

RAFAŁ P. PIPREK

*Zakład Anatomii Porównawczej  
Instytut Zoologii  
Uniwersytet Jagielloński  
Ingardena 6, 30-060 Kraków  
e-mail: rafalpiprek@wp.pl*

## GENETYCZNE MECHANIZMY DETERMINACJI PŁCI I RÓŻNICOWANIA GONAD SSAKÓW

Niezróżnicowana gonada jest wyjątkowym narządem, gdyż może się rozwijać w jednym z dwóch kierunków: jako jajnik lub jako jądro, w zależności od genów, które ulegają ekspresji podczas ich różnicowania się. Okazuje się, że mechanizmy kierujące tym różnicowaniem to swoista walka wielu genów tworzących krzyżujące się ze sobą szlaki molekularne. Geny te można podzielić na dwie grupy: geny „męskie” odpowiedzialne za różnicowanie jądra oraz geny „żeńskie” uczestni-

czące w kształtowaniu jajnika. Rolą genetycznej kontroli rozwoju gonad jest doprowadzenie do wykształcenia gonad zgodnych z płcią genetyczną osobnika. Brak takiej zgodności doprowadziłby do poważnych konsekwencji, takich jak hermafrodytyzm czy rewersja płci, którym często towarzyszy bezpłodność, dlatego też podczas różnicowania gonad musi występować system zabezpieczeń ściśle kontrolujących ten proces.

### POCZĄTEK ROZWOJU GONAD

Rozwój gonad w zarodku myszy rozpoczyna się w 10 dniu po kopulacji (łac. *dies post coitus*, 10,0 dpc), natomiast u człowieka w czwartym tygodniu ciąży, kiedy to powstaje para grzebieni płciowych, mających postać podłużnych fałdów nabłonka celomatycznego. Te początkowe zawiązki utworzone są jedynie przez komórki somatyczne, jednak po krótkim czasie wnikają do nich komórki prapłciowe (ang. primordial germ cells, PGCs), które przywędrowały z okolic szypuły

omocznia zarodka. Od tego momentu zawiązek gonady zbudowany jest z komórek somatycznych, pochodzących z proliferującego nabłonka celomatycznego, oraz z komórek linii płciowej (MCLAREN 2003). Niewyjaśniona pozostaje determinacja miejsca, w którym ma dojść do powstania grzebieni płciowych. Mogą za to odpowiadać geny *Wtl*, *Sfl* oraz *Gata4* i *Fog2*, gdyż ulegają one ekspresji w grzebieniach płciowych już w najwcześniejszym stadium.

### *Sry* – GŁÓWNY GEN DETERMINACJI PŁCI MĘSKIEJ SSAKÓW

Początkowo zawiązki gonad są niezróżnicowane płciowo, gdyż ulegają w nich ekspresji identyczne geny niezależnie od płci genetycznej. Sytuacja taka ma miejsce do momentu, w którym w komórkach somatycznych gonady osobnika o genotypie XY rozpoczyna

się ekspresja genu *Sry*, uznanego za główny czynnik determinacji jądra (łac. *testis*) (GUBBAY i współaut. 1990, KOOPMAN i współaut. 1991). Komórki, w których następuje ekspresja *Sry*, różnicują się w komórki Sertoliego, stanowiące somatyczne elementy kanalików

nasiennych. Tak więc, pierwszym symptodem różnicowania płci męskiej jest indukcja przekształcania określonych komórek somatycznych gonady w komórki Sertoliego, które będą kierowały właściwym rozwojem jądra jako organu odpowiedzialnego za kształtowanie męskich cech płciowych organizmu na drodze hormonalnej. W jądrze myszy ekspresja *Sry* rozpoczyna się w 10,5 dpc, a jej szczyt przypada na 11,5 dpc, po czym jest wyciszana i kończy się w 12,5 dpc. Trwa więc zaledwie dwa dni i zachodzi jedynie w przyszłych komórkach Sertoliego. W pojedynczej komórce białko SRY obecne jest zaledwie osiem godzin lub nawet krócej (SEKIDO i współaut. 2004). Także u ludzi SRY pojawia się w przyszłych komórkach Sertoliego, ale tu utrzymuje się przez całe życie, podobnie jak w komórkach linii płciowej (SALAS-CORTES i współaut. 1999).

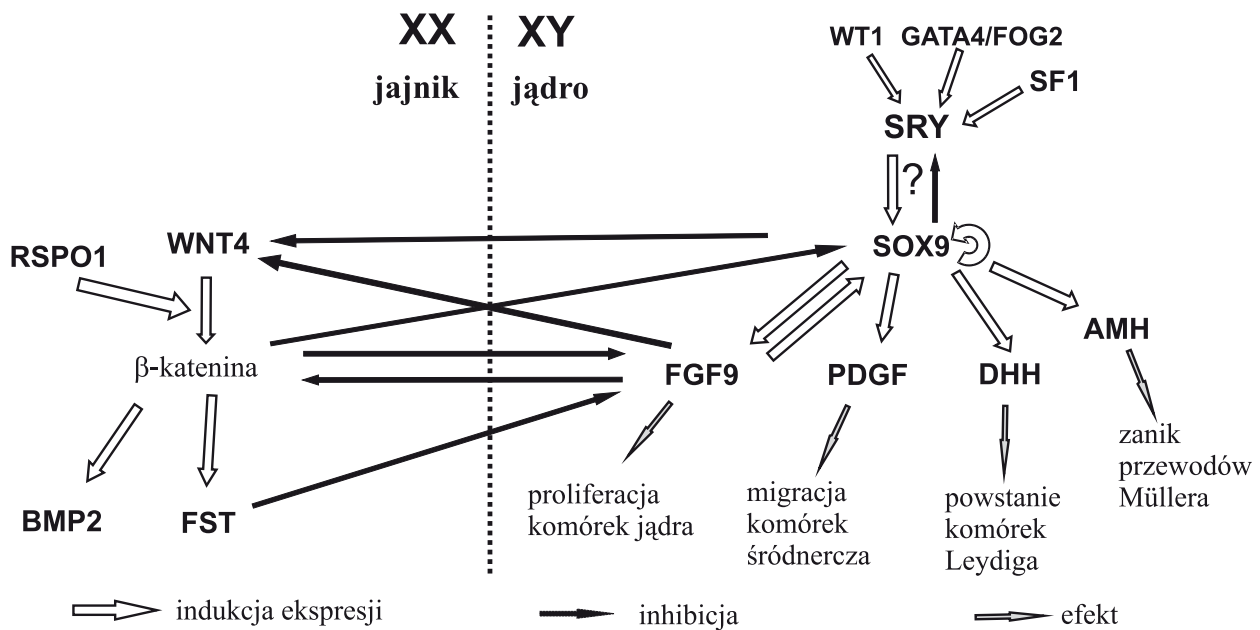
*Sry* jest genem potrzebnym do zainicjowania różnicowania się gonady męskiej i jest on wystarczający do skierowania zawiązku gonady genetycznej samicy myszy (XX) na szlak rozwoju jądra (KOOPMAN i współaut. 1991); natomiast w większości przypadków jego braku, gonada różnicuje się w jajnik. Podobnie, zbyt niski poziom ekspresji *Sry*, spowodowany mutacjami niektórych genów, doprowadza do przejścia kontroli nad gonadą przez geny kierujące rozwojem jajnika, w efekcie doprowadzając do rewersji płciowej. Tak więc istotne jest osiągnięcie przez białko SRY wysokiego stężenia w komórce, aby gonada XY mogła się przekształcić w jądro. Ekspresja genu *Sry* nie rozpoczyna się we wszystkich komórkach gonady w jednakowym czasie, bowiem najwcześniej pojawia się ona w komórkach centralnej części gonady, po czym rozprzestrzenia się w kierunku dogłowym i doogonowym (BULLEJOS i KOOPMAN 2001).

Gen *Sry* występuje jedynie u ssaków. Mieści się na krótkim ramieniu chromosomu Y i wyewoluował prawdopodobnie z genu *Sox3* położonego na chromosomie X. Koduje on białko należące do rodziny czynników SOX posiadających konserwatywną domenę HMG (ang. high mobility group), dzięki której SRY wiąże się z określonym regionem DNA o sekwencji WACAAW (gdzie W oznacza A lub T). SRY po związaniu z nicią DNA, powoduje jej wygięcie o 60-85°, co doprowadza do inicjacji ekspresji innych genów odpowiedzialnych za różnicowanie się gonady męskiej (POLANCO i KOOPMAN 2007).

Sygnal wywołujący ekspresję *Sry* jest niewyjaśniony. U myszy mutacje genów *Gata4/Fog2*, *Wt1* oraz genów kodujących receptory insulinowe IGFIR, IRR, IR powodują osłabienie ekspresji *Sry* (NEF i współaut. 2003, TEVOSIAN i współaut. 2002, WAGNER i współaut. 2003). Sugeruje to, że mogą one uczestniczyć w regulacji ekspresji genu *Sry* (Ryc. 1). Nie jest jednak pewne czy rewersje płciowe spowodowane mutacjami wynikają z obniżenia ilości SRY przypadającej na komórkę, czy ze zmniejszenia liczby przyszłych komórek Sertoliego. Gen *Wt1* koduje czynnik transkrypcyjny, występujący w co najmniej 24 izoformach. Dla rozwoju gonady istotne są dwie izoformy tego białka, które różnią się obecnością trzech aminokwasów; są to WT1-KTS i WT1+KTS. Brak krótszej izoformy zwanej WT1-KTS zwiększa poziom apoptozy i prowadzi do regresji gonady, nie hamując jednak ekspresji genów różnicującego się jądra; czynnik ten nie jest zatem konieczny do wykształcenia płci męskiej, chociaż *in vitro* wykazano, że ma zdolność wiązania się z promotorem *Sry*. Z kolei brak izoformy dłuższej WT1+KTS prowadzi do odwrócenia płci; izoforma ta uczestniczy więc zapewne w determinacji płci. Nie wiąże się z promotorem *Sry*, natomiast działa prawdopodobnie poprzez zwiększenie stabilności *Sry* mRNA lub tempa jego translacji. Takie działanie tłumaczy występowanie małego stężenia *Sry* mRNA w różnicującej się gonadzie męskiej i wysokiego stężenia białka SRY w komórkach (POLANCO i współaut. 2007).

Badania mysich chimer, uzyskanych z połączenia komórek o genotypach XX i komórek XY, dowiodły, że istnieje progowa wartość liczby komórek XY, konieczna do osiągnięcia, by gonada mogła różnicować się w jądro (PALMER i BURGOYNE 1991). Otóż w gonadzie musi znajdować się co najmniej 30% komórek XY, zawierających gen *Sry*, by gonada nie przekształciła się w jajnik. Działanie czynnika SRY jest ściśle zależne od jego ilości. Do różnicowania się gonady męskiej konieczne jest osiągnięcie nie tylko wartości progowej stężenia SRY w danej komórce, ale także liczby komórek różnicujących się w komórki Sertoliego.

Występowanie komórek Sertoliego o genotypie żeńskim XX w gonadach chimer wskazuje na obecność jakiegoś czynnika parakrynowego wywołującego różnicowanie się komórek Sertoliego (PALMER i współaut. 1991). Czynnikiem tym okazała się prostaglandyna D<sub>2</sub>, wytwarzana zarówno przez mę-



Ryc. 1. Interakcje czynników różnicowania się gonad myszy.

W rozwoju jajnika (lewa strona) kluczową rolę odgrywa WNT4 stymulujący  $\beta$ -kateninę, indukującą ekspresję genów *Bmp2* i *Fst*, które kierują morfogenezą jajnika. Dodatkowo przedstawiono działanie r-spondyny 1, stwierdzone jedynie w rozwoju jajnika ludzkiego. W determinacji różnicowania gonady męskiej (strona prawa) główną rolę odgrywa SRY, który syntetyzowany jest pod kontrolą czynników WT1, SF1 i GATA4/FOG2. SRY pobudza ekspresję genu *Sox9*, który z jednej strony hamuje zwrotnie ekspresję *Sry*, a z drugiej pobudza ekspresję genów morfogenezy jądra, takich jak FGF9, PDGF, DHH. Czynniki SOX9 i FGF9 hamują ekspresję genów rozwoju jajnika.

skie komórki linii płciowej, jak i przez różnicujące się komórki Sertoliego. Ekspresja genu syntazy prostaglandyny D<sub>2</sub> jest indukowana przez białko SOX9, będące jednym z pierwszych markerów różnicującego się jądra (WILHELM i współaut. 2005).

Mieszkańcy myszy (*Mus domesticus*) posiadające chromosomy Y szczepów pochodzących z takich miejscowości jak Val Pochiavo w Szwajcarii (Y<sup>POS</sup>) czy Tirano we Włoszech (Y<sup>TIR</sup>) wykazują na tle genetycznym szczepu B6 częste zaburzenia rozwoju jąder. Otóż pewne szczepy posiadają „słabsze” allele *Sry*, ulegające ekspresji zbyt późno lub na zbyt niskim poziomie, przez co na tle genetycznym innych szczepów gonada XY rozwija się jako *ovotestis* lub nawet jako jajnik (BULLEJOS i KOOPMAN 2005). Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku mutacji genu *M33*, która doprowadza do rewersji płciowej poprzez opóźnienie rozwoju jądra (BRENNAN i CAPEL 2004). Tak więc, dla determinacji płci męskiej istotny jest poziom ekspresji *Sry* oraz moment, w którym białko SRY osiąga najwyższe stężenie, a nie długość okresu ekspresji *Sry*. Istnieje bowiem krótki

przedział czasowy, w którym musi dojść do ekspresji *Sry*, by gonada mogła się różnicować się w jądro. Oczywiście jest, że okres ten musi poprzedzać moment podwyższenia poziomu ekspresji genów kierujących rozwojem jajnika.

*Ovotestis* jest gonadą mającą charakter zarówno jajnika jak i jądra; u ssaków powstaje w wyniku zaburzeń determinacji płci. U myszy w *ovotestis* tkanka jądrowa zajmuje położenie centralne, natomiast część jajnikowa peryferyczna. Taka charakterystyczna struktura jest następstwem falowego rozprzestrzeniania się ekspresji *Sry*. Najwcześniejszy sygnał różnicowania się jądra pojawia się w centrum gonady i na niektórych płach genetycznych wystarcza to do indukcji różnicowania się komórek Sertoliego. Natomiast w peryferycznych strefach gonady ekspresja *Sry* następuje zbyt późno, tuż po rozpoczęciu intensywnej ekspresji genów rozwoju jajnika. Może tu więc dojść do przejścia przez żeńskie szlaki regulatorowe kontroli nad różnicowaniem się tych najbardziej zewnętrznych części gonady.

## SOX9 – KLUCZOWY GEN KONIECZNY DO POWSTANIA GONADY MĘSKIEJ

Tuż po rozpoczęciu ekspresji *Sry* w komórkach somatycznych gonady myszy ulega podwyższeniu stopień transkrypcji 266 genów, natomiast wyciszeniu podlega ekspresja 50 genów (BEVERDAM i KOOPMAN 2005). Kluczowym genem koniecznym do rozwoju jądra okazał się *Sox9*, którego ekspresja zachodzi na niskim poziomie już w zawiązkach gonad obu płci, jednak zaledwie cztery godziny po rozpoczęciu ekspresji *Sry* w gonadzie męskiej gwałtownie wzrasta. Czas i miejsce ekspresji *Sry* i *Sox9* wskazują, że czynnik SRY prawdopodobnie bezpośrednio aktywuje ekspresję genu *Sox9* (SEKIDO i współaut. 2004). Fala ekspresji *Sox9* rozchodzi się w obrębie gonady podążając za falą ekspresji *Sry*. Rozpoczyna się ona w centrum grzebienia płciowego, a następnie rozprzestrzenia się na regiony peryferyczne (BULLEJOS i KOOPMAN 2005). Brak jednak niezbitych dowodów przemawiających za tym, że czynnik SRY bezpośrednio aktywuje ekspresję genu *Sox9* (Ryc. 1).

Białko SOX9, podobnie jak SRY, posiada domenę HMG, dzięki której wiąże się z łańcuchem DNA regulując ekspresję genów docelowych. U ludzi znane są przypadki mutacji genu *SOX9* prowadzące co prawda do zaburzeń w formowaniu chrząstek, ale towarzyszą im rewersje płci, doprowadzające do rozwoju osób o genotypie XY jako kobiet, u których występuje funkcjonalny gen *SRY* (WAGNER i współaut. 1994). Dowodzi to, że czynnik SOX9 pełni istotną rolę w determinacji płci męskiej. U ludzi inaktywacja już jednego z alleli *SOX9* doprowadza do rewersji płci, podczas gdy u myszy mutacja heterozygotyczna tego genu (*Sox9*<sup>+/−</sup>) nie zaburza rozwoju gonad. Wskazuje to na istotne różnice determinacji płci u tych dwu gatunków. Genetyczna kontrola rozwoju gonad ludzi wydaje się bardziej zależna od dozy czynników.

Tuż po rozpoczęciu transkrypcji *Sox9* u myszy zanika ekspresja *Sry*, podczas gdy u mutantów pozbawionych czynnika SOX9, poziom ekspresji *Sry* jest bardzo wysoki w porównaniu z typem dzikim. Wynika z tego, że SOX9 hamuje zwrotnie ekspresję *Sry* (CHABOISSIER i współaut. 2004, BARRIONUEVO i współaut. 2006). Istota regulacji okresu ekspresji *Sry* polega prawdopodobnie na oddziaływaniu czynnika SOX9 na niekodujący odcinek 3' genu *Sry* tzw. 3'UTR. Skrócenie tego odcinka w genie myszy zaburza proces wyciszenia ekspresji *Sry*

(SEKIDO i współaut. 2004). U człowieka odcinek 3'UTR w genie *SRY* jest bardzo krótki i to zapewne dlatego nie zachodzi wyciszenie ekspresji *SRY* w komórkach jąder ludzkich (SALAS-CORTES i współaut. 1999). Ludzki czynnik SRY prawdopodobnie pełni inne dodatkowe funkcje podczas różnicowania się płci męskiej.

Dotychczas zidentyfikowano tylko jeden gen będący bezpośrednim celem SOX9, *Amh*, kodujący hormonalny czynnik doprowadzający u samców do regresji przewodów Müllera, u samic przekształcających się w jajowody.

Gen *Sry* powstał stosunkowo niedawno, a jego występowanie ogranicza się jedynie do ssaków. Natomiast funkcja *Sox9* w rozwoju gonady męskiej jest bardziej konserwatywna i być może obejmuje wszystkie zwierzęta tkankowe (Metazoa). Świadczy to o tym, że rola czynnika SRY może sprowadzać się jedynie do inicjacji ekspresji *Sox9*. SRY nie bierze udziału w podtrzymaniu ekspresji *Sox9*; odpowiada bowiem za to autoregulacyjna zdolność SOX9, a także regulacja ze strony fibroblastycznego czynnika wzrostu (FGF9) (Ryc.1). Zaskakujące, że przy braku *Sry* obecność białka SOX9 jest w stanie doprowadzić do powstania gonady męskiej. Udowodniło to uzyskanie myszy transgenicznych o żeńskim genotypie XX zapatrzonych w dodatkową, nadliczbową kopię genu *Sox9*. Rozwijały się one jako normalne samce (VIDAL i współaut. 2001), były jednak bezpłodne z powodu braku pozostałych genów kierujących spermatogenezą, położonych na chromosomie Y. Jądra takich genetycznych samic powstałych w wyniku odwrócenia płci zawierają kanaliki nasienne o obszernym świetle, zbudowane jedynie z komórek Sertoliego; z powodu braku komórek linii płciowej ich gonady są o połowę mniejsze od jąder typu dzikiego.

Z powyższych rozważań wynika, że białko SOX9, w przeciwieństwie do SRY, jest czynnikiem koniecznym do prawidłowego rozwoju jądra, a rola SRY ogranicza się prawdopodobnie jedynie do aktywacji ekspresji *Sox9*, który z kolei włącza szereg innych genów powodujących zapoczątkowanie ciągu zmian strukturalnych i fizjologicznych charakterystycznych dla różnicującej się gonady męskiej.

Morfologicznymi symptomami różnicowania się gonady męskiej są: (i) silna proliferacja nabłonka celomatycznego otaczającego



gonadę, (ii) różnicowanie się komórek Sertoliego, (iii) formowanie się sznurów jądrowych, z których powstaną kanaliki nasienne, (iv) migracja komórek ze śródnercza do gonady, (v) różnicowanie się płodowych komórek Leydiga, wytwarzających testosteron, (vi) formowanie unaczynienia specyficznego dla jądra (ROSS i CAPEL 2005).

W gonadzie męskiej pewną bliżej nie określoną podrzędną rolę spełnia gen *Sox8*; być może jest on jedynie spadkiem po naszych przodkach, a może stanowi zabezpieczenie na wypadek niesprawnego działania *SOX9* (KOOPMAN 2005).

Hipotezy tłumaczącej regulację ekspresji *Sox9* dostarczyły mysie mutanty *Odsex*, u których pewna insercja w obrębie chromosomu 11 w pobliżu genu *Sox9* spowodowała delecję, skutkującą odwróceniem płci osobników XX (BISHOP i współaut. 2000). Prawdopodobnie delecja ta dotyczyła pewnego regionu, z którym wiąże się żeński czynnik doprowadzający do represji *Sox9*, przez co brak owego regionu uniemożliwił zahamowanie ekspresji *Sox9* i w efekcie indukcję męskich szlaków regulacyjnych w gonadach XX. U dzikich samców represja ta zapewne jest blokowana przez *SRY*.

*SRY* i *SOX9* są czynnikami transkrypcyjnymi, tak więc po translacji, która zachodzi w cytoplazmie muszą dotrzeć do jądra komórkowego, by spełniać swe określone funkcje. Rolę w tym imporcie odgrywa importyna  $\beta 1$  oraz kalmodulina (BRENNAN i CAPEL 2004), których defekty zaburzają transport białek do jądra komórkowego, między innymi *SRY* i *SOX9*, co skutkuje różnicowaniem się gonady XY w jajnik. Istotny jest tu także proces acetylacji białka *SRY*, która wpływa na zwiększenie poziomu transportu tego czynnika do wnętrza jądra komórkowego, podczas gdy deacetylacja powoduje wzrost stężenia białka *SRY* w cytoplazmie (POLANCO i KOOPMAN 2007). Mechanizm indukcji różnicowania komórek Sertoliego przez prostaglandynę  $D_2$  polega właśnie na aktywacji importu białka *SOX9* do wnętrza jądra komórkowego (MALAKI i współaut. 2005). Z kolei zablokowanie eksportu *SOX9* z jąder komórkowych w gonadzie XX doprowadza do uruchomienia szlaku kierującego rozwojem gonady męskiej. Zatem utrzymanie określonego poziomu *SRY* i *SOX9* w jądrze komórkowym poprzez regulację importu i eksportu może być ważnym elementem kontroli determinacji płci.

#### PROLIFERACJA KOMÓREK GONADY JEST KONIECZNA DLA RÓŻNICOWANIA GONADY MĘSKIEJ

W procesie determinacji płci męskiej wystarczająco duża liczba komórek musi przeprowadzić ekspresję *Sry*, tak więc w gonadzie męskiej powinna zachodzić szybka ich proliferacja, zabezpieczająca gonadę o genotypie XY przed feminizacją. Okazuje się, że namnażanie komórek nabłonka celomatycznego jest najwcześniejszym morfologicznym syndromem różnicowania się jądra. Komórki te wnikają w głąb gonady i tam następuje w nich ekspresja *Sry* doprowadzająca do ich przekształcenia się w komórki Sertoliego. W męskiej gonadzie myszy konieczny jest co najmniej ośmiodziesiętny okres proliferacji. Zbyt późne lub zbyt krótkie namnażanie się komórek somatycznych prowadzi do przejścia kontroli nad taką gonadą przez żeńskie geny, co w efekcie daje odwrócenie płci. Zablokowanie podziałów mitotycznych komórek gonady męskiej w tym kluczowym okresie doprowadza więc do nieprawidłowego różnicowania się komórek Sertoliego i zaburzeń formowania się sznurów jądrowych (SCHMAHL i CAPEL 2003).

Główną rolę sygnalizacyjną w proliferacji odgrywa fibroblastyczny czynnik wzrostowy – FGF9. Genetyczne samce XY z mutacjami genu *Fgf9* rozwijają się jako samice, gdyż przy braku tego czynnika wzrostowego nie następuje wystarczająca proliferacja. Liczba komórek *Sry*-pozytywnych jest więc zbyt niska, przez co żeńskie geny nie są dostatecznie hamowane i dochodzi do rewersji płciowej. Ekspresja genu *Fgf9*, podobnie jak ekspresja *Sox9*, zachodzi w gonadach niezależnie od płci genetycznej, aż do momentu rozpoczęcia ekspresji *Sry*, kiedy to stopień ekspresji genu *Fgf9* jest podwyższane prawdopodobnie przez *SOX9* (Ryc. 1). Z kolei czynnik FGF9 jest konieczny do utrzymania intensywnej ekspresji *Sox9*. Występuje tu więc pętla sprzężenia zwrotnego dodatniego, dzięki czemu FGF9 prawdopodobnie stanowi parakrynowy czynnik promujący różnicowanie się komórek Sertoliego, jest więc on jednym z kluczowych czynników determinacji jądra (ROSS i CAPEL 2005). W gonadzie XX hodowanej w zwiększonym stężeniu FGF9 komórki zaczynają proliferować, ale brak

ekspresji genów kierujących rozwojem jądra nie prowadzi do rewersji płciowej, co wskazuje, że sama proliferacja nie wystarcza do indukcji różnicowania się komórek Sertoliego (BRENNAN i CAPEL 2004).

Kolejna grupa czynników sygnalizacyjnych wywołująca podziały komórek gonady męskiej to rodzina insulinowych i insulinopodobnych czynników wzrostu. U mysich mutantów nie posiadających INSR, IGF1R i IRR, będących

receptorami odpowiadających im czynników wzrostowych, następuje zahamowanie proliferacji komórek gonad i zahamowanie ekspresji genów męskich, pomimo obecności ekspresji *Sry*, w efekcie czego gonady XY rozwijają się w jajniki (NEF i współaut. 2003). Tak więc zaburzenia szlaków sygnalizacji, wywołujących proliferację gonady męskiej, doprowadza do rewersji płciowych genetycznych samców w fenotypowe samice.

#### MIGRACJA KOMÓREK ŚRÓDNERCZA JEST NIEZBĘDNA DO ROZWOJU GONADY MĘSKIEJ

Okazuje się, że różnicująca się gonada męska indukuje migrację komórek ze śródnercza do swojego wnętrza, która w przypadku jajnika nie zachodzi. Komórki wędrujące z zarodkowej nerki do gonady męskiej różnicują się przede wszystkim w komórki ścian naczyń krwionośnych, ale także w komórki Leydiga oraz specyficzne komórki peritubularne otaczające kanaliki nasienne.

Prawdopodobnie jednym z czynników chemoatrakcyjnych wydzielanych przez gonadę męską jest neurotropina 3 (NT3), której ekspresja odbywa się w komórkach Sertoliego, natomiast jej receptor (NTRK3) pojawia się w komórkach migrujących ze śródnercza. Zablockowanie receptora neurotropiny *in vi-*

*tro* doprowadza do zahamowania migracji komórek do wnętrza jądra (CUPP i współaut. 2000).

Drugim czynnikiem wywołującym wędrowkę komórek do gonady męskiej jest płytkowy czynnik wzrostowy PDGF, działający w gonadzie poprzez receptor PDGFR $\alpha$  (Ryc. 1). Mutanty nie posiadające czynnika PDGF nie wykazują zaburzeń, podczas gdy u osobników XY pozbawionych receptorów PDGFR migracja komórek ze śródnercza ulega zaburzeniu. Defekty przejawiają wtedy także sznury jądrowe, gdyż w ich formowaniu biorą udział komórki peritubularne, pochodzące ze śródnercza (BRENNAN i współaut. 2003).

#### ROZWÓJ SPECYFICZNEGO UNACZYNIENIA JAKO SYMPTOM RÓŻNICOWANIA SIĘ JĄDRA

Już między 11,5 a 12,0 dpc w gonadzie męskiej myszy rozpoczyna się formowanie specyficznego celomatycznego naczynia krwionośnego przebiegającego wzdłuż jądra, tuż pod jego nabłonkiem. Naczynie to rozgałęzia się, wnikając pomiędzy sznury jądrowe (BRENNAN i współaut. 2002). Komórki tworzące ścianę tego naczynia stanowią największą część komórek migrujących ze śródnercza. Zablockowanie migracji, jak można oczekiwać, doprowadza do braku specyficznego unaczynienia gonady męskiej. Podobnie zmutowane samce pozbawione receptorów PDGFR $\alpha$  posiadają wysoce zdeorganizowane

unaczynienie gonady spowodowane zaburzeniami migracji komórek ze śródnercza (BRENNAN i współaut. 2003).

Specyficzne unaczynienie gonady męskiej umożliwia efektywne doprowadzenie do krwi testosteronu, który musi zostać rozprowadzony po całym organizmie. W gonadach pozbawionych naczynia celomatycznego zaburzeniu ulega tworzenie sznurów jądrowych, tak więc formowanie struktury wewnętrznej jądra może być bezpośrednio uzależnione od wykształcenia specyficznego unaczynienia, tak jak to ma miejsce w rozwoju wątroby i trzustki (ROSS i CAPEL 2005).

#### GENETYCZNA REGULACJA RÓŻNICOWANIE SIĘ KOMÓREK LEYDIGA

Komórki Leydiga są endokrynowymi komórkami gonady męskiej. U ssaków wyróżnia się ich dwie populacje: płodowe komórki Leydiga oraz komórki Leydiga dorosłych osobni-

ków. Pierwsze powstają w czasie różnicowania się gonady i wymierają tuż po narodzinach. Kolejna populacja komórek steroidogennych różnicuje się w jądrze w okresie dojrzewania.

Wydaje się istotne, że znaczenie w wywołaniu proliferacji i różnicowania się płodowych komórek Leydiga odgrywa czynnik sygnalizacyjny Desert Hedgehog (DHH). Jest to białko produkowane w komórkach Sertoliego, jako jedno z ogniw męskiego szlaku regulacji rozwoju gonady (Ryc. 1). Receptorem DHH jest Patched 1 (Ptch1) występujący na płodowych komórkach Leydiga. U mutantów nie przeprowadzających ekspresji genu *Dhh* komórki te nie różnicują się, co doprowadza do feminizacji układu rozrodczego (PIERUCCI-ALVES i współaut. 2001).

#### MOLEKULARNE PROCESY ZACHODZĄCE W RÓZNICUJĄCEJ SIĘ GONADZIE ŻEŃSKIEJ

Po odkryciu genu warunkującego rozwój gonady męskiej w dalszym ciągu nie znany był gen stojący na szczycie szlaku kierującego różnicowaniem się jajnika. Wiedzano, że gen taki musi istnieć, gdyż dowodziły tego przypadki fenotypowych mężczyzn o całkowicie żeńskim genotypie (XX), a więc nie posiadających genu *Sry*. Początkowo proponowano, że gen *Dax1*, kodujący receptor jądrowy, jest głównym genem żeńskiego szlaku rozwoju gonady. Leży on w swoistym regionie chromosomu X (tzw. dosage-sensitive region on X), którego duplikacja prowadzi do wzmocnienia efektu jego działania. Zwielokrotnienie kopii *Dax1* powoduje u osobników XY feminizację poprzez włączenie molekularnego szlaku różnicowania się jajnika. Zaskakujące, że osobniki o genotypie XX *Dax1*<sup>-/-</sup> to normalne, płodne samice, natomiast osobniki XY *Dax1*<sup>+/Y</sup>, czyli genetyczne samce pozbawione genu *Dax1*, rozwijają się w fenotypowe samice. Samice takie posiadają jajniki i jajowody, w ich gonadach różnicują się pęcherzyki jajnikowe, a od samic XX *Dax1*<sup>+/-</sup> różni je jedynie brak ciałek żółtych. A więc mimo genotypu XY, u takich „samic” we wczesnym okresie komórki linii płciowej wchodzi w mejozę, a w dorosłym życiu tworzą owulujące oocyty. W zawiązkach takich gonad zachodzi ekspresja *Sry*, lecz poziom SOX9 jest wyraźnie obniżony w porównaniu z typem dzikim, co prowadzi do rewersji płciowej (MEEKS i współaut. 2003). Doświadczenie to dowiodło, że DAX1 działa na drodze pomiędzy SRY a SOX9 i jest konieczny w procesie różnicowania się gonad zarówno męskich jak i żeńskich. Duplikacja *Dax1* natomiast skutkuje przejściem gonady na szlak różnicowania się jajnika prawdopodobnie poprzez zahamowanie ekspresji genu *Sf1*.

W różnicowaniu komórek śródmięsowych gonady męskiej bierze także udział płytkowy czynnik wzrostowy PDGF. Przy braku jego receptorów występują defekty płodowych komórek Leydiga oraz nie zachodzi ekspresja enzymów steroidogenezy koniecznych do syntezy testosteronu (BRENNAN i współaut. 2003). W różnicowaniu się komórek Leydiga odgrywa rolę także gen *Arx*, którego mutacja doprowadza do ich braku, nie zaburza jednak rozwoju pozostałych elementów jądra (BRENNAN i CAPEL 2004).

DAX1 działa we właściwy sposób jedynie, gdy jego ekspresja osiąga odpowiedni, ściśle określony poziom i zachodzi we właściwym miejscu gonady.

Jednym z najwcześniejszych markerów różnicującego się jajnika jest sekrecyjny czynnik wzrostu WNT4, który działając poprzez błonowy receptor, doprowadza do aktywacji β-kateniny regulującej ekspresję innych określonych genów (BERNARD i HARLEY 2007). WNT4 odpowiedzialny jest za indukowanie żeńskiego szlaku rozwoju gonady, a także za hamowanie czynników determinujących powstanie gonady męskiej. W różnicującym się jajniku WNT4 indukuje ekspresję genów *Fst* i *Bmp2* (Ryc. 1). Gen *Fst* koduje folistatynę, która podobnie jak WNT4 jest represorem genów różnicowania się gonady męskiej (BRENNAN i CAPEL 2004). W sumie zidentyfikowano 242 geny, których ekspresja wzrasta podczas różnicowania się jajnika (BEVERDAM i KOOPMAN 2005).

Samice myszy pozbawione *Wnt4* (XX *Wnt4*<sup>-/-</sup>) oraz kobiety z mutacjami tego genu charakteryzuje maskulinizacja, ale obserwowany u nich brak ekspresji markerowych genów jądra wskazuje, że WNT4 nie jest pierwszym czynnikiem inicjującym różnicowanie się płci żeńskiej (BERNARD i HARLEY 2007). W gonadach męskich osobników pozbawionych czynnika FGF9 (XY *Fgf9*<sup>-/-</sup>) dochodzi do podwyższenia ekspresji *Wnt4*. Natomiast hodowla organotypowa gonad żeńskich w środowisku z podwyższonym stężeniem FGF9 doprowadzała do zahamowania ekspresji *Wnt4*. Tak więc czynnik WNT4 działa jako aktywny represor męskiego szlaku różnicowania gonady. Hamuje ekspresję genów *Sox9* i *Fgf9* (BERNARD i HARLEY 2007), co w efekcie uniemożliwia rozejście się w gonadzie sygnału



indukcji rozwoju jądra. SOX9 i FGF9 jednocześnie pośrednio lub bezpośrednio blokują WNT4, co z kolei zapobiega w gonadzie męskiej przejściu kontroli nad jej rozwojem przez czynniki żeńskiego szlaku kontroli różnicowania się płci. Należy tu wyraźnie podkreślić, że antagonistyczne interakcje między FGF9 i WNT4 odgrywają niezwykle istotną rolę w różnicowaniu płciowym gonad.

Samce myszy pozbawione genu *Wnt4* (XY *Wnt4*<sup>-/-</sup>) posiadają obniżony poziom ekspresji markerowych genów charakterystycznych dla rozwijającej się gonady męskiej, takich jak *Sox9*, *Amh* i *Dhh*, co doprowadza do zaburzeń różnicowania się komórek Sertoliego, deformacji sznurów jądrowych oraz obniżenia liczby komórek Leydiga. WNT4 jest więc konieczny do rozwoju zarówno jajnika, jak i jądra (JEAYS-WARD i współaut. 2004).

Wiedzy na temat determinacji płci żeńskiej dostarczyły badania prowadzone na włoskiej rodzinie (PARMA i współaut. 2006). Rodziną tą zainteresowano się z powodu panującej w niej

skłonności do bezpłodności mężczyzn oraz do raka skóry. Okazało się, że posiadają oni genotyp w pełni żeński, a więc XX<sup>Sry</sup>. Analiza genetyczna wykazała mutację w genie *RSPO1* kodującym r-spondynę 1, odpowiedzialną za stabilizowanie β-kseniny (Ryc. 1). Brak *SRY* i brak funkcjonalnej r-spondyny 1 doprowadził u tych mężczyzn do różnicowania się gonad w jądra z powodu zbyt słabego blokowania przez β-kseninę męskich genów, takich jak *SOX9* i *FGF9*. Dowiedziano w ten sposób, że r-spondyna 1 bierze udział w hamowaniu funkcji genów i stoi zapewne na szczycie kaskady genów odpowiedzialnych za powstanie osobnika płci żeńskiej, a ekspresja genu kodującego r-spondynę 1 jest z kolei hamowana u osobników płci męskiej (CAPEL 2006). Tak więc poprawna okazała się hipoteza zakładająca, że czynnik SRY jest represorem żeńskiego represora męskości. Represorem męskości okazała się r-spondyna 1. Udowodniono jednocześnie, że gen *Sry* nie jest konieczny do rozwoju gonady męskiej.

#### INTERAKCJE KOMÓREK LINII PŁCIOWEJ I KOMÓREK SOMATYCZNYCH GONADY

U myszy w 7,25 dpc pewna grupa komórek położonych w okolicach omocznia zarodka zaczyna się różnicować w komórki prapłciowe (PGCs), które następnie rozpoczynają migrację w kierunku zawiązków gonad dzięki chemoatrakcji (MCLAREN 2003). Komórki prapłciowe, które nie dotrą do grzebieni płciowych od razu wchodzą w mejozę, natomiast gdy dotrą do gonady ich podziały mitotyczne zostają zahamowane, po czym przekształcają się w gonocyty. Dalsze ich losy zależą od płci gonady. Jeśli komórki płciowe zasiedlą gonadę żeńską wchodzą w profazę pierwszego podziału mejotycznego. Natomiast w zarodkowej gonadzie męskiej komórki germinalne nie wchodzą w mejozę. Sugeruje to, że komórki somatyczne gonady męskiej stwarzają środowisko nie pozwalające komórkom wejść w podział mejotyczny. Dzieje się to wskutek obecności enzymu CY-P26B1 w komórkach Sertoliego, który rozkłada kwas retinowy. Kwas ten jest wydzielany przez komórki śródnercza i indukuje wejście komórek linii płciowej w mejozę (BOWLES i współaut. 2006). W gonadzie żeńskiej brak enzymu rozkładającego kwas retinowy skutkuje rozpoczęciem mejozy. Zachodzi ona falowo, rozpoczynając się w przednim biegunie gonady i biegnie w kierunku końca tylnego, co zachodzi pod kontrolą komórek

somatycznych jajnika (MENKE i współaut. 2003). Komórki linii płciowej nie są więc jednostkami autonomicznymi. Komórki somatyczne gonad nie tylko kierują ich losami, ale także są konieczne do przetrwania tych komórek. Z drugiej strony, komórki płciowe są niezbędne jedynie do wykształcenia struktury jajnika, podczas gdy ich brak nie zaburza rozwoju gonady męskiej.

We wczesnym okresie gonadogenezy komórki linii płciowej w gonadzie XY rozpoczynają wydzielać prostaglandynę D<sub>2</sub>, która ma zdolności maskulinizowania hodowanych *in vitro* gonad XX (ADAMS i MCLAREN 2002). Z tego powodu uważa się, że prostaglandyna D<sub>2</sub> jest sygnałem wysyłanym przez komórki płciowe o genotypie XY, uczestniczącym w regulacji ekspresji genów szlaku rozwoju jądra. Zabezpiecza przed możliwością przejścia kontroli żeńskiego szlaku nad rozwojem gonady XY, co w efekcie doprowadziłoby do degeneracji komórek płciowych.

W hodowli tkankowych mejotycznych żeńskich komórek germinalnych wraz ze sznurami jądroowymi następuje zahamowanie formowania się sznurów. Natomiast żeńskie komórki płciowe, które jeszcze nie weszły w mejozę, w kokulturach z gonadą męską, nie wpływają na strukturę sznurów jądrowych. W hodowli gonad żeńskich z mejotycznymi



komórkami migracja komórek śródnerzowych nie występuje. Przeciwnie, migracja taka zachodzi w przypadku różnicujących się takich samych gonadach zawierających premejotyczne komórki płciowe lub pozbawionych komórek germinalnych. Tak więc komórki płciowe w zależności od swojego genotypu zapewne wydzielają czynniki kontrolujące rozwój gonady hamujące antagonistyczne szlaki determinacji płciowej. Na tej

podstawie wnioskuje się, że moment wejścia komórek germinalnych w mejozę stanowi koniec okresu podatności gonady żeńskiej na maskulinizację (YAO i współaut. 2003).

Za cenne wskazówki i poświęcony czas autor pragnie podziękować panu prof. dr hab. Jackowi M. Szymurze, pani dr Annie Pecio, pani doc. dr hab. Lucynie Witalińskiej, pani dr hab. Józefie Styrynie.

## GENETIC MECHANISMS UNDERLYING SEX DETERMINATION AND GONAD DIFFERENTIATION IN MAMMALS

### Summary

Sex determination and gonadal differentiation are crucial for reproductive success of an individual because they are directly responsible for correct development of gonads that orchestrate sex features and produce gametes. If germ cells are placed in a sex reversed gonad, their genetic sex will be opposite to gonadal sex, which will cause disturbance during spermatogenesis or oogenesis. This indicates that gonadal sex has to be compatible with genetic sex. A lack of compatibility is the direct cause of infertility in disorders such as sex reversal or hermaphroditism. It may be assumed that there is a system of protection against switching on genetic pathways involved in differentiation of the opposite sex gonad. In fact, genetic mechanisms underlying sex determination make up a network of positive and negative molecular interactions, both of which lead to structural changes and prevent sex reversal.

All sex determination pathways depend on the existence of *Sry*, expression of which has to take place within a critical time window so that a testis can develop. Moreover a threshold of both *Sry* expression level and number of *Sry*-positive cells needs to be overcome. The key event of male sex determination is DNA bending by SRY, which causes direct or indirect upregulation of *Sox9*. Most likely SOX9 switches on the expression of multiple genes, driving a bipotential gonad towards differentiation into a testis. Surprisingly, proteins such as DAX1 and WNT4, originally recognized as anti-testis factors, have turned out to be necessary for testis development. Another important discovery was establishing that r-spondin 1 is an essential factor in the female pathway, the loss of which results in a complete sex reversal, which indicates that *Sry* is not an irreplaceable testis determining factor under some conditions.

### LITERATURA

- ADAMS I. R., MCLAREN A., 2002. *Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis*. Development 129, 1155-1164.
- BARRIONUEVO F., BAGHERI-FAM S., KLATTING J., KIST R., TAKETO M. M., ENGLERT C., SCHERER G., 2006. *Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice*. Biol. Reprod. 74, 195-201.
- BERNARD P., HARLEY V. R., 2007. *Wnt4 action in gonadal development and sex determination*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39, 31-43.
- BEVERDAM A., KOOPMAN P., 2005. *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. 15, 417-431.
- BISHOP C. E., WHITWORTH D., QIN Y., AGOULNIK A. I., AGOULNIK I. U., HARRISON W., BEHRINGER R., OVERBEEK P., 2000. *A transgenic insertion upstream of Sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse*. Nat. Genet. 26, 490-494.
- BOWLES J., KNIGHT D., SMITH C., WILHELM D., RICHMAN J., MAMIYA S., CHAWENGSAKOPHAK K., WILSON M. J., 2006. *Retinoid signaling determines germ cell fate in mice*. Science 312, 596-600.
- BRENNAN J., CAPEL B., 2004. *One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development*. Nat. Rev. Genet. 5, 509-521.
- BRENNAN J., KARL J., CAPEL B., 2002. *Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad*. Dev. Biol. 244, 418-428.
- BRENNAN J., TILMANN C., CAPEL B., 2003. *Pdgfr- $\alpha$  mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad*. Genes Dev. 17, 800-810.
- BULLEJOS M., KOOPMAN P., 2001. *Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges*. Dev. Dyn. 221, 201-205.
- BULLEJOS M., KOOPMAN P., 2005. *Delayed Sry and Sox9 expression in developing mouse gonads underlie B6-Y<sup>DOM</sup> sex reversal*. Dev. Biol. 278, 473-481.
- CAPEL B., 2006. *R-spondin1 tips the balance in sex determination*. Nat. Genet. 38, 1233-1234.
- CHABOISSIER M. C., KOBAYASHI A., VIDAL V., LUTZKENDORF S., VAN DE KANT H., WEGNER M., DE ROOIJ D., BEHRINGER R., SCHEDL A., 2004. *Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse*. Development 131, 1891-1901.
- CUPP A. S., KIM G. H., SKINNER M. K., 2000. *Expression and action of neurotrophin-3 and nerve growth factor in embryonic and early postnatal rat testis development*. Biol. Reprod. 63, 1617-1628.

- GUBBAY J., COLLIGNON J., KOOPMAN P., CAPEL B., ECONOMOU A., MUNSTERBERG A., VIVIAN N., GOODFELLOW P., LOVELL-BADGE R., 1990. *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* 346, 245-250.
- JEAYS-WARD K., DANDONNEAU M., SWAIN A., 2004. *Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development*. *Dev. Biol.* 276, 431-440.
- KOOPMAN P., 2005. *Sex determination: a tale of two Sox genes*. *Trends Genet.* 21, 367-370.
- KOOPMAN P., GUBBAY J., VIVIAN N., GOODFELLOW P., LOVELL-BADGE R., 1991. *Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry*. *Nature* 351, 117-121.
- MALAKI S., NEF S., NOTARNICOLA C., THEVENET L., GASCA S., MEJEAN C., BERTA P., POULAT F., BOIZET-BONHOURE B., 2005. *Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation*. *EMBO J.* 24, 1798-1809.
- MCLAREN A., 2003. *Primordial germ cells in mouse*. *Dev. Biol.* 262, 1-15.
- MEEKS J. J., WEISS J., JAMESON J., 2003. *Dax1 is required for testis determination*. *Nat. Genet.* 34, 32-33.
- MENKE D. B., KOUBOVA J., PAGE D., 2003. *Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave*. *Dev. Biol.* 262, 303-312.
- NEF S., VERMA-KURVARI S., MERENMIES J., VASSALLI J. D., EFSTRATIADIS A., ACCILI D., PARADA L. F., 2003. *Testis determination requires insulin receptor family function in mice*. *Nature* 426, 291-295.
- PALMER S., BURGOYNE P. S., 1991. *In situ analysis of fetal, prepubertal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY*. *Development* 112, 265-268.
- PARMA P., RADI O., VIDAL V., CHABOISSIER M. C., DELLEMBRA E., VALENTINI S., GUERRA L., SCHEDL A., CAMERINO G., 2006. *R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy*. *Nat. Genet.* 38, 1304-1309.
- PIERUCCI-ALVES F., CLARK A. M., RUSSELL L. D., 2001. *A developmental study of the Desert hedgehog-null mouse testis*. *Biol. Reprod.* 65, 1392-1402.
- POLANCO J. C., KOOPMAN P., 2007. *Sry and the hesitant beginnings of male development*. *Dev. Biol.* 302, 13-24.
- ROSS A. J., CAPEL B., 2005. *Signaling at the crossroads of gonad development*. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 19-25.
- SALAS-CORTES L., JAUBERT F., BARBAUX S., NESSMANN C., BONO M. R., FELLOUS M., MCELREAVEY K., ROSEMBLATT M., 1999. *The human SRY protein in fetal and adult Sertoli cells and germ cells*. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 135-140.
- SCHMAHL J., CAPEL B., 2003. *Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad*. *Dev. Biol.* 258, 264-276.
- SEKIDO R., BAR I., NARVÁEZ V., PENNY G., LOVELL-BADGE R., 2004. *SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cells precursors*. *Dev. Biol.* 274, 271-279.
- TEVOSIAN S. G., ALBRECHT K. H., CRISPINO J. D., FUJIWARA Y., EICHER E. M., ORKIN S. H., 2002. *Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2*. *Development* 129, 4627-4634.
- VIDAL V., CHABOISSIER M., DE ROOIJ D., SCHEDL A., 2001. *Sox9 induces testis development in XX transgenic mice*. *Nat. Genet.* 28, 216-217.
- WAGNER K. D., WAGNER N., SCHEDL A., 2003. *The complex life of Wt1*. *J. Cell Sci.* 116, 1653-1658.
- WAGNER T., WIRTH J., MEYER J., ZABEL B., HELD M., ZIMMER J., PASANTES J., DAGNA BRICARELLI F., KEUTEL J., HUSTERT E., WOLF U., TOMMERUPT N., 1994. *Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9*. *Cell* 79, 1111-1120.
- WILHELM D., MARTINSON F., BRADFORD S., WILSON M. J., COMBES A. N., BEVERDAM A., BOWLES J., MIZUSAKI H., KOOPMAN P., 2005. *Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination*. *Dev. Biol.* 287, 111-124.
- YAO H., DINAPOLI L., CAPEL B., 2003. *Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads*. *Development* 130, 5895-5902.