenie płci [75].

Zaburzenia interakcji komórek somatycznych i komórek linii płciowej

Odwrócenia płci prowadzą do bezpłodności. W przypadku osobników męskich o genotypie XX, a więc żeńskim, spermatogonia w jądrach zamierają w okresie okołoporodowym, co wynika z braku genów chromosomu Y, które są konieczne dla przetrwania komórek spermatogenicznych [76]. Między innymi geny regionu czynnika azoospermii (*AZF*, *azoospermia factor*), mieszczącego się na długim ramieniu chromosomu Y, są koniecz-

ne dla przebiegu procesu spermatogenezy [77]. Mikrodelecje i mutacje genów tego regionu coraz szerzej analizuje się podczas diagnozowania bezpłodności mężczyzn, jednak nie mają one wpływu na determinację i różnicowanie płci. Z kolei w jajniku osobnika XY część oocytów zamiera w okresie okołoporodowym, co stanowi następstwo braku koniugacji chromosomu X. Pozostała część oocytów ulega apoptozie w późniejszym czasie z powodu negatywnego wpływu genów chromosomu Y [78].

Komórki linii płciowej nie są konieczne dla rozwijającego się jądra, ponieważ ich brak nie zaburza rozwoju somatycznych elementów gonady męskiej. Jądro pozbawione komórek germinalnych jest o połowę mniejsze od typowego jądra, a stan taki nazywany jest zespołem del Castillo lub zespołem samych komórek Sertoliego (*only-Sertoli cells syndrome*). Przeciwnie jest w przypadku jajników, gdzie komórki linii płciowej są konieczne dla utrzymania jego właściwej struktury [79, 80]. Jeśli w gonadzie od początku brakuje komórek germinalnych, pęcherzyki jajnikowe nie tworzą się, natomiast, gdy dojdzie do apoptozy komórek płciowych w utworzonych już pęcherzykach następuje degeneracja pęcherzyków. Dla formowania się pęcherzyków jajnikowych u myszy konieczna jest ekspresja genu *Fig2a* (*factor in germ line 2a*) w oocytach [81]. Mutacja tego genu skutkuje brakiem tworzenia pęcherzyków jajnikowych i w efekcie apoptozą oocytów tuż po porodzie. Komórki pęcherzykowe wykazują ekspresję genu *Foxl2*, który także odpowiada za formowanie pęcherzyków [80]. Mutacje genów, takich jak: *Rspo1*, *Wnt4*, *Foxl2*, *Fig2a* prowadzą do apoptozy oocytów wynikającej między innymi z degeneracji pęcherzyków jajnikowych. Taki zanik żeńskich komórek płciowych powoduje wyzwolenie szlaku męskiego w komórkach somatycznych jajnika i ich przekształcenie się w komórki Sertoliego. Jednak niektóre badania wskazują na wyzwolenie ekspresji genów męskich jeszcze przed zanikiem oocytów [74]. W gonadzie wykazującej wtórne odwrócenie płci można obserwować nawet tworzenie się kanalików nasennych i różnicowanie się komórek Leydiga.

Rola hormonów płciowych w rozwoju gonady

Wyłączenie ekspresji genu kodującego aromatazę (ArKO, *aromatase knockout*) lub genów kodujących oba receptory estrogenów (ER α βKO, *knockouts of estrogen receptors α and β*) nie doprowadza do zaburzeń rozwoju jajników u myszy [82, 83]. Ale tuż po okresie dojrzewania płciowego w ich jajnikach rozpoczyna się ekspresja zarówno genów szlaku determinacji płci męskiej (tj. *Sox9*), jak i genów różnicowania jądra (tj. *Dhh*), a komórki pęcherzykowe dojrzałych pęcherzyków jajniko-

wych przekształcają się w komórki Sertoliego. Poza tym tworzą się struktury przypominające kanaliki nasienne jądra i komórki podobne do komórek Leydiga [83–85]. Efekt ten jest podobny do skutków mutacji prowadzących do apoptozy oocytów. Wskazuje to na fakt, że estrogeny nie są istotne dla determinacji płci ani dla różnicowania jajników, ale są konieczne dla utrzymania struktury i funkcji gonady żeńskiej w okresie postnatalnym. Estrogeny są konieczne dla uchronienia jajnika przed wyzwoleniem męskiego szlaku, które mogłyby być przyczyną przekształcania się komórek pęcherzykowych w komórki Sertoliego.

Wnioski końcowe

Porównywanie mutacji genów kontroli rozwoju gonad u myszy i ludzi wskazuje na istnienie bardzo podobnych mechanizmów determinacji i różnicowania płci u obu gatunków. Różnice dotyczą jedynie większej zależności determinacji płci od dawki czynników u człowieka, ponadto czynnik DMRT1 prawdopodobnie ma bardziej znaczący udział w determinacji płci u człowieka i w różnicowaniu jądra u myszy, natomiast czynnik DHH odgrywa istotniejszą rolę w rozwoju jądra u człowieka niż u myszy. Cenne okazały się badania identyfikacji wszystkich transkryptów w rozwijającej się gonadzie [86, 87]. Analiza genów ulegających ekspresji w gonadzie podczas determinacji płci i różnicowania gonad może prowadzić do zidentyfikowania nowych genów kluczowych dla tych procesów. Jest to konieczne, ponieważ opisano wiele mutacji w genomie człowieka, które skutkują zaburzeniami determinacji płci w niewyjaśniony sposób. Na przykład duplikacja regionu 22q prowadząca do hermafrodytyzmu prawdziwego osobników 46,XX, duplikacja 10q26-qter oraz delecja 2q31 powodujące całkowite odwrócenie płci pacjentów 46,XY lub delecja 12q24.31-q24.33 skutkująca feminizacją osobnika o męskim genotypie [5].

Geny determinacji płci można wyróżnić po odwróceniu płci będącym wynikiem ich mutacji. Czynnik SRY uważa się za najważniejszy — jego obecność lub brak decyduje o płci osobnika, dlatego to właśnie na genie SRY koncentruje się analiza genetyczna pacjentów z zaburzeniami interseksualnymi. Jednak badania przeprowadzone na myszach wykazują istnienie wielu genów odpowiedzialnych za ustalenie płci osobnika, co jest zgodne z licznymi przypadkami interseksualizmu i odwróceń płci o niewyjaśnionym podłożu. Kolejnym kluczowym genem determinacji płci męskiej prawdopodobnie wszystkich kręgowców, a nawet zwierząt tkankowych jest *SOX9/Sox9*. Dotychczas nie udało się znaleźć związku FGF9 z determinacją płci człowieka.

Determinacja płci wydaje się bardziej skomplikowana, jako że niektóre geny pierwotnie opisane jako „an-

tyjądrowe” okazały się konieczne dla rozwoju jądra. Genem stojącym na szczycie kaskady determinacji płci żeńskiej wydaje się R-spondyna 1, kodowana przez gen *RSP01*. Zdziwiająco, że mutacja jednego autosomowego genu potrafi całkowicie odwrócić płęć. Przyszłe badania powinny pokazać jakie skutki ma wyłączenie ekspresji genu *Rspo1* u myszy.

Mutacje pewnych genów, takich jak: *Sfl*, *Dhh*, *Arx*, *Atrx*, prowadzą do zaburzeń endokrynych funkcji komórek Leydiga w gonadach męskich już w okresie płodowym, w wyniku których stężenie testosteronu zostaje obniżone. Jest to przyczyną hermafrodytyzmu rzekomego męskiego lub nawet całkowitego odwrócenia płci przy zupełnym braku syntezy testosteronu w gonadach. Mutacja genu *WNT4* u pacjentki o żeńskim genotypie doprowadziła do zwiększenia liczby komórek steroidogennych w gonadach, co prawdopodobnie stanowiło następstwo wnikania komórek z zawiązku nadnerczy do gonad. Nadmiar testosteronu spowodował częściową maskulinizację ciała, a więc hermafrodytyzm rzekomy żeński. Sam testosteron nie jest jedynym androgenem funkcjonującym w organizmie. Pod wpływem enzymu 5- α -reduktazy testosteron przemieniany jest w dihydrotestosteron (DHT), który odpowiada za rozwój prącia i prostaty. Mutacje w genie kodującym 5- α -reduktazę, który leży na 2. chromosomie człowieka, powodują różny stopień wirylicacji zewnętrznych narządów płciowych męskich [88]. Podczas diagnozowania zaburzeń determinacji i różnicowania płci istotne jest wykluczenie bądź potwierdzenie mutacji w tym genie.

Poza hormonami steroidowymi gonada męska, a konkretnie komórki Sertoliego wydzielają także hormon antymüllerowski (AMH), odpowiedzialny za regresję przewodów Müllera. Niewłaściwa synteza AMH lub jego receptora MIS-RII (*Müllerian inhibiting substance receptor II*) prowadzi do PMDS, któremu towarzyszy wnetrostwo. Kolejny hormon wydzielany przez płodowe jądro to insulinopodobny czynnik 3 (*Insl3*, *insulin-like factor 3*), wymagany do właściwego zstępowania jąder do moszny.

Powyższe rozważania wskazują na fakt, że proces rozwoju gonady jest bardzo istotny dla prawidłowego wykształcenia płci osobnika. Wiele genów uczestniczy w determinacji i różnicowaniu płci. Wydaje się jednak, że wielu z nich dotychczas nie scharakteryzowano, co tłumaczy dużą liczbę zaburzeń interseksualnych o niewyjaśnionych przyczynach.

Piśmiennictwo

1. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS i wsp. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990; 346: 240–244.

2. Gubbay J, Collignon J, Koopman P i wsp. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990; 346: 245–250.
3. Jost A. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1947; 36: 271–315.
4. Szczeklik A. Choroby wewnętrzne. Medycyna praktyczna, Kraków 2005.
5. Fleming A, Vilain E. The endless quest for sex determination genes. *Clin Genet* 2004; 67: 15–25.
6. Camerano G, Parma P, Radi O i wsp. Sex determination and sex reversal. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 289–292.
7. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 2007; 87: 1–28.
8. Wilhelm D, Martinson F, Bradford S i wsp. Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev Biol* 2005; 287: 111–124.
9. Giese K, Pagel J, Grosschedl R. Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human SRY sex-determining factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3368–3372.
10. Piprek RP. Genetyczne mechanizmy determinacji płci i różnicowania gonad ssaków. *Kosmos* 2007; 56: 39–48.
11. Polanco JC, Koopman P. *Sry* and the hesitant beginnings of male development. *Dev Biol* 2007; 302: 13–24.
12. Kim Y, Kobayashi A, Sekido R i wsp. *Fgf9* and *Wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLOS Biol* 2006; 4: 1000–1009.
13. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 509–521.
14. Yao HH. The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 230: 87–93.
15. Achermann JC, Ozisik G, Ito M i wsp. Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1829–1833.
16. Jaubert F, Vasiliu V, Patey-Mariaud Serre N i wsp. Gonadal development in Drash and Frasier syndromes depends on WT1 mutations. *Arkh Patol* 2003; 65: 40–44.
17. de Santa Barbara P, Mejean C, Moniot B i wsp. Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol Reprod* 2001; 64: 775–783.
18. Pilon N, Daneau I, Paradis V i wsp. Porcine SRY promoter is a target for steroidogenic factor 1. *Biol Reprod* 2003; 68: 1098–1106.
19. Parker KL, Rice DA, Lala DS i wsp. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 19–36.
20. Biason-Lauber A, Schoenle EJ. Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1563–1568.
21. Achermann JC, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 1999; 22: 125–126.
22. Correa RV, Domenice S, Bingham NC i wsp. A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1767–1772.
23. Wagner KD, Wagner N, Schedl A. The complex life of WT1. *J Cell Sci* 2003; 116: 1653–1658.
24. Shimamura R, Fraizer GC, Trapman J i wsp. The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Müllerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 2571–2580.
25. Hossain A, Saunders GF. Synergistic cooperation between the beta-catenin signaling pathway and steroidogenic factor 1 in the activation of the Müllerian inhibiting substance type II receptor. *J Biol Chem* 2003; 278: 26511–26516.
26. Klamt B, Koziell A, Poulat F i wsp. Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 709–714.
27. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. The biology of human germ cell tumors: Retrospective speculations and new perspectives. *Eur Urol* 1993; 23: 245–250.
28. Discenza MT, Pelletier J. Insights into the physiological role of WT1 from studies of genetically modified mice. *Physiol Genomics* 2004; 16: 287–300.
29. Palmer SJ, Burgoyne PS. In situ analysis of fetal, prepubertal and adult XX/XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development* 1991; 112: 265–268.
30. Ford CE. Genetic activity of sex chromosomes in genital cells. *Phil Trans Roy Soc Lond B* 1970; 259: 53–55.
31. Mittwoch U. Genetics of sex determination: exceptions that prove the rule. *Mol Genet Metab* 2000; 71: 405–410.

32. McElreavey K, Barbaux S, Ion A i wsp. The genetic basis of murine and human sex determination: a review. *Heredity* 1995; 75: 599–611.
33. Knowler KC, Kelly S, Harley VR. Turning on the male — SRY, SOX9 and sex determination in mammals. *Cytogenet Genome Res* 2003; 101: 185–198.
34. Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG i wsp. *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 2001; 28: 216–217.
35. Huang B, Wang S, Ning Y i wsp. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet* 1999; 87: 349–353.
36. Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J i wsp. Homozygous inactivation of *Sox9* causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod* 2006; 74: 195–201.
37. Wilhelm D, Hiramatsu R, Mizusaki H i wsp. SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription *in vivo* to ensure testis development. *J Biol Chem* 2007; 282: 10553–10560.
38. Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI i wsp. Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse. *Development* 2004; 131: 1891–1901.
39. Argentaro A, Sim H, Kelly S i wsp. A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J Biol Chem* 2003; 278: 33839–33847.
40. Preiss S, Argentaro A, Clayton A i wsp. Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding and transcriptional activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 27864–27872.
41. Gasca S, Canizares J, De Santa Barbara P i wsp. A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11199–11204.
42. Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: *in vivo* definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 1999; 99: 409–419.
43. Brennan J, Tilmann C, Capel B. *Pdgfr-a* mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev* 2003; 17: 800–810.
44. Raymond CS, Shamu CE, Shen MM i wsp. Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 1998; 391: 691–695.
45. Alfi O, Donnell GN, Crandall BF i wsp. Deletion of the short arm of chromosome no.9 (46,9p-): a new deletion syndrome. *Ann Genet* 1973; 16: 17–22.
46. Veitia R, Nunes M, Brauner R i wsp. Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3–p24.1. *Genomics* 1997; 41: 271–274.
47. Flejter WL, Fergestad J, Gorski J i wsp. A gene involved in XY sex reversal is located on chromosome 9, distal to marker D9S1779. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 794–802.
48. Calvari V, Bertini V, De Grandi A i wsp. A new submicroscopic deletion that refines the 9p region for sex reversal. *Genomics* 2000; 65: 203–212.
49. Koopman P, Loffler KA. Sex determination: the fishy tale of *Dmrt1*. *Curr Biol* 2003; 13: R177–R179.
50. Yao HH, Whoriskey W, Capel B i wsp. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* 2002; 16: 1433–1440.
51. Umehara F, Tate G, Itoh K i wsp. A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1302–1305.
52. Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L i wsp. Clinical and hematologic aspects of the X-linked α -thalassaemia/mental retardation syndrome (ATR-X). *Am J Med Genet* 1995; 55: 288–299.
53. Tang P, Park DJ, Marshall Graves JA i wsp. ATRX and sex differentiation. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 339–344.
54. Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N i wsp. Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nature Genet* 2002; 32: 359–369.
55. Jeyasuria P, Ikeda Y, Jamin SP i wsp. Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 1610–1619.
56. Cui S, Ross A, Stallings N i wsp. Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in *Pod1* knockout mice. *Development* 2004; 131: 4095–4105.
57. Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J i wsp. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development* 2003; 130: 3663–3670.
58. Jeays-Ward K, Dandonneau M, Swain A. *Wnt4* is required for proper male as well as female sexual development. *Dev Biol* 2004; 276: 431–440.
59. Swain A, Narvaez V, Burgoyne P i wsp. *Dax1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. *Nature* 1998; 391: 761–767.
60. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S i wsp. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 1994; 7: 497–501.
61. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B i wsp. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 1994; 372: 635–641.
62. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A i wsp. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999; 397: 405–409.
63. Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F i wsp. A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46 XX woman. *N Engl J Med* 2004; 351: 792–798.
64. Cousineau AJ, Higgins JV, Hackel E i wsp. Cytogenetic recognition of chromosomal duplication [dup(1)(p31.4 leads to p22.1)] and the detection of three different alleles at the PGM1 locus. *Ann Hum Genet* 1981; 45: 337–340.
65. Mohammed FM, Farag TI, Gunawardana SS i wsp. Direct duplication of chromosome 1, dir dup(1)(p21.2–p32) in Bedouin boy with multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet* 1989; 32: 353–355.
66. Elejalde BR, Opitz JM, de Elejade i wsp. Tandem dup (1p) within the short arm of chromosome 1 in a child with ambiguous genitalia and multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet* 1984; 17: 723–730.
67. Parma P, Radi O, Vidal V i wsp. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006; 38: 1304–1309.
68. Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R i wsp. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet* 17: 1278–1291.
69. Binnerts ME, Kim KA, Bright JM i wsp. R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 14700–14705.
70. Wieacker P, Volleth M. *WNT4* and *RSPO1* are not involved in a case of male-to-female sex reversal with partial duplication of 1p. *Sex Dev* 2007; 1: 111–113.
71. Yao HH, Matzuk MM, Jorgez C i wsp. Follistatin operates downstream of *Wnt4* in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn* 2004; 230: 210–215.
72. Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S i wsp. A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nature Genet* 2001; 29: 453–458.
73. Uda M, Ottolenghi C, Crispini L i wsp. *Foxl2* disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1171–1181.
74. Ottolenghi C, Omari S, Garcia-Ortiz JE i wsp. *Foxl2* is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2053–2062.
75. Loffler KA, Zarkower D, Koopman P. Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* 2003; 144: 3237–3243.
76. Cattanach BM, Pollard CE, Hawker SG. Sex-reversed mice: XX and XO males. *Cytogenetics* 1971; 10: 318–337.
77. Qureshi SJ, Ross AR, Ma K i wsp. Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically determined spermatogenic failure in men. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 775–779.
78. Turner JMA, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O i wsp. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat Genet* 2005; 37: 41–47.
79. Merchant H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol* 1975; 44: 1–21.
80. McLaren A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol* 1984; 38: 7–23.
81. Soyat SM, Amleh A, Dean J. Fl. α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 2000; 127: 4645–4654.
82. Britt KL, Stanton PG, Misso M i wsp. The effects of estrogen on the expression of genes underlying the differentiation of somatic cells in the murine gonad. *Endocrinology* 2004; 145: 3950–3960.
83. Dupont S, Krust A, Gansmuller i wsp. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000; 127: 4277–4291.
84. Britt KL, Kerr J, O'Donnell L i wsp. Estrogen regulates development of the somatic cells phenotype in the eutherian ovary. *FASEB J* 2002; 16: 1389–1397.
85. Britt KL, Findlay JK. Regulation of the phenotype of ovarian somatic cells by estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202: 11–17.
86. Beverdam A, Koopman P. Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 417–431.
87. Nef S, Schaad O, Stallings NR i wsp. Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev Biol* 2005; 287: 361–377.
88. Hochberg Z, Chayen R, Reiss N i wsp. Clinical, biochemical and genetic findings in a large pedigree of male and female patients with 5 α -reductase 2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2821–2827.