

BOGDAN KALUŻEWSKI

*Zakład Genetyki Medycznej Instytutu Endokrynologii
Akademii Medycznej w Łodzi
Sterlinga 3, 91-425 Łódź*

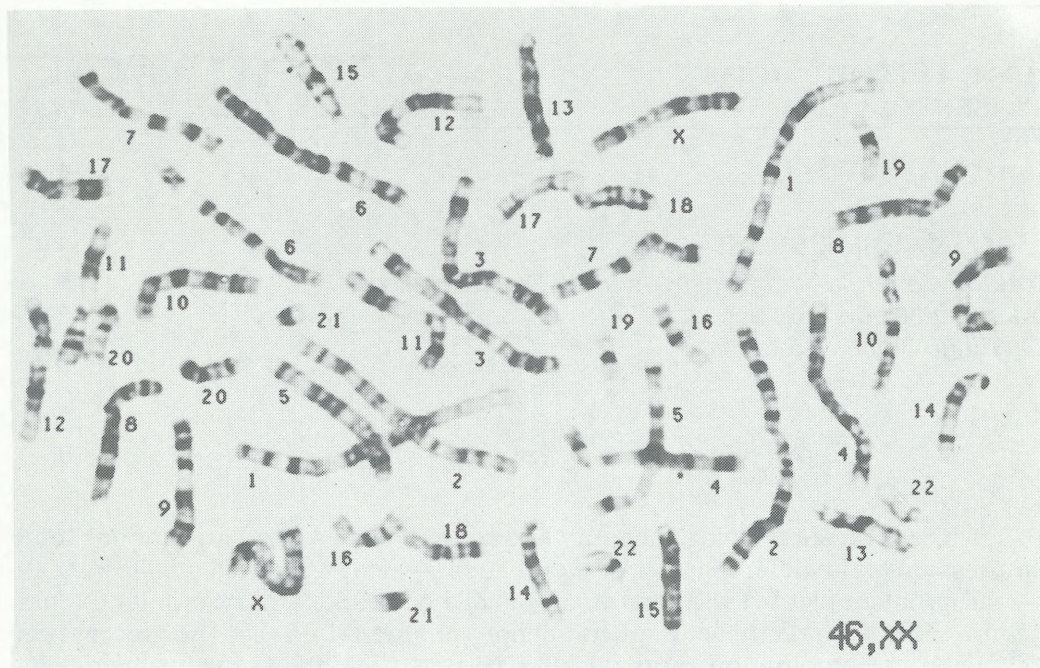
CZY CHROMOSOMY PŁCIOWE SĄ NAM POTRZEBNE?

„There is no such biological entity as sex. ..., it is merely a name for our total impression of the differences” (MITTWOCH 1992 — cytata wypowiedzi Lillie z 1932) — tak problem płci był widziany przez biologa o szerokich horyzontach 62 lata temu. „Sex is a composite phenomenon characterized by the succession of fusion, recombination, and division” (HOEKSTRA 1990) — tak problem płci i prokreacji rozumie współczesny genetyk populacyjny. Jednoznacznie i arbitralnie seks opisują z natury rzeczy związane słowniki: „sex 1. being male or female,... 2. males and females as a group...”. (HORNBY 1974).

Trzeba przyznać, że powszechne poczucie przynależności płciowej jest tak oczywiste, że często nie skłania do głębszej refleksji i jest raczej bliższe pojęciu słownikowemu niż dwóm wyżej przytoczonym poglądom. Jednak współcześnie rozumiany problem identyfikacji płci nie jest ani łatwy ani jednoznacznie określony. W praktyce zawodowej lekarza ginekologa, endokrynologa, genetyka i psychiatry z całą pewnością powinniśmy uwzględniać szereg kryteriów płci, takich jak:

- płeć chromosomową (w tym także chromatynową, której pojęcie jest związane z obecnością grudek chromatyny X w jądrach komórkowych kobiety oraz grudek chromatyny Y w jądrach komórkowych mężczyzny);
- płeć gonadalną (określoną determinacją pierwotnej gonady);
- płeć endokrynną (zdeteminowaną podjęciem czynności endokrynnnej przez gonadę i udział hormonów płciowych w regulacji osi: podwzgórze, przysadka mózgowa, gonada niezależnie od ich funkcji autonomicznych w procesie dojrzewania);
- płeć fenotypową (wewnętrznych, w pierwszej kolejności, nieco później zewnętrznych narządów płciowych) jako efekt płci hormonalnej;
- płeć metrykalną będącą prostą, cywilno-prawną konsekwencją ustalenia płci fenotypowej;
- płeć psychologiczną (psychoseksualną, psychospołeczną i inne).

Rozpoznawanie płci chromosomowej stało się możliwe dzięki metodom umożliwiającym obserwację chromosomów człowieka w stadium podziału komórki (ryc. 1).



Ryc. 1. Stadium podziału limfocyta krwi obwodowej. Chromosomy zostały zabarwione techniką GTG (G-bands by trypsin using giemsa). Charakterystyczny wzór prążków umożliwia jednoznaczną identyfikację 23 par chromosomów (kariotyp 46,XX).

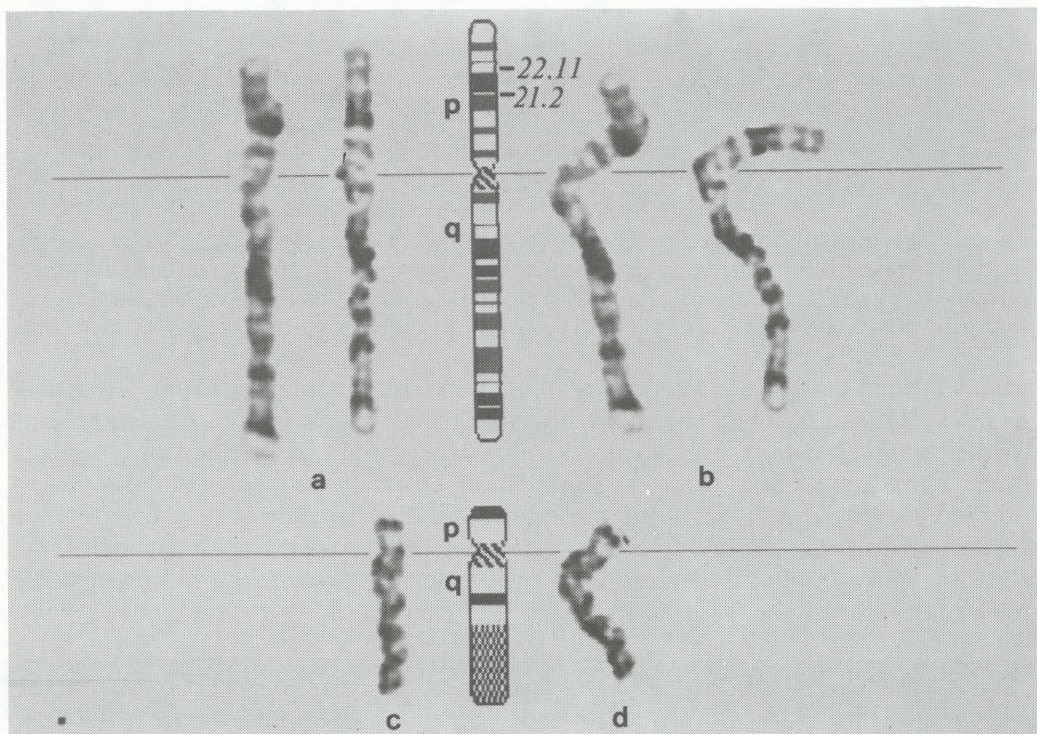
Każdy z 46 prezentowanych chromosomów może być rozpoznany dzięki charakterystycznemu wzorowi prążkowemu, który umożliwia nie tylko jednoznaczną identyfikację chromosomów, ale również pozwala na rozpoznanie ich aberracji strukturalnych. Twórcy systemu nomenklaturowego ramię długie każdego z chromosomów opisali literą q, natomiast ramię krótkie literą p. W chromosomach wyróżniono regiony ograniczone punktami granicznymi, którymi najczęściej są wyraźne, łatwe do identyfikacji prążki, centromery i telomery chromosomów. Poszczególne prążki ponumerowano, co umożliwia odwoływanie się do poszczególnych prążków bez względu na stopień rozdzielczości metody prążkowej, za pomocą której badamy chromosomy (ryc. 2).

Zapis Xp21.2p22.11 w sposób jednoznaczny opisuje region, w którym autor (ARN i współaut. 1994) lokalizuje, na przykład, locus SRVX (sex reversal X) — patrz niżej. Sekwencje prążków negatywnych i pozytywnych oraz ich wzajemną relację w chromosomie X charakteryzuje powtarzalność zarówno międzykomórkowa, jak i międzyosobnicza. Odmienne pod tym względem zachowuje się chromosom Y, który dziedzicząc się w sposób holandryczny zachowuje stałą liczbę i układ prążków w obrębie jednej rodziny, ale jednocześnie charakteryzuje się znacznym polimorfizmem międzyosobniczym (ryc. 3). Każdy z trzech chromosomów Y, przedstawionych na rycinie 3 i 4, jest prawidłowym chromosomem Y pochodzącym od różnych osobników. Różnice morfologiczne są związane z wielkością nieaktywnego genetycznie bloku heterochromatyny Yq (ryc. 4).

Rozpoznanie płci chromatynowej jest możliwe dzięki jednoczesnemu przeprowadzeniu testów chromatyny X i Y. Testy powyższe polegają na identyfikacji

w jądrze komórki w stadium międzypodziałowym, charakterystycznych grudek chromatyny; w pierwszym przypadku obserwowanych w mikroskopie optycznym w świetle przechodzącym, w drugim przypadku dzięki zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego (ryc. 5).

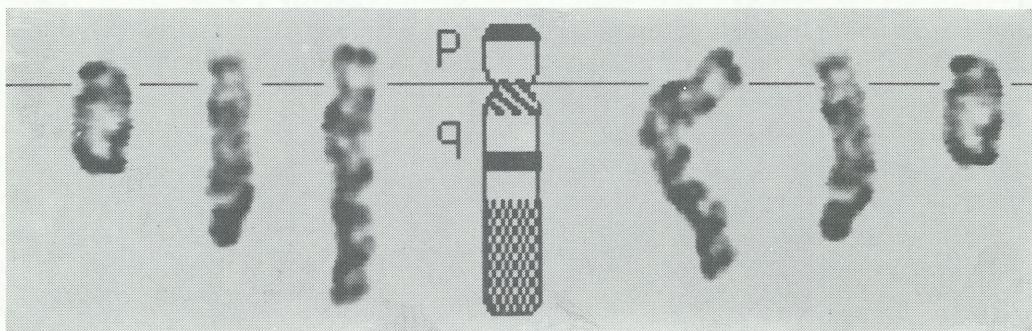
Grudkę chromatyny X identyfikujemy z jednym z dwóch chromosomów płciowych X kobiety, który na drodze losowej ulega genetycznej inaktywacji. Cytologicznym wyrazem inaktywacji jest heterochromatynizacja i heterocykliczna replikacja DNA tego chromosomu. Grudkę chromatyny Y możemy obserwować w mikroskopie dzięki temu, że chromosom Y najczęściej posiada duży blok heterochromatyny, specyficznie barwiący się barwnikami akrydynowymi.



Ryc. 2. Chromosomy barwione techniką G'TG. a, b — chromosomy X, c, d — chromosom Y. Zgodnie z konwencją międzynarodową ramię krótkie chromosomu oznaczamy literą p, ramię długie literą q. Ideogram umożliwia porównanie standardu wzoru prążkowego z wzorem prążkowym w każdym konkretnym przypadku. a-c chromosomy wyprostowane przy użyciu techniki komputerowej, b-d chromosomy w stanie „naturalnym”.

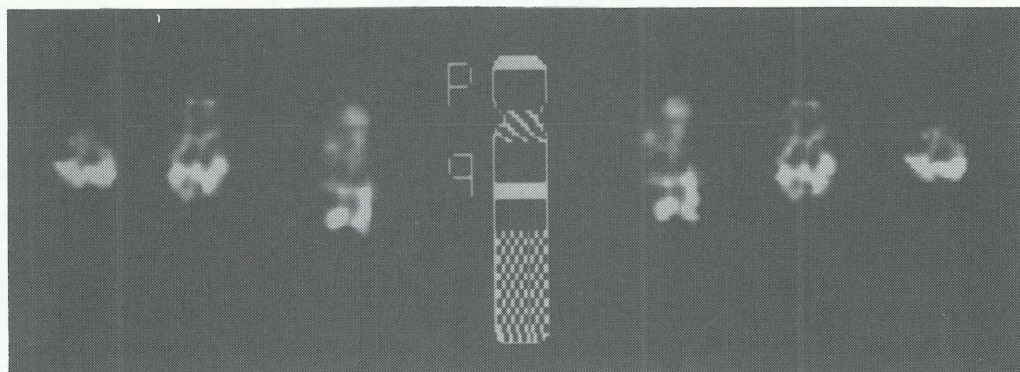
Rozpoznanie płci gonadalnej u zdrowych mężczyzn (porównaj ryciny 4 i 5 b, d) jest łatwe, ale w przypadkach patologicznych często musimy posługiwać się ultrasonografią, laparoskopią lub diagnostyczną laparotomią. Podobnie u kobiet, ultrasonografia przezpówłokowa i przezpochwowa umożliwia lokalizację i opis struktury, którą dzięki obecnej rozdzielczości aparatów można nazwać strukturą morfologiczną jajnika. W patologii często jednak musimy się odwoływać do metod inwazyjnych.

Płeć endokrynną jesteśmy w stanie rozpoznać, określając stężenia hormonów płciowych w surowicy krwi oraz w moczu. Jakkolwiek u obu płci funkcja gonad jest regulowana przez te same hormony — gonadotropiny: FSH (folikulotropinę) i LH (luteotropinę), wydzielanie obu hormonów u obu płci jest odmienne. U mężczyzn podstawowe wydzielanie gonadotropin jest regulowane tonicznym wpływem podwzgórza oraz hamującym działaniem steroidów płciowych. U kobiet cykliczne wydzielanie gonadotropin jest regulowane z jednej strony pulsacyjnym

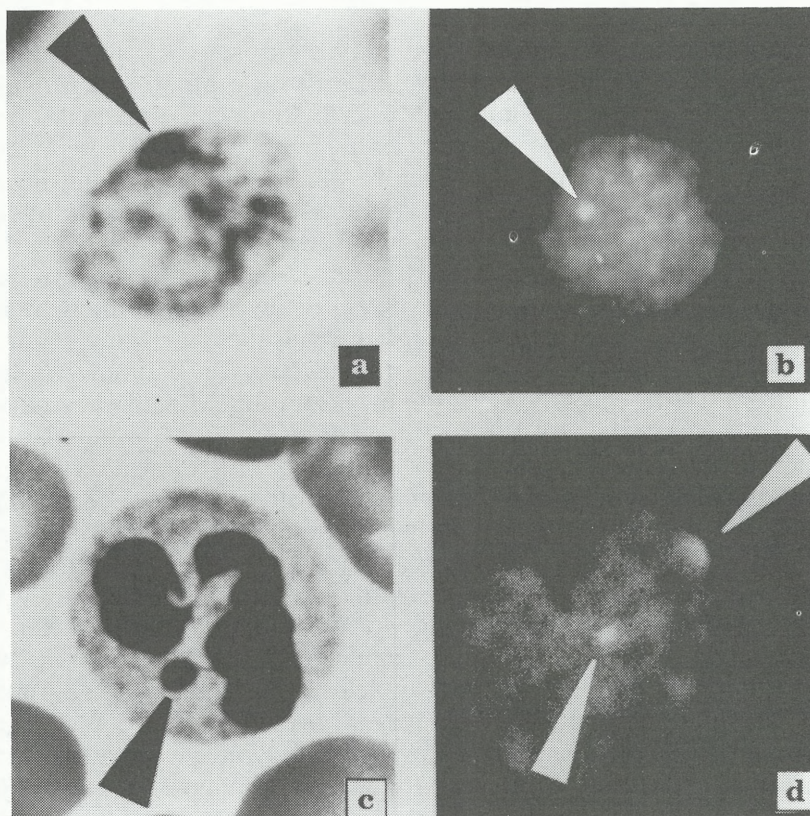


Ryc. 3. Chromosomy barwione techniką GTG. Każdy z chromosomów Y (prawa strona ryciny) pochodzi od innego zdrowego mężczyzny. Chromosomy różnią się morfologicznie, zarówno wzorem prążkowym, jak i długością. Po stronie lewej te same chromosomy wyprostowano komputerowo, co ułatwia porównanie ich wzoru prążkowego z ideogramem.

wydzielaniem GnRH (podwzgórzowy neurohormon uwalniający LH i FSH), z drugiej zaś dodatnim sprzężeniem zwrotnym z estrogenami (głównie estradiolem). Upraszczając, hormonalną płę męską charakteryzują „męskie” poziomy wydzielania testosteronu oraz toniczne wydzielanie gonadotropin, płę żeńską charakteryzuje cykliczne wydzielanie gonadotropin, estrogenów oraz progesteronu. Wprowadzenie do praktyki laboratoryjnej metod immunoenzymatycznych umożliwiających wykonanie oznaczeń poziomów hormonów w ciągu kilkunastu minut, znakomicie zwiększyło kliniczną użyteczność powyższych testów.



Ryc. 4. Chromosomy barwione techniką QFQ (Q — bands by fluorescence using quinacrine). Układ ryciny identyczny jak ryciny 3. Uwagę zwraca polimorfizm heterochromatycznego regionu terminalnego Yq.



Ryc. 5. a — strzałka wskazuje heterochromatyczną grudkę X, b — strzałka wskazuje heterochromatyczną grudkę Y, c — strzałka wskazuje pałeczkę dobosza, którą utożsamia się z chromatyną X, d — strzałki wskazują dwie grudki chromatyny Y, co przemawia za polisomią chromosomu Y. Więcej szczegółów na temat użyteczności testów chromatyny X i Y znajdzie Czytelnik w podręczniku (KAŁUŻEWSKI i JAKUBOWSKI 1992).

Prezentując kryteria rozpoznawania płci pacjenta nie bez powodu na pierwszym miejscu wymieniłem cechy płci męskiej i żeńskiej na poziomie komórkowym (płeć chromosomowa w tym chromatynowa). Kluczem uruchamiającym kaskadę wydarzeń, determinujących rozwój pierwotnej gonady w kierunku jądra, jest bowiem chromosom Y. Niewiele jest wiadomo o roli genu lub genów zaangażowanych w prawidłowe różnicowanie się pierwotnej gonady w kierunku jajnika. U człowieka proces ten przebiega prawidłowo jedynie w obecności dwóch, strukturalnie niezmienionych chromosomów X. Jakkolwiek płeć genetyczna embrionu zostaje zdeterminowana już w momencie zapłodnienia, zależnie od obecności chromosomu X bądź Y w haploidalnym zestawie chromosomów plemnika, to przed upływem 6 tygodnia życia płodowego nie obserwuje się różnic morfologicznych, które w późniejszym okresie stanowić będą o różnicowaniu się pierwotnej gonady w kierunku jajnika lub jądra. O ile rozwój gonady niezróżnicowanej i zróżnicowanej zdaje się głównie zależeć od czynnika chromosomo-

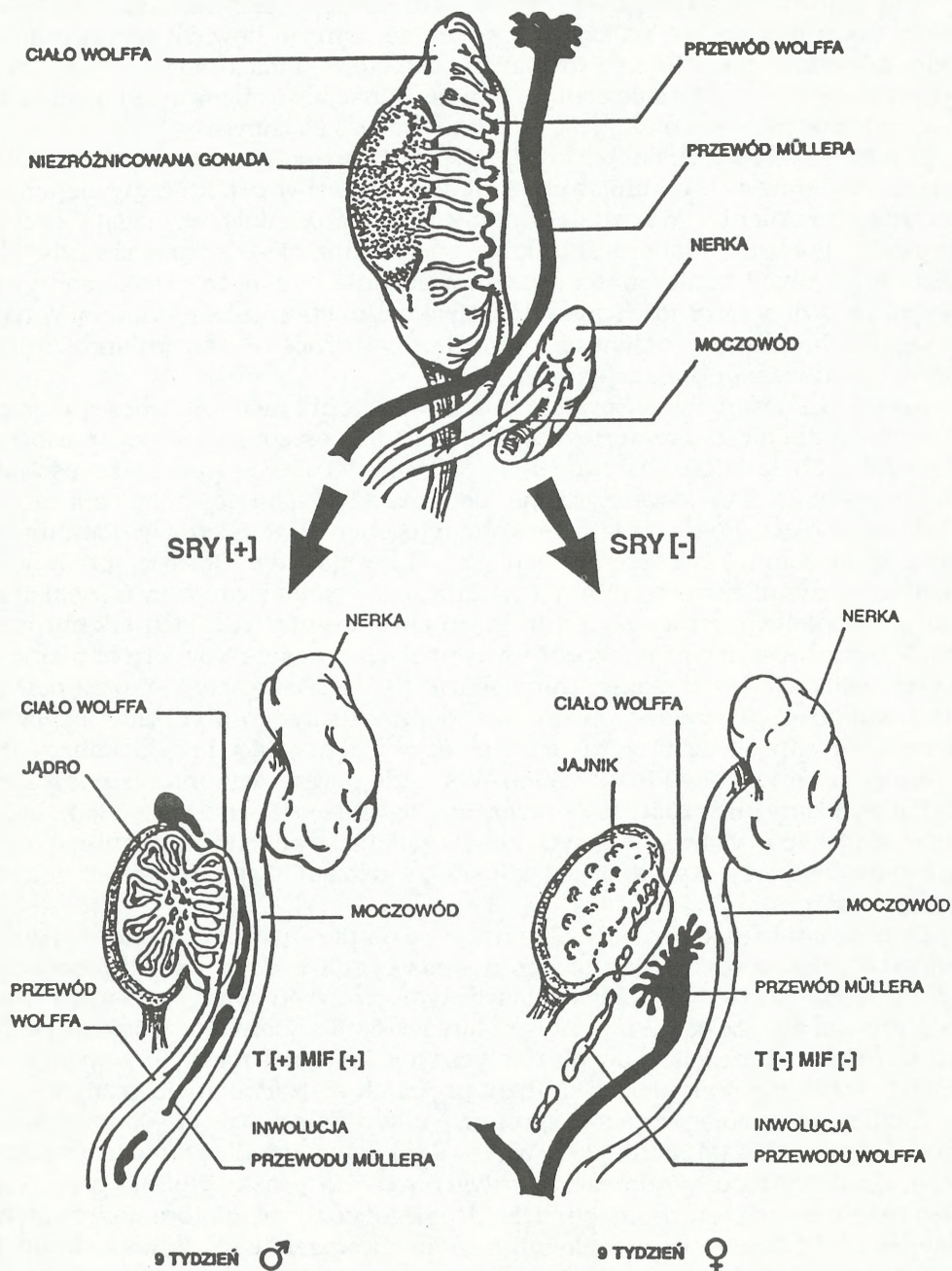
wego, o tyle rozwój wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych zależy przede wszystkim od płci hormonalnej.

Zawiazki narządów płciowych we wczesnym okresie rozwoju płodu są obojętne niezależnie od płci chromosomowej. Zarówno u płodu płci żeńskiej (XX), jak i męskiej (XY) rozwijają się kanały Müllera, stanowiące zawiazki wewnętrznych narządów płciowych żeńskich oraz ciała i przewody Wolffa, będące zawiazkami wewnętrznych narządów płciowych męskich. Istnienie zawiazków narządów płciowych obu płci wydaje się logiczną konsekwencją potencjalnych możliwości różnicowania się pierwotnej gonady zarówno w kierunku jądra, jak i jajnika. Typ gonady decyduje już bezpośrednio o kierunku rozwoju narządów płciowych. Płodowe jądro rozpoczyna wydzielanie dwóch czynników: testosteronu wytwarzanego w komórkach śródmiąższowych (Leydiga) oraz czynnika wytwarzanego w komórkach Sertoliego, hamującego rozwój kanałów Müllera (MIF — Müllerian inhibiting factor). Locus genowy czynnika MIF został zmapowany i znajduje się w regionie 19p13.2 → p13.3 chromosomu 19 (COHEN-HAGUENAUER i współaut. 1987). Określono poziomy czynnika MIF charakterystyczne dla płodów płci męskiej (40.5 ± 3.9 ng/ml w 19–30 tygodniu ciąży, 28.4 ± 6.1 ng/ml od 30 tygodnia – do terminu porodu). Najwcześniej produkty transkrypcji genu MIF zidentyfikowano w tkance płodowego jądra w 8 tygodniu ciąży. Sugeruje się wykorzystanie markera, jakim jest określanie stężenia czynnika MIF w diagnostyce zaburzeń cielesno-płciowych (JOSSE i współaut. 1993). W ten sposób wyniki genialnych w swej prostocie doświadczeń Josta (GRUMBACH i VAN WYKE 1974) znalazły wyjaśnienie na poziomie molekularnym, jak również znajdują, co jest równie ważne, zastosowanie w medycynie praktycznej (ryc. 6).

Testosteron indukuje rozwój ciała i przewodów Wolffa w najądrza, nasieniodoty, pęcherzyki nasienne i gruczoł krokowy, natomiast MIF powoduje zanik kanałów Müllera. Przy różnicowaniu się jajników, a tym samym przy braku czynników wytwarzanych przez jądro, samoistnie następuje rozwój wewnętrznych narządów płciowych żeńskich (jajowodów, macicy i górnej części pochwy).

W przypadku prawidłowo przebiegającego rozwoju płodu w momencie porodu nie ma żadnej innej dostatecznie przekonującej cechy, która pozwalałaby na ustalenie płci fenotypowej dziecka, poza wyglądem jego zewnętrznych narządów płciowych. Określenie płci fenotypowej jest podstawą ustalenia płci metrykalnej. Płeć fenotypowa i metrykalna decyduje o postępowaniu rodziców i najbliższego otoczenia dziecka, mającym na celu wytworzenie u niego poczucia przynależności do określonej płci. Poczucie przynależności płciowej powstaje ostatecznie na przełomie 2 i 3 roku życia dziecka. O tym jak trudna staje się rola lekarza jako doradcy chorego z zaburzeniami rozwoju cielesno-płciowego łatwo można się przekonać, gdy proces diagnostyki, nieświadomość lub opieszałość rodziny chorego zmuszają do podejmowania istotnych decyzji po przekroczeniu tego krytycznego wieku. Podejmowanie jakichkolwiek decyzji, które mają radykalnie zmienić sytuację pacjenta powinno być bardzo rozważne. Nie należy nigdy żałować czasu poświęconego na konsylium lekarskie z udziałem także doświadczonych psychologów. O tym, że rola tych ostatnich nie jest łatwa świadczy ubóstwo technik psychologicznych (BILIKIEWICZ i IMIELŃSKI 1978, SANOCKI 1980, SIEK 1983), które by umożliwiły jednoznaczną ocenę osobowości pacjenta nie tylko w chwili badania, ale i prognostyczną uwzględniającą dalszy, odbiegający

siłą rzeczy od prawidłowego, rozwój psychospołeczny pacjenta. Za pionierską w tym zakresie należy uznać publikację (KUCZYŃSKA 1992) stwarzającą szansę



Ryc. 6. Rozwój układu moczowo-płciowego we wczesnym okresie embrionalnym. SRY (sex determining region on the Y; patrz niżej), T — testosteron, MIF — müllerian inhibiting factor. Rycinę opracowano, modyfikując ryc. 1 z publikacji: MÜLLER U. 1990.

na uzyskanie narzędzia umożliwiającego rozpoznanie płci psychologicznej w warunkach pracy z indywidualnym chorym.

Rolę warunków socjospołecznych w kształtowaniu przynależności płciowej należy doceniać, ale nie należy jej przeceniać, istnieje bowiem wystarczająco wiele dowodów na istnienie różnic na poziomie molekularnym, komórkowym i narządowym, które powodują, że determinacja, różnicowanie i ostateczne wykształcenie płci osobniczej jest procesem bardzo złożonym.

O naszej płci metrykalnej decydują pielęgniarzka-położna, lekarz neonatolog oraz ci przedstawiciele administracji szpitalnej i państwowej, którzy wydają nam pierwsze dokumenty. Wszystkie zmiany płci metrykalnej wymagają decyzji sądowych. Poradnie i laboratoria, które specjalizują się w rozpoznawaniu płci często stają przed koniecznością przeprowadzania badań na prośbę sądu lub pacjentów, którzy na drodze sądowej zamierzają zmienić płeć metrykalną. W tych przypadkach radzimy zachować szczególną ostrożność i skrupulatność przy sprawdzeniu tożsamości pacjenta.

Rola chromosomów płciowych X i Y w determinacji pierwotnej gonady i w konsekwencji w dalszym różnicowaniu płci jest przedmiotem zainteresowań od blisko 35 lat (KALUŻEWSKI 1984). Od roku 1959 wiadomo, że osobnik z kariotypem 47,XXY jest mężczyzną, podczas gdy osoba posiadająca kariotyp 45,X jest kobietą. Pierwsze lata rozwoju cytogenetyki potwierdziły dominującą rolę chromosomu Y w determinacji pierwotnej gonady. Bardziej precyzyjna lokalizacja czynników determinujących „męskość” stała się możliwa dzięki analizie przypadków aberracji strukturalnych chromosomu Y, takich jak chromosom Y dwucentromeryczny, izochromosom Y, chromosom Y w formie pierścienia, translokacje Y-autosomy, translokacje X-Y, translokacje Y-Y oraz delecje chromosomu Y. Powyższe obserwacje doprowadziły do wyrażenia poglądu, że czynnik odpowiedzialny za determinację płci męskiej jest zlokalizowany w ramieniu Yp (JACOBS i ROSS 1966). W świetle powyższego interesującym był pogląd wyrażony już w roku 1971 przez Boczkowskiego (KALUŻEWSKI 1984), który sugerował obecność dwóch różnych genów zlokalizowanych w ramieniu Yp oraz jednego w ramieniu Xp odpowiedzialnych za determinację pierwotnej gonady w kierunku męskim.

Lata osiemdziesiąte zostały zdominowane naukową dyskusją nad rolą antygeny H-Y jako kandydata do pierwszoplanowej roli w determinacji pierwotnej gonady. Antygen H-Y (w pojęciu klasycznym) jest wykrywany w testach cytotoxyczności po uczuleniu na antygen limfocytów T osobników żeńskich. Antygen ten ma być częścią błon plazmatycznych komórek męskich z wyjątkiem diploidalnych komórek płciowych (t.zn. przed ich podziałem mejotycznym).

Analiza immunologiczna szeregu przypadków delecji Xp-; Xq- oraz translokacji X-Y pozwoliła (MÜLLER 1985, WOLF 1985) na zidentyfikowanie locus genowego, genu regulatora (supresora) antygeny H-Y w prążku Xp22.3 oraz genu strukturalnego na autosomach. Dla drugiego genu regulatora (aktywatora) antygeny H-Y zaproponowano lokalizację na chromosomie Y. W konsekwencji, podwójna „dawka genu” regulatora sprzężonego z chromosomem X, przy kariotypie 46,XX miała zapobiegać produkcji antygeny H-Y, natomiast w przypadkach monosomii 45,X przy obecności pojedynczej „dawki genu” obserwuje się niskie poziomy antygeny H-Y. Kariotypom 47,XXY; 48,XXXY oraz 49,XXXXY towarzy-

szyły dzięki obecności chromosomu Y poziomy antygeny H-Y umożliwiające indukcję jądra. Ostatnia obserwacja pozwalała na wysunięcie hipotetycznego poglądu, że gen regulator (supresor) antygeny H-Y sprzężony z chromosomem X unika inaktywacji.

W różnicowaniu się jądra znaczną rolę odgrywa antygen H-Y rozpuszczalny w surowicy. Niektórzy antygen ten nazywają wykrywany serologicznie czynnikiem warunkującym rozwój męski (serologically determined male antigen — SDM antigen). Jest to tendencja słuszna, gdyż zamienne stosowanie pojęcia antygeny H-Y w odniesieniu do obu wyżej wymienionych czynników (klasycznego H-Y i SDM) wprowadza wiele zamętu (DAIGER i CHAKRABORTY 1985).

Antygen SDM jest już też jedynie hasłem wywoławczym. Dostarczono bowiem dowodów, że wynik działania SDM zależy także od obecności swoistego dla antygeny receptora, znajdującego się w komórkach różnicującej się gonady. Zarówno SDM, jak i jego receptor stanowią produkt genów autosomalnych, a zatem w myśl tej hipotezy ich wytwarzanie może być niezależne od płci chromosomowej. Na modelach doświadczalnych lub w badaniach tkanek z kariotypami mozaikowymi XX/XY wykazano, że 20% komórek z chromosomem Y wystarcza do zainicjowania różnicowania się jądra. Liczba komórek z chromosomem Y w granicach 10%–20% prowadzi do wytworzenia się struktur ovotestis. Reasumując, w odniesieniu do antygeny SDM powinno się używać raczej pojęcia układu lub systemu jego funkcjonowania, angażującego przynajmniej cztery geny pośrednio lub bezpośrednio wpływające na ekspresję SDM: gen strukturalny antygeny jako takiego, gen strukturalny dla swoistego receptora, gen hamujący działanie antygeny SDM zlokalizowany w obrębie chromosomu X i gen aktywujący antygen SDM sprzężony z chromosomem Y.

Nawet najdokładniejsze analizy relacji fenotypowo-chromosomowych wykorzystujących efekty dyskusji nad rolą antygeny H-Y (antygeny SDM) jako kandydata na głównego determinanta płci TDF (testis determining factor) nie wytrzymały próby czasu, bowiem nie tłumaczyły etiologii dwóch grup przypadków z odwróceniem płci: mężczyźni — 46,XX (M-XX) i kobiety — 46,XY (K-XY).

W pierwszym przypadku chorzy mężczyźni cierpieli na atrofie jąder, której towarzyszyły: hyperplazja komórek Leydiga, zeszkliwienie błon podstawnych kanalików krętych, wybitnie upośledzona spermatogeneza, niepłodność i ginekomastia. W badaniach dodatkowych obserwowano obniżony poziom testosteronu i prawidłowy bądź podwyższony poziom gonadotropin.

Drugą grupę chorych, fenotypowych kobiet (K-XY), charakteryzuje bezpłodność spowodowana brakiem prawidłowo rozwiniętych jajników, występujących w postaci łącznotkankowych pasm (w których istnieje 20%–30% ryzyka transformacji nowotworowej). W efekcie dysgenезji gonad u chorych obserwuje się także niski poziom estrogenów, wysoki poziom gonadotropin, pierwotny brak miesiączki, infantylne niekiedy wewnętrzne i zewnętrzne narządy płciowe, niedorozwój piersi. Pacjentki te mają najczęściej prawidłowy wzrost.

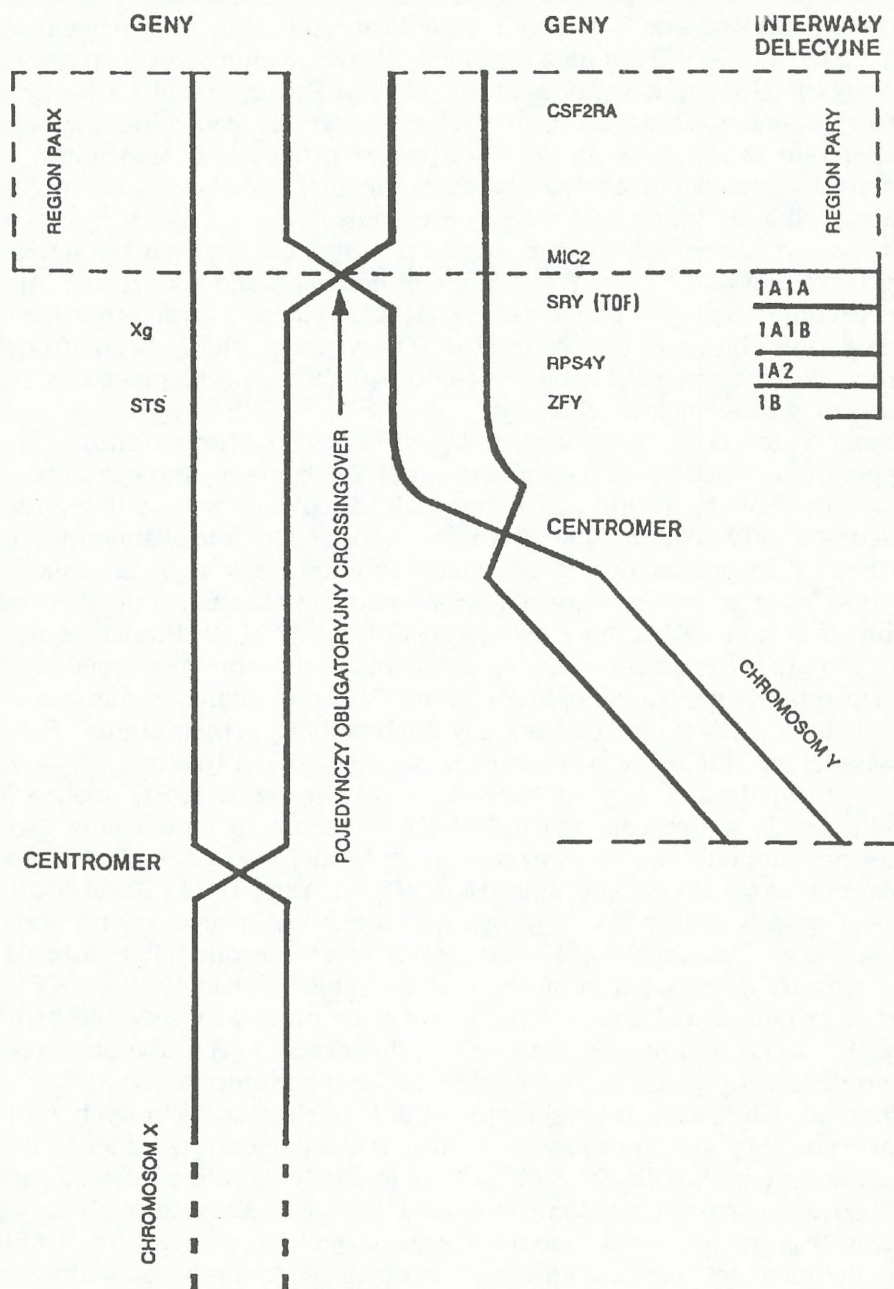
Wraz z coraz liczniejszymi informacjami na temat molekularnych homologii pomiędzy chromosomami X i Y przypomniano obserwacje sprzed niemal 50 lat dotyczące zjawiska crossing-over pomiędzy obu chromosomami (BURGOYNE 1982). Wyniki badań molekularnych, wsparte obserwacjami w mikroskopie elektronowym, doprowadziły do wyodrębnienia w chromosomach X i Y regionu PAR

(pseudo autosomal region). Region PAR (PARY w przypadku chromosomu Y), znajdujący się w terminalnym regionie Yp, ma wielkość $2,5 \times 10^6$ bp (MÜLLER 1990). Region PAR (PARX w przypadku chromosomu X) chromosomu X unika inaktywacji, co dobrze ilustruje potwierdzony fakt unikania X — inaktywacji przez dwa geny genomu kobiety, zlokalizowane w tym subregionie (antygen Xg oraz gen STS — steroid sulfatase deficiency). Jakkolwiek oba chromosomy X mężczyzn-XX (M-XX) są morfologicznie nierozróżnialne, to jednak przy dokładniejszej analizie (MAGENIS i współaut. 1982) lub po zastosowaniu specjalnych technik (DĘBIEC -RYCHTER i współaut. 1982) dokonano obserwacji sugerujących niewzajemną (unequal) X-Y rekombinację podczas ojcowskiej mejozy, co w rezultacie przyniosło insercję materiału genetycznego chromosomu Y, zawierającego TDF (testis determining factor) do zygoty 46,XX. W rzeczywistości badania molekularne potwierdziły, że część przypadków M-XX jest TDF(+).

Analiza map delecyjnych (patrz niżej) przypadków M-XX oraz K-XY umożliwiła lokalizację genu/genów kandydata odpowiadającego kryterium TDF w distalnym regionie Yp poniżej regionu PARY (PAGE i współaut. 1987). W kolejnym etapie badań dokonano izolacji i sekwencjonowania fragmentu DNA o wielkości 140 kb, kodującego specyficzne białko, którego 13 domen, bogatych w cysteinę i histydynę jest związanych z jonami cynku. Opisaną sekwencję określono mianem czynnika ZFY („zinc-finger Y protein”). Czynniki ZFY koduje białko o budowie „palca cynkowego”, czyli białko regulatorowe, aktywujące transkrypcję. Gen ZFY jest pod względem struktury molekularnej podobny do czynnika ZFX, którego locus znajduje się w obrębie ramion Xp (Xp22.3). Sekwencja nukleotydowa obu genów została opublikowana przez SCHNEIDER-GÄDICKE i współaut. w roku 1989. W chwili obecnej wydaje się jednak pewnym, że czynnika ZFY nie można utożsamiać z czynnikiem TDF, naukowa weryfikacja poglądu na temat wyłączności roli czynnika ZFY nastąpiła po opublikowaniu wyników badań molekularnych (PALMER i współaut. 1989, JÄGER i współaut. 1990). Autorzy przebadali łącznie 22 przypadki z odwróconą płcią (sex reverse). W tej grupie w 5 przypadkach przy nieobecności sekwencji ZFY(-), wykryto obecność sekwencji specyficznej dla chromosomu Y, zlokalizowanej w bezpośredniej bliskości regionu PARY(+).

Przeprowadzenie analizy restrykcyjnej DNA z użyciem blisko 140 specyficznych dla chromosomu Y sond molekularnych u ponad 100 pacjentów i pacjentek, rekrutujących się z dwóch wyżej wymienionych grup chorych oraz przypadków z różnego typu aberracjami struktury chromosomu Y, w tym translokacjami Y/autosomy umożliwiło skonstruowanie tak zwanej delecyjnej mapy chromosomu Y, na której wyodrębniono 7 interwałów (VERGNAUD i współaut. 1986). Obecność lub nieobecność „sygnałów hybrydizacyjnych” upoważniała autorów tych prac do coraz dokładniejszej identyfikacji molekularnej struktury chromosomu Y (ryc. 7).

Dokładniejszą mapę chromosomu Y, a ściślej 98% euchromatyny chromosomu Y, opracowano używając 196 rekombinacyjnych klonów DNA (FOOTE i współaut. 1992) wykorzystując tak zwany STS (sequence tagged sites). STS jest to krótki odcinek genomowego DNA, który może być rozpoznany metodą PCR i zmapowany w określonym punkcie genomu, gdzie dany STS może służyć jako punkt odniesienia (znak; ang. landmark). STS'y i odpowiednio wyselekcjonowa-



Ryc. 7. Schemat przedstawia X-Y obligatoryjny crossing-over oraz lokalizację niektórych genów ramienia Yp i Xp w obrębie regionu PARY i PARX oraz w najbliższym sąsiedztwie (rycinę opracowano na podstawie publikacji: BURGONNE 1982 oraz FOOTE i współaut. 1992).

ne sekwencje DNA metodą PCR mogą być dalej analizowane przy użyciu komputerowej bazy danych. Technika ta pozwoliła usystematyzować i uporządkować informacje pochodzące z różnych ośrodków. Aktualna mapa obejmuje 160 pozycji STS (sY1 — sY160) ułożonych w 7 klasycznych interwałach delecyjnych (patrz wyżej). Uporządkowanie sekwencji STS w chromosomie Y stworzyło nową strategię konstruowania zestawu zachodzących na siebie klonów sekwencji chromosomu w tak zwanych YAC'ach (yeast artificial chromosomes), to jest sztucznych chromosomach drożdży. Odniesienie STS'ów do klonów YAC pozwoliło uporządkować klony YAC w 28 interwałach.

Powyższy postęp technologiczny nie pozostał bez wpływu na generowanie nowych wątpliwości, czy ZFY jest TDFem. Potwierdzono jeszcze raz niejednorodność etiologiczną przypadków M-XX i K-XY, zwłaszcza występujących rodzinie. Podobnie, badania nad ekspresją TDF w przypadkach hermafrodytyzmu sugerowały udział mutacji bądź delecji autosomalnych lub sprzężonych z chromosomem X w etiologii tej choroby.

Wkrótce też opisano jeszcze mniejszy fragment chromosomu Y niż ZFY. Fragment ten o wielkości 35 kb, nazwano SRY (sex determining region of the Y; SINCLAIR i współaut. 1990). Sekwencję tę lokalizuje się w bezpośrednim sąsiedztwie regionu PARY (ryc. 7) w interwale 1A1A terminalnie w stosunku do genu *RPS4Y* i *ZFY*. Region ten odpowiada wielu kryteriom stawianym czynnikowi TDF: jest to sekwencja konserwatywna wykrywana w chromosomie Y wszystkich badanych ssaków. Ekspresję tego genu obserwuje się w tkance somatycznej zrębu gonady w czasie determinacji jąder u myszy (KOOPMAN i współaut. 1990). Otwarta ramka odczytu genu *SRY* (*SRY-ORF*) koduje białko zawierające motyw odpowiadający „HMG box” białek klasy „high mobility grup proteins”. Sekwencje odpowiadające HMG, jak wykazano w szeregu badań (WRIGHT i DIXON 1988, JANTZEN i współaut. 1990, VAN DE WETERING i współaut. 1991), mają zdolność pośredniczenia w procesie wiązania DNA. Mechanizm regulacyjny genu *SRY* polega prawdopodobnie na wiązaniu specyficznej sekwencji „HMG box” tego białka ze strukturą podwójnej spirali DNA (KING i WEISS 1993). Obecność domeny wiążącej DNA w białku *SRY* byłaby zgodna z funkcją regulacyjną przypisaną temu genowi. Dowodów potwierdzających rolę determinacji tworzenia jąder przez gen *SRY* dostarczyły ponadto badania kobiet z kariotypem 46,XY z czystą dysgenezją gonad, u których wykryto *de novo* mutacje w odrębie genu *SRY*. Wszystkie wykryte mutacje, poza jedyną dotyczącą delecji 5 w otwartej ramce odczytu *SRY*, są położone w obrębie regionu kodującego „HMG box” (BERTA i współaut. 1990, JÄGER i współaut. 1990). Większość wykrytych mutacji to mutacje powstałe *de novo*, nie wykrywane u ojców pacjentek z kariotypem 46,XY. Wielu badaczy podkreśla, że *SRY* może pełnić jedynie rolę swoistego „przełącznika”, gdyż jądra mogą rozwinać się także u kobiet 46,XX, u których nie wykryto żadnych fragmentów chromosomu Y (LOVELL-BADGE i ROBERTSON. 1990). Prawdopodobnie dzieje się tak dlatego, że mutacji uległy inne fragmenty genomu. Natomiast gen *SRY* determinujący (rozpoczynający) tę przemianę — jest obecny jedynie w chromosomie Y. Uznanie genu *SRY* za TDF jest jednocześnie końcem jednego i początkiem nowego etapu poszukiwań. Szczególnie interesujące dla tych poszukiwań są przypadki kobiet 46,XY, u których nie wykryto mutacji

w genie SRY. Dlaczego nie powstały u nich jądra? Czy istnieją mutacje innych genów, poprzedzające działanie genu SRY?

W 30 przypadkach prawdziwego hermafrodytyzmu 46,XX jedynie trzy okazały się być SRY(+), a dla 27 przypadków nadal postulowanym mechanizmem etiopatogenetycznym pozostaje autosomalna lub sprzężona z chromosomem X mutacja (MCELREAVEY i współaut. 1992). W 35 przypadkach M-XX, wśród których nie obserwowano obojnaczych zewnętrznych narządów płciowych, obecność SRY(+) stwierdzono w 32 przypadkach, trzy przypadki były SRY(-), natomiast wśród 38 chorych z obojnaczymi narządami płciowymi tylko 2 przypadki były SRY(+) (MCELREAVEY i współaut. 1993), pozostałych zaś 36 przypadków było SRY(-). Jak już wspomniano u większości pacjentek z dysgenezją gonad, obarczonych kariotypem 46,XY, nie wykryto delecji bądź mutacji w obrębie genu SRY a pomimo to nie doszło u tych chorych do determinacji pierwotnej gonady w kierunku męskim.

Nowe światło na mechanizm patogenetyczny w tym przypadku rzuca opis rodzeństwa, któremu matka, nosicielka duplikacji Xp21.2p22.11, przekazała nieprawidłowy chromosom X, ojcowie z pierwszego i drugiego małżeństwa przekazali prawidłowy chromosom Y i, jak się okazało, prawidłowy gen SRY i pomimo to nie doszło do determinacji pierwotnej gonady w kierunku męskim. Powyższa obserwacja potwierdza rolę SRVX („sex reversal locus” sprzężony z chromosomem X) jako jednego z mechanizmów zaburzających prawidłową determinację płci (ARN i współaut. 1994).

Opisano autosomalny „sex reversal locus”, SRA1 w trzech nie spokrewnionych przypadkach dysplazji kampieleicznej, w których rozpoznano zrównoważoną traslokację obejmującą region 17q24q25 (TOMMERUP i współaut. 1993). Wskazano istnienie genu „sex reversing” w ramieniu 9p (BENNETT i współaut. 1993). Opisano wreszcie chorą 46,XY z dysgenezją gonad, u której stwierdzono mikrodelecję sekwencji DNA chromosomu Y przy obecności prawidłowego genu SRY (MCELREAVEY i współaut. 1992), co może wskazywać na obecność w obrębie chromosomu Y innych genów włączonych w kaskadę wydarzeń prowadzących do prawidłowej determinacji gonady w kierunku męskim (BOCZKOWSKI 1971). Identyfikacja innych genów, odpowiedzialnych za determinację płci, może okazać się bardzo trudna i żmudna. Dziś lepiej niż kiedykolwiek zdajemy sobie sprawę z faktu, jak skomplikowanym systemem jest embriogeneza gonad, która kreuje tak wiele w tak krótkim okresie.

Spektakularny wyścig o pierszeństwo w opisanii genu determinującego rozwój pierwotnej gonady pozwolił nam lepiej zrozumieć mechanizm determinacji płci, ale jednocześnie uświadomił, jak wiele jest do zrobienia, aby umieć w każdym przypadku chorobowym odpowiedzieć na pytanie, który z elementów złożonego procesu determinacji i różnicowania uległ zaburzeniu. Niemniej jednak, już dzisiaj szereg osiągnięć można aplikować do praktyki poradnianej.

Możliwość sporządzania map delecyjnych chromosomu Y (nie w celach poznawczych, ale diagnostycznych) przy użyciu kilkudziesięciu sond molekularnych (tab. 1), pozwala znakomicie uprecyzynić rozpoznania cytogenetyczne, umożliwiając lokalizację punktów złamań tego bardzo małego chromosomu z niespotykaną dotąd dokładnością. Ma to znaczenie rokownicze w tych przy-

Tabela 1

Lista 32 specyficznych dla chromosomu Y sond molekularnych zgromadzonych w Zakładzie Genetyki Medycznej A. M. w Łodzi, umożliwiających sporządzanie map delecyjnych chromosomu Y dla celów poradnictwa genetycznego. Wielkość insertu jest podana w tysiącach par zasad (kb)

L.p.	Sonda	Locus	Lokalizacja	Wektor	Insert
1.	pDP230	DXYS20	Yp11.3	pUC13	2.2
2.	Y-286(Yp)	DYS184p	Yp11.3	pBR322	1.7
3.	pHU14 (#)	SRY	Yp11.3	pUC18	12.7
4.	pZFY	ZFY	Yp11.3	pUC18	1.3
5.	Y-280	DYS186	Yp11.3-11.2	pBR322	2.2
6.	Y-227	DYS185	Yp11.3-11.2	pBR322	2.8
7.	Y-156	DYZ2	Yp11.2	pUC18	4.4
8.	Y-190	DYZ5	Yp11.2	pBR322	3.5
9.	47z	DXYS5Y	Yp11	pBR327	2.3
10.	pDP34	DXYS1Y	Yp11	pDP322	2.2
11.	Y-431		Yp	pBR322	3.5
12.	Y-182		Yp	pBR322	1.85
13.	Y-219		Yp	pBR322	5.1
14.	Y-223a		Yp	pBR322	0.75
15.	118e (@)	DYS8	Yp		
16.	52d (@)	DYF27	Yp	pBR322	1.1
17.	Y-97	DYZ3	Ycen	pBR322	6.7
18.	50f2	DYS7	Yq11	pBR327	1.7
19.	49f	DYS1	Yq11	pBR322	2.8
20.	M1A	DXS31Y	Yq11	pBR322	2.1
21.	Y-253	DYS106	Yq11.21-11.22	pBR322	3.6
22.	Y-198	DYS168	Yq11.21-11.22	pBR322	1.2
23.	Y-157a	DYS112	Yq11.21-11.22	pBR322	3.7
24.	Y-221	DYS109	Yq11.21-11.22	pBR322	2.4
25.	Y-294	DYS110	Yq11.21-11.22	pBR322	2.1
26.	Y-202	DYS107	Yq11.23	pBR322	1.5
27.	Y-216a	DYS108	Yq11.23	pBR322	2.4
28.	Y-460	DYS154	Yq11.23	pUC18	1.2
29.	Y-214	DYS111	Yq11.23	pBR322	2.3
30.	Y-286	DYS184q	Yq11.23	pBR322	1.7
31.	Y-402	DYS155	Yq11.23	pUC18	3.5
32.	Y-418	DYS156	Yq11.23	pUC18	2.5

- w polach zacienionych wymieniono próby zakupione w ATCC

- symbolem (@) oznaczono próby udostępnione przez J. Weissenbacha, Instytut Pasteura, Paryż, Francja

- symbolem (#) oznaczono próbę udostępnioną przez P. N. Goodfellow, Uniwersytet Cambridge, Anglia

- pozostałe próby zostały udostępnione przez U. Müllera, Instytut Genetyki Człowieka, Uniwersytet w Giessen, Niemcy

padkach, gdzie punkt złamania jest zlokalizowany w/lub powyżej regionu ILA (lateral asymmetry) (KAŁUŻEWSKI 1984, 1985).

Molekularna analiza DNA umożliwia identyfikację markerów chromosomowych i łatwą identyfikację markerów pochodzących z chromosomów X i Y, których obecność może towarzyszyć lub wręcz wywoływać zaburzenia cielesno płciowe, ale nie pociąga za sobą innych ciężkich nieprawidłowości fenotypowych. Ma to duże znaczenie w prognostyce diagnostyki prenatalnej. Wdrożenie testu na obecność w genomie genu *SRY* oraz sekwencji centromerowych chromosomu Y (WITT i współaut. 1993, KOCOVA i współaut. 1993, 1994) umożliwia wyselekcjonowanie grupy przypadków zwiększonego ryzyka transformacji nowotworowej dysgenetycznej gonady i jest wskazaniem do profilaktycznego usunięcia nieprawidłowych gonad. Zabieg ten zresztą może być przeprowadzony na drodze laparoskopii operacyjnej.

Trzeba przyznać, że, podobnie jak w innych dziedzinach nauki, w diagnostyce i terapii zaburzeń cielesno płciowych istnieje dramatyczna różnica pomiędzy spektakularnymi osiągnięciami w naukach podstawowych, w tym przypadku biologii molekularnej, i aplikacją tych osiągnięć w medycynie praktycznej. W Zakładzie i Poradni Genetyki Medycznej w Łodzi w okresie 25 lat zdiagnozowano 874 przypadków aberracji liczbowych i strukturalnych chromosomów, z czego 354 są to przypadki aberracji liczbowych i strukturalnych chromosomów płciowych, co stanowi około 40% liczby ogólnej. U 354 chorych postawiono diagnozę, wdrożono leczenie, niekiedy leczenie operacyjne. U wielu chorych uzyskano zadowalające wyniki, optymalizując ich adaptację do środowiska. Pozostaje jednak uczucie niedosytu, bowiem tak rzadko możemy powiedzieć, że wyleczyliśmy chorego z zaburzeniem cielesno-płciowym w sensie „*restitutio ad integrum*”, tak niewiele mamy również do zaproponowania naszym pacjentom, jeśli chodzi o profilaktykę choroby.

Fakt pojawienia się unikalnych sekwencji satelitarnego DNA chromosomu Y był prawdopodobnie pierwszym krokiem na ewolucyjnej drodze uzyskania morfologicznej tożsamości tego chromosomu (BRUTLAG 1980, KUNKEL i współaut. 1977). Na drodze ewolucji od prymitywnych kręgowców, u których nie obserwujemy dimorfizmu chromosomów płciowych, do człowieka chromosom Y w odróżnieniu od chromosomu X został niemal zupełnie pozbawiony loci genowych, z wyjątkiem determinujących płeć, kontrolujących rozwój gonad, pośrednio kontrolujących rozwój układu moczowo-płciowego oraz 6 innych dotychczas opisanych genów (McKUSICK 1992). Podczas tego procesu, nazywanego „erozją chromosomu Y” (DARLINGTON 1958) lub „degeneracją chromosomu Y” (MONSALVE i współaut. 1980) rozmiary tego chromosomu zostały zredukowane do 1/3 chromosomu X. Wielu autorów przyjmuje, że translokacja była mechanizmem napędowym ewolucji niezróżnicowanych chromosomów płciowych niższych kręgowców do chromosomów dimorficznych ssaków wyższych i człowieka. Po szeregu rearanżacjach cytogenetycznych, chromosom X stał się „chimerą” subregionów, odpowiedzialnych za cechy somatyczne oraz funkcję gonad, wykazujących homologię z chromosomem Y, co znalazło szereg potwierdzeń, również z zakresu badań molekularnych. Wydaje się więc prawdopodobne, że w procesie ewolucji chromosom Y „podzielił” się odpowiedzialnością za determinację

i różnicowanie pierwotnej gonady z chromosomem X i prawdopodobnie autosomami.

Przy całym entuzjastycznym podziwie dla postępu technologicznego, który towarzyszył opisaniu genu *SRY*, należy z szacunkiem odnieść się do postulowanego od szeregu lat przez MITTWOCH (1992, 1993) poglądu o wieloczynnikowym z progową dichotomią systemie determinacji płci. Autorka od lat sceptycznie odnosi się do prób wyjaśnienia mechanizmu determinacji pierwotnej gonady z udziałem jednego genu. Przeciwno takiemu mechanizmowi przemawia szereg starannie dokonanych obserwacji naukowych (MITTWOCH 1992). Stąd odpowiadając na zadane w tytule pytanie, o rolę chromosomów płciowych w determinacji płci należy odpowiedzieć twierdząco: prawidłowy rozwój mężczyzny jest związany z prawidłowym kariotypem 46,XY a kobiety — 46,XX.

Powierzenie przez proces ewolucji tak ważnego genu, jak gen *SRY* chromosomowi, który szczególnie często jest narażony na nierozdzielność (non-disjunctio) mitotyczną i mejotyczną, który często ulega aberracjom strukturalnym, niebezpiecznym gdy punkt złamania jest zlokalizowany w/lub powyżej I regionu LA (KALUŻEWSKI i współaut. 1978, LIMON i współaut. 1979, KALUŻEWSKI 1984, 1985) każe wątpić, czy jest to rozwiązanie optymalne. Tylko spekulacja byłby pogląd, że „erozja” chromosomu Y będzie trwała nadal i zmieni ona mechanizm determinacji płci gatunku *Homo sapiens* w perspektywie 20–40 milionów lat.

Autor dziękuje Doktor A. Jeziorowskiej i Doktorowi L. Jakubowskiemu za kreatywną dyskusję tez artykułu oraz Doktorowi L. Dudarewiczowi za pomoc w przygotowaniu manuskryptu.

DO WE NEED SEX CHROMOSOMES?

Summary

The author presents problems encountered by a practising physician when diagnosing the sex of patients with disturbances of sexual differentiation. Evolution of the present knowledge of the role of the Y chromosome, H-Y antigen, factor SDM, ZFY and ZFX sequences and *SRY* gene in the process of a determination of the primary gonad is described. The author emphasizes limitations of our capabilities in prophylaxis and therapy of disturbances of sexual differentiation.

LITERATURA

- ARN P., CHEN H., TUCK-MULLER C., MANKINEN C., WACHTEL G., LI S., SHEN C.-C., WACHTEL S. S., 1994. *SRVX, a sex reversing locus in Xp21.2-p22.11*. Hum. Genet., 93, 389–393.
- BENNETT C. P., DOCHERTY Z., ROBB S. A., RAMANI P., HAWKINS J. R., GRANT D., 1993. Deletion 9p and sex reversal. J. Med. Genet., 30, 518–520.
- BERTA P., HAWKINS J. R., SINCLAIR A. H., TAYLOR A., GRIFFITHS B. L., GOODFELLOW P. N., FELLOUS M., 1990. *Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor*. Nature, 348, 448–450.
- BILIKIEWICZ T., IMIELŃSKI K., 1978. *Seksuologia kliniczna*, PZWL, Warszawa, 89–100.
- BOCZKOWSKI K., 1971. *Sex determination and gonadal differentiation in man*. Clin. Genet., 2, 379–386.
- BRUTLAG D. L., 1980. *Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA*. Ann. Rev. Genet., 14, 121–144.
- BURGOYNE P., 1982. *Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals*. Hum. Genet., 61, 85–90.

- COHEN-HAGUENAUER O., PICARD J. Y., MATTEI M. G., SERERO S., NGUYEN V. C., TAND DE M. F., GUERRIER D., HORS-CAYLA M. C., JOSSO N., FREZAL J., 1987. *Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19*. Cytogenet. Cell. Genet., 44, 2-6.
- DAIGER S. P., CHAKRABORTY R., 1985. *Mapping the human Y chromosome*. W: SANDBERG A. A. (red.). Progress and Topics in Cytogenetics, 6A, Alan R. Liss, Inc., New York, 93-124.
- DARLINGTON C. D., 1958. *The evolution of genetic systems*. Basic Books, New York, 265.
- DEBIEC-RYCHTER M., KALUŻEWSKI B., JAKUBOWSKI L., MORUZGAŁA T., ZARZYCKI J., KULA K., 1982. *Does the heteromorphism of X chromosome in XX males really exist?*. 8th International Chromosome Conference Lübeck, Abstracts, 2-13.
- FOOTE S., VOLLRATH D., HILTON A., PAGE D. C., 1992. *The human Y chromosome: Overlapping DNA clones spanning the euchromatic region*. Science, 258, 60-65.
- GRUMBACH M. M., VAN WYKE J. J., 1974. *Disorders of sex differentiation*. W: WILLIAMS R. H., (red.). Textbook of Endo-crinology. W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto. 423-501.
- HOEKSTRA R. F., 1990. *The evolution of male-female dimorphism: Older than sex?* J. Genet., 69, 11-15.
- HORNBY A. S., 1974. *Oxford Advanced Learner's Dictionary of Current English*. Oxford University Press, Oxford, 782.
- JACOBS P. A., ROSS A., 1966. *Structural abnormalities of the Y chromosome in man*. Nature, 210, 352-354.
- JÄGER R. J., ANVRET M., HALL K., SCHERER G., 1990. *A human XY female with a frame shift mutation in the candidate gene SRY*. Nature, 348, 452-454.
- JANTZEN H-M., ADMON A., BELL S. P., TJIAN R., 1990. *Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins*. Nature, 344, 830-836.
- JOSSO N., LAMARRE I., PICARD J., BERTA P., DAVIES N., MORICHON N., PESCHANSKI M., JENY R., 1993. *Anti-Müllerian hormone in early human development*. Early Hum. Dev., 33, 91.
- KALUŻEWSKI B., JAKUBOWSKI L., 1992. *Interseksualizm i dysgenезja gonad*. W: PAWLIKOWSKI M. (red.), Zarys endokrynologii klinicznej, PZWL, Warszawa, 123-165
- KALUŻEWSKI B., 1984. *Chromosomy płciowe człowieka. Wybór informacji. Część I — Chromosom X*. Postępy Biologii Komórki, 11, 203-238.
- KALUŻEWSKI B., 1984. *Chromosomy płciowe człowieka. Wybór informacji. Część II — Chromosom Y*. Postępy Biologii Komórki, 11, 239-262.
- KALUŻEWSKI B., JOKINEN A., HORTLING H., DE LA CHAPPELLE A., 1978. *A theory explaining the abnormality in 45,X/46,XY mosaicism with non-fluorescent Y chromosome. Presentation of three cases*. Ann. Génét., 21, 5-11.
- KALUŻEWSKI B., 1985. *Replication kinetics of the human Y chromosome*. W: SANDBERG A. A. (red.), Progress and Topics in Cytogenetics, 6A, Alan R. Liss, Inc., New York, 327-356.
- KING C-Y., WEISS M. A., 1993. *The SRY high-mobility-group box recognizes DNA by partial intercalation in the minor groove: A topological mechanism of sequence specificity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 11990-11994.
- KOCOVA M., SIEGEL S. F., WENGER S. L., LEE P. A., TRUCCO M., 1993. *Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA*. Lancet, 342, 140-143.
- KOCOVA M., SIEGEL S. F., NALESNICK M., TRUCCO M., 1994. *Detection of Y-chromosome sequences in gonadal tissue of patients with Turner's syndrome (45,X)*. New Engl. J. Med., 331, 682-683.
- KOOPMAN P., MÜNSTERBERG A., CAPEL B., VIVIAN N., LOVELL-BADGE R., 1990. *Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation*. Nature, 348, 450-452.
- KUCZYŃSKA A., 1992. *Płeć psychologiczna. Podstawy teoretyczne, dane empiryczne oraz narzędzie pomiaru*. Przegl. Psycholog., 237-247.
- KUNKEL L. M., SMITH K. D., BOYER S. H., BORGAONKAR D. S., WACHTEL S. S., MILLER O. J., BREG W. R., JONES H. W., RARY J. M., 1977. *Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1245-1249.
- LIMON J., GIBAS Z., KALUŻEWSKI B., MORUZGAŁA T., 1979. *Demonstration of two different regions of lateral asymmetry in human Y chromosomes*. Hum. Genet., 51, 247-252.
- LOVELL-BADGE R., ROBERTSON E., 1990. *XY females resulting from a heritable mutation in the murine primary testis-determining gene*. Development, 109, 635-646.
- MAGENIS R. E., WEBB M. J., MCKEAN R. S., 1982. *Translocation (X;Y)(p22.3;p11.2) in XX males: etiology of male phenotype*. Hum. Genet., 62, 271-276.
- MCELREAVEY K., RAPPAPORT R., VILAIN E., ABBAS N., RICHARD F., LORTAT-JACOB S., BERGER R., LECONIAT M., BOUCEKKINE C., KUCHERIA K., TEMTAMY S., NIHOUL-FEKETE C., BRAUNER R., FELLOUS M., 1992. A

- minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including SRY. *Hum. Genet.*, 90, 121-125.
- McELREAVEY K., VILAIN E., ABBAS N., HERSKOVITZ I., FELLOUS M., 1993. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3368-3372.
- McKUSICK V. A., 1992. *Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes.* The John Hopkins University Press, Baltimore and London, CXCIV-CXCV.
- MITTWOCH U., 1992. Sex determination and sex reversal: genotype, phenotype, dogma and semantics. *Hum. Genet.*, 89, 467-479.
- MITTWOCH U., 1993. Identical SRY mutations with different phenotypic effects. *Am. J. Hum. Genet.*, 52, 1272-1273.
- MONSALVE M. V., ERDTMANN B., OTTO P. A., FROTA-PESSOA O., 1980. The human Y chromosome: racial variation and evolution. *Rcv. Brazil. Genet.*, 4, 443-446.
- MÜLLER U., 1985. The H-Y antigen: Identification, function, and role in sexuality. W: *Progress and Topics in Cytogenetics*, SANDBERG A. A. (red.), 6A, Alan R. Liss, Inc., New York, 63-80.
- MÜLLER U., 1990. Searching for the testis-determining factor. *Contemporary Ob/Gyn*, April, 1-6.
- PAGE D. C., MOSHER R., SIMPSON E. M., FISHER E. M. C., MARDON G., POLLACK J., MCGILLIVRAY B., DE LA CHAPELLE A., BROWN L. G., 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*, 51, 1091-1104.
- PALMER M. S., SINCLAIR A. H., BERTA P., ELLIS N. A., GOODFELLOW P. N., ABBAS N. E., FELLOUS M., 1989. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature*, 342, 937-939.
- SANOICKI W., 1980. *Kwestionariusze osobowości w psychologii.* PWN, Warszawa. 214-219.
- SCHNEIDER-GÄDICKE A., BEER-ROMERO P., BROWN L. G., NUSSBAUM R., PAGE D. C., 1989. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell*, 57, 1247-1258.
- SIEK S., 1983. *Wybrane metody badania osobowości.* Akademia Teologii Katolickiej, Warszawa. 71.
- SINCLAIR A. H., BERTA P., PALMER M. S., HAWKINS J. R., GRIFFITHS B. L., SMITH M. J., FOSTER J. W., FRISCHAUF A.-M., LOVELL-BADGER R., GOODFELLOW P. N., 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature*, 346, 240-244.
- TOMMERUP N., SCHEMPF W., MEINECKE P., PEDERSEN S., BOLUND L., BRANDT C., GOODPASTURE C., GULDBERG P., HELD K. R., REINWEIN H., SAUGSTAD O. D., SCHERER G., SKJELDAL O., TODER R., WESTVIK J., HAGEN C. D., VAN DER WOLF U., 1993. Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3q25.1. *Nature Genet.*, 4, 170-174.
- VERGNAUD G., PAGE D. C., SIMMLER M. C., BROWN I., ROUYER F., NOEL B., BOTSTEIN D., CHAPELLE DE LA A., WEISSENBACH J., 1986. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am. J. Hum. Genet.*, 38, 109-124.
- VANDE WETERING M., OOSTERWEGEL M., DOOLJES D., CLEVERS H., 1991. Identification and cloning of TCF-1, a lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J.*, 10, 123-132.
- WITT M., MICHALCZAK K., LATOS-BIELEŃSKA A., JARUZELSKA J., KUCZORA I., LOPEZ M., 1993. An improved, non-isotopic method of screening cells from patients with abnormalities of sexual differentiation for Y chromosomal DNA content. *J. Med. Genet.*, 30, 304-307.
- WOLF U., 1985. Genes of the H-Y antigen system and their expression in mammals. W: *Progress and Topics in Cytogenetics*, SANDBERG A. A. (red.), 6A, Alan R. Liss, Inc., New York, 81-92.
- WRIGHT J. M., DIXON G. H., 1988. Induction by torsional stress of an altered DNA conformation 5' upstream of a gene for a high mobility group protein from trout and specific binding to flanking sequences by the gene product HMG. *T. Biochemistry*, 27, 576-581.