

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE



Genové mutace ovlivňující vývoj *testes* u člověka
Gene mutations affecting the development of human *testes*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Simona Macháčová
Školitel: RNDr. Nataša Šebková

Praha 2011

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Nataši Šebkové za trpělivost, cenné rady a celkovou pomoc při psaní práce. Také děkuji svým rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala sama, s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svou školitelkou.

Praha 2011

Simona Macháčová

Abstrakt

Utváření savčích pohlavních orgánů je pozoruhodný proces, během kterého se u obou pohlaví ze stejného prekursoru (indiferentní gonády) tvoří morfologicky i funkčně odlišná struktura. Určujícími faktory, které rozhodnou o osudu nediferencované struktury, nejsou pouze geny samotné, ale také načasování transkripce regulačních genů a množství jejich produktů. Vývoj samčí i samičí gonády řídí rozsáhlý soubor regulačních genů, které se vzájemně ovlivňují, tvoří regulační síť. Hlavní úlohu v diferenciaci samčího pohlaví hraje gen *SRY*, který reguluje dobu i kvantitu exprese dalších faktorů. I nepatrné chyby (mutace) v sekvencích regulačních genů nebo ve změně jejich exprese mohou vést k narušení vývoje pohlavních orgánů, případně i zániku celého organismu. Přírodně se vyskytující mutace a jejich fenotypové projevy u člověka jsou vhodné ke studiu genových regulačních faktorů, jejichž aktivita vede k určení pohlaví. Díky těmto studiím se podařilo odhalit příčina mnoha vrozených defektů, což je prvním krokem k jejich případné léčbě.

Klíčová slova: embryogeneze, určení pohlaví, urogenitální rýha, indiferentní gonáda, *testes*, mutace, poruchy ve vývoji pohlaví

Abstract

Development of mammalian sex organs is remarkable process. Both ovaries and testes rise from the same precursor but then differentiate into morphologically and functionally different structure. The determining factors that decide the fate of undifferentiated structures are not just the genes themselves but also the timing of transcription regulatory genes and specific amount of their products. Development of male and female gonads manages a large set of regulatory genes that interact with each other. Together it forms the gene regulatory network. Crucial role in male sex differentiation plays an *SRY* gene which regulates the time and quantity of the other factors expression. Even slight errors (mutations) in genes sequences of regulatory genes could change their expression. This leads to disruption of the development of sex organs or even death of the whole organism. Naturally occurring mutations and their phenotype in humans are suitable for studies of gene sex regulatory factors. Thanks to these studies we are able to detect the cause of many birth defects what is a first step toward their eventual treatment.

Keywords:: embryogenesis, sex determination, urogenital ridge, bipotential gonad, *testes*, mutation, disorders of sex development

Obsah

1 Úvod	7
1.1 Morfologie a funkce varlete.....	7
1.2 Vývoj varlat.....	9
1.3 Mutace jako nástroj poznání.....	11
2 Mutace ovlivňující indiferentní stádium vývoje varlat	13
2.1 Změny během formování intermediálního mezodermu.....	14
2.1.1 <i>PAX2</i>	14
2.1.2 <i>EMX2</i>	15
2.2 Poruchy při utváření urogenitální rýhy.....	15
2.2.1 <i>WT1</i>	15
2.2.2 <i>LHX9</i>	16
2.2.3 <i>SF1</i>	17
2.2.4 <i>DAX1</i>	18
2.2.5 <i>GATA4</i>	18
2.2.6 <i>CBX2</i>	18
3 Mutace ovlivňující diferenciační stádium vývoje varlat	20
3.1 Ovlivnění časně fáze determinace vývoje samčích gonád.....	22
3.1.1 <i>SRY</i>	22
3.1.2 <i>SOX9</i>	24
3.1.3 <i>FGF9</i>	25
3.2 Ovlivnění pozdní fáze determinace vývoje samčích gonád.....	26
3.2.1 <i>AMH</i>	26
3.2.2 <i>TSPYL</i>	26
3.2.3 <i>DMRT1 a DMRT2</i>	27
3.2.4 <i>AR</i>	28
4 Další geny ovlivňující vývoj testes	29
5 Závěr	30
6 Použitá literatura	32

Seznam zkratek

AMH	antimüllerův hormon
AMHR	receptor antimüllerova hormonu
AR	androgen receptor
ARX	aristaless related homeobox
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
DAZL	deleted in azoospermia-like
DHH	desert hedgehog
DMRT	doublesex and mab-3 related transcription factor
dpo	počet dnů po ovulaci
DSD	disorders of sex development, poruchy ve vývoji pohlaví
EMX	empty-spiracles homeobox gen
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FOXL	forkhead Box L
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
HMG-box	high-mobility group protein box
HOXA	homeobox A
HSPG	heparan sulphate proteoglycans
hTES	human homologous SOX9 testis-specific enhancer
INSL	insulin-like 3
+KTS	forma proteinu s přítomným tripletem aminokyselin (lysin, threonin, serin)
-KTS	forma proteinu bez tripletu aminokyselin (lysin, threonin, serin)
LGR	elaxin/insulin-like family peptide
LHX	LIM homeobox gene
MAP3K	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MIS	Müllerian inhibiting substance
PAX	Paired box
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PGC	Primordial germ cells, prekuzory zárodečných buněk
PGD	partial gonadal dysgenesis
PGDS	prostaglandin-D synthase

RT-PCR	real time – polymerase chain reaction
SIDDT	sudden infant death with dysgenesis of the testes syndrome
SOX	SRY (sex determining region Y)-box
SRY	sex determining region on Y chromosome
SF	steroidogenic factor
TCF21	transcription factor 21
TSPYL	testis-specific Y-encoded-like protein
3'UTR	3' nepřekládaná oblast
wt	wild type, organismus divokého typu (jeho geny nebyly uměle pozměněny)
WT	Wilms' tumor suppressor

V textu jsou použity zkratky názvů genů v následující formě. Názvy lidských genů, mRNA nebo cDNA jsou uvedeny kurzívou a velkým písmem. Geny pocházející od jiných savčích druhů pouze s prvním písmenem velkým. Údaj o lokalizaci genu na chromozómu v lidském genomu je uveden v závorce ve tvaru:

- číslo chromozómu (1 – 22, X, Y)
- *p* pro pozici genu na krátkém raménku chromozómu (od francouzského *petit* = malý) nebo *q* pro pozici genu na dlouhém raménku chromozómu
- číslo značící vzdálenost umístění genu od centromery (podle histologického značení)

Jedná-li se o označení proteinu, není použita kurzíva.

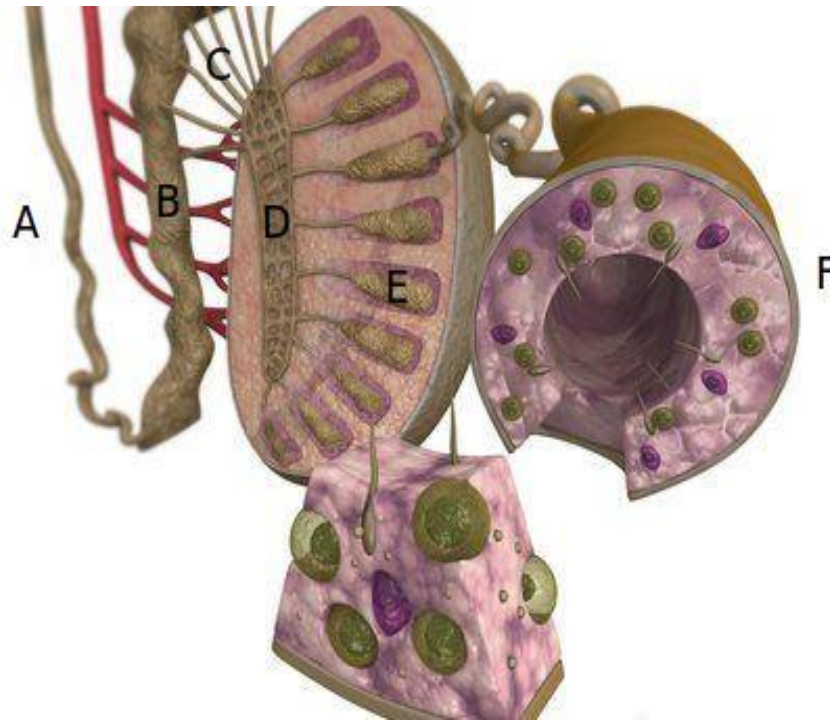
1 Úvod

Pohlavní orgány zajišťují výživu a ochranu zárodečným buňkám. Buňkám, které dávají vzniknout novému jedinci a které zprostředkovávají přesun genetické informace do další generace. Představují proto nesmírně významnou orgánovou soustavu pro zachování života jako takového. Nejvýznamnější částí pohlavních orgánů jsou pohlavní žlázy, ve kterých jsou uloženy zárodečné buňky. Samčí pohlavní žlázy se nazývají varlata (*testes*).

1.1 Morfologie a funkce varlete

Varlata (*testes*) jsou spolu s nadvarlaty (*epididymis*) u skupiny *Boreoeutheria*, kam se řadí i primáti spolu s člověkem, v dospělosti zavěšena pod tělní dutinou v kožním vaku, kterému říkáme šourek (*scrotum*). Mají tvar ze stran mírně zploštělého oválu. U člověka měří v průměru asi 3 cm, na šířku asi 2,5 cm a na délku pak 4 - 5 cm. Váha se pohybuje mezi 18 a 25 g (Gray 2000).

Samčí pohlavní žláza se skládá z mnoha lalůčků (*lobuli testis*) kónického tvaru (obr. č. 1). Každý lalůček obsahuje jeden a více drobných stočených semenotvorných kanálků (*tubuli seminiferi*), ve kterých probíhá spermatogeneze (zrání samčích zárodečných buněk) (obr. č. 1). Uvnitř kanálků můžeme najít tři nerovnoměrné vrstvy zárodečných buněk v různé fázi zrání - od diploidních spermatogonií přes meioticky se dělící spermatocyty k haploidním kulovým spermatidám, které prochází procesem spermateliózy, přeměně v bičíkovou formu buňky. V roce 1865 Enrico Sertoli popsal na řezech varletem uvnitř semenotvorných kanálků také zvláštní větvené buňky, které se nepochybaly buňkám zárodečným. Pojmenoval je „cellule ramificate“, rozvětvené buňky. Dnes se nazývají Sertoliho buňky. Sertoliho buňky vyživují zárodečné buňky procházející spermatogenezí a fagocytují zbytkový materiál (Baratelli *et al.*, 2002). Také syntetizují sekretorické regulační faktory, nezbytné pro spermatogenezi. Z velké části to jsou glykoproteiny transportního bio-protektivního typu (např. transferrin, ceruloplasmin), proteázy, inhibitory proteáz, proteiny formující bazální membránu mezi Sertoliho buňkami a peritubulárním prostorem a v neposlední řadě také růstové a parakrinní faktory (např. antimüllerův hormon, inhibin, aktivin) (Griswold 1995). Také sekretují specifickou isoosmotickou tekutinu (Rato *et al.*, 2010).



Obr. č.1 Vertikální řez varletem (*Homo sapiens*) s vnitřní strukturou varlete a uspořádáním systému kanálků: (A) ductus deferens, (B) epididymis, (C) ductuli efferentes testis, (D) rete testis, (E) lobuli testis, (F) tubuli seminiferi, zelené buňky představují zárodečné buňky v různých fázích zrání, fialové pak Sertoliho buňky (převzato ze SCIENCEphotoLIBRARY)

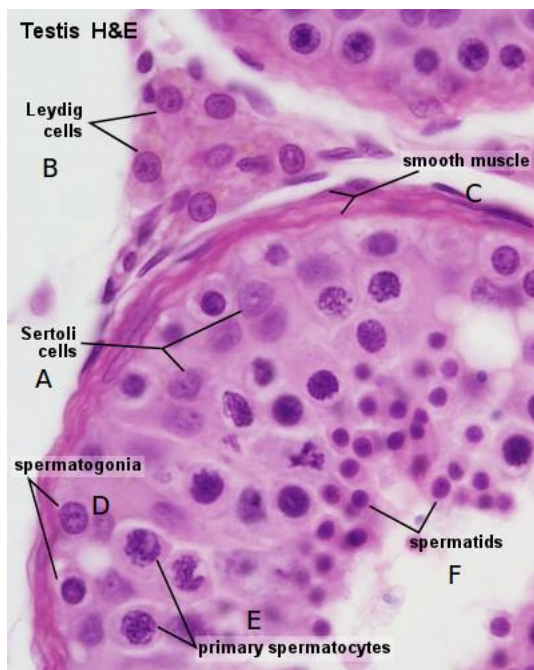
Semenotvorné kanálky jsou fixovány k lalůčkům vazivovou tkání. Každý kanálek je u člověka tvořen dvěma vrstvami. Bazální vrstva obsahuje ploché buňky a velké množství extracelulární hmoty v podobě elastických vláken, druhou vrstvu tvoří tenké epiteliální buňky. Buňkám v obou těchto vrstvách se říká peritubulární myoidní buňky (Gray 2000).

Prostor mezi jednotlivými kanálky vyplňuje vymezená pojivová tkáň – intersticiium. V něm se nacházejí intersticiální neboli Leydigovy buňky, se žlutě zbarvenými granulemi (tukové kapénky). Jejich objevitelem se stal německý zoolog Franc von Leydig v roce 1850. Hlavní funkce Leydigových buněk v dospělosti je produkce androgenů (zejména testosteronu), které ovlivňují zrání spermií i vývoj pohlavních znaků.

Semenotvorné kanálky se spojují se v síť (*rete testis*). Z ní vycházejí vývodné kanálky varlete (*ductuli efferentes testis*), které ústí do nadvarlete (*epididymis*). Nadvarlata jsou protáhlé struktury umístěné nad varlaty. Mají tři hlavní části: vstupní část neboli hlava (*caput*), tělo (*corpus*) a ocas (*cauda*). Na ocas nadvarlete plynule navazuje vývod, kterým je chámovod (*ductus deferens*). Celá žláza je obalena serózním obalem (*tunica vaginalis*) a tuhým bělavým vazivovým obalem (*tunica albuginea*), na jehož vnitřní ploše je cévnatý obal (*tunica vasculosa*) (Gray 2000).

Primární funkcí varlat je produkce spermií. Po úspěšně proběhlé spermatelióze jsou spermie

uvolňovány do středu semenotvorného kanálku a přecházejí z gonády do nadvarlete. Při průchodu nadvarletem dochází ke zrání spermií (změna složení plazmatické membrány, obsah a tvar akrozómu, spermie získávají schopnost pohybu). Maturované spermie jsou v nadvarleti skladovány.

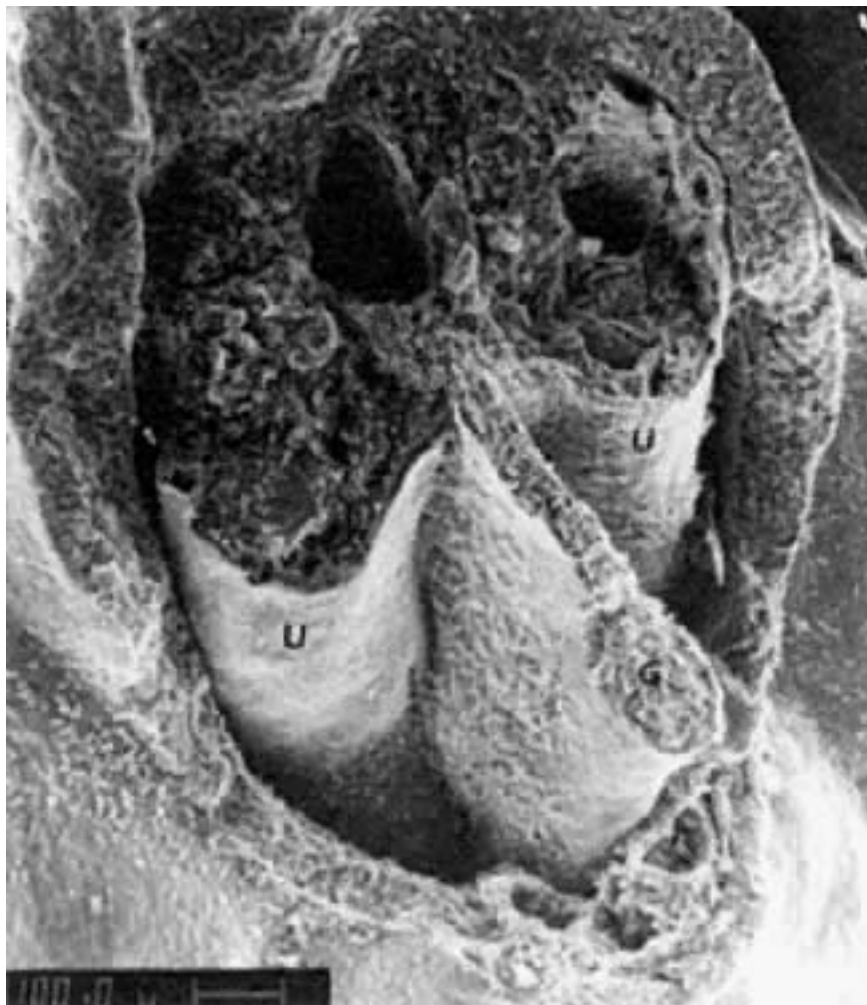


Obr. č.2 **Řez semenotvorným kanálkem:** (A) Sertoliho buňky, (B) Leydigovy buňky, (C) peritubulární myoidní buňky, (D) spermatogonie, (E) primární spermatocyty, (F) spermatidy; histologické barvení (převzato z Mark Hill 2010 <http://embryology.med.unsw.edu.au>)

1.2 Vývoj varlat

U obratlovců (*Vertebrata*) je rozmnožovací a vylučovací soustava úzce spjata morfologicky i ontogeneticky. Obě soustavy pocházejí ze stejné embryonální části mezodermu (Karl & Capel 1998). Mezoderm nemá celistvou stavbu. Před formováním jednotlivých orgánů se utváří přechodný stav, kdy je možné odlišit čtyři mezodermální struktury podle umístění v embryu. Ventrálně od neurální trubice je uložený chorda-mezoderm (též axiální mezoderm), laterálním směrem po obou stranách nacházíme paraxiální mezoderm, dále intermediální mezoderm a laterální deskový mezoderm (Gilbert 2006). Urogenitální soustava vzniká z intermediálního mezodermu. Člení se na kraniální pronefros (zahrnující i část s budoucími nadledvinkami), střední část zvanou mezonefros (odkud formují gonády) a kaudální metanefros (oblast formujících se ledvin). Okolo 4. až 5. týdne se zde začíná zvedat linie buněk, ze kterých se vytvoří urogenitální rýha (obr. č. 3) (Merchant-Larios *et al.*, 1993). Prekurzory podpůrných buněk i buněk sekretujících hormony jsou na snímku již

pozorovatelné. V 6. týdnu vývoje jsou v gonádě přítomny i zárodečné buňky, které migrovaly ze stěny žloutkového váčku, podél entodermu zadní části střeva.



Obr. č.3 Příčný řez v oblasti intermediálního mezodermu embryem (*Homo sapiens*) o stáří 35 dnů po oplození a velikosti 7mm: (U) urogenitální rýha, (G) střevo (převzato z www.glowm.com)

Následuje tvorba pohlavní žlázy se dělí na dvě odlišná stádia. V první fázi si gonáda ještě zachovává nediferencovanou podobu. Nese stejné strukturní znaky u obou pohlaví, proto dostala označení indiferentní nebo také bipotenciální gonáda.

U většiny savců se později (u člověka okolo 42. dne vývoje) za přítomnosti genu *sex determining region on Y chromosome (SRY)* v genomu spouští jeho exprese, následovaná expresí mnoha dalších transkripčních faktorů, například *SRY (sex determining region Y)-box 9 (SOX9)*, *SOX8*, *fibroblast growth factor (FGF9)* a jinými (Hanley *et al.*, 2000). Jedním z nejdůležitějších cílových genů *SRY* je *SOX9* (Sekido *et al.*, 2004). Oba tyto geny se považují za významné markery tvořících se Sertoliho buněk (pre-Sertoliho buňky). Zajímavá je například vzájemná regulace genů *SOX9* a *FGF9*, která vede pozitivní zpětnou vazbou ke znásobení vlastní exprese a zahájení

transkripce dalších genů specifických pro vývoj varlat (obr. č. 4). Indiferentní orgány dostávají podobu varlat. Touto diferenciací je zahájena druhá fáze, během které dochází k morfologickému ustanovení varlete a vytvoření specifických buněčných typů. Během 7. - 8. týdne vývoje stoupá produkce antimüllerova hormonu (*AMH*), který určuje diferenciaci Wolfových duktů a naopak degradaci Müllerových chodeb.

Ve stejné době, kdy varlata procházejí řadou morfologických změn, embryonální vaječníky zůstávají neměnné. Tento fakt vedl donedávna k názoru, že ženské pohlaví je evolučně původnější stav. Ovšem až do doby, než se podařilo vyvolat u dospělé samice myši (*Mus musculus*) změnu pohlaví a to vypnutím jediného genu – *forkhead box L2 (Foxl2)* (Uhlenhaut *et al.*, 2009). U těchto linií se již vyvinuté granulosoové buňky vaječníků (samičí homology Sertoliho buněk) transformují na buňky podobné právě Sertoliho buňkám varlat a dokonce se zvýší i produkce testosteronu. Tyto výzkumy ukazují, že není jasné, jakým způsobem evoluce pohlavního ústrojí probíhala.

1.3 Mutace jako nástroj poznání

Změny v sekvenci molekuly DNA, které mohou vést k vytvoření nového znaku nebo vlastnosti, se nazývají mutace. Mutace jsou rozdělovány podle rozsahu změny v DNA na genové, chromozómové nebo genomové. Základní typy genových mutací jsou inserce, delece a substituce. Během inserce se do sekvence přidá jeden nebo více nukleotidových párů. Naopak při deleci je jeden nebo více párů z molekuly odstraněno. Obě tyto možnosti vedou k posunu čtecího rámce, *frameshift mutation*, a tím i ke ztrátě celé informační hodnoty následujícího úseku DNA. Příslušný gen tak postrádá informaci, kterou nesl, a jeho ztráta často způsobuje malformace ve vývoji embrya nebo zastavení vývinu. Substituce (nahrazení nukleotidového páru jiným) je jedna z mála mutací, která díky degeneraci genetického kódu nemusí vždy způsobit zásah do proteinu. Pokud se nahradí purinová báze za purinovou ($A \leftrightarrow G$) nebo pyrimidinová za pyrimidinovou ($T \leftrightarrow C$), jedná se o tranzici. Pokud dojde k nahrazení purinu pyrimidinem nebo naopak, hovoříme o transverzi. O tomto typu mutací se spekuluje jako o možné příčině různorodosti organismů a o hlavním nástroji změn v DNA vedoucích k evoluci, neboť do informační molekuly zasahuje v malém rozsahu.

Klasická metoda přímého studování genů se zaměřuje na zajímavý a výjimečný fenotypový projev a klade si za cíl odhalit rozdíly (mutace) v genotypu jedince. Naopak analýza mutací neznámých genů se stala nástrojem pro přiřazení funkce novému genu. Tento přístup zkoumání genů dostal označení genetika zpětná. Oba tyto přístupy se používají pro sledování mutací nejen u genů

důležitých pro vývoj pohlavních žláz. Napomáhají pochopit proces, během něhož se ze shluku primárních buněk stává přesně daná struktura, ontogenezi. Embryonální vývoj je z tohoto pohledu zcela jistě nejkritičtější období v životě jedince. Utváření orgánových soustav jsou komplikované děje, při kterých může i nepatrná odchylka způsobit zastavení vývoje či vytvoření nefunkčního fenotypového projevu. Termín „poruchy ve vývoji pohlaví“ byl navrhnout jako označení vrozených podmínek, díky nimž probíhá vývoj pohlaví člověka atypicky. Projevují se na úrovni genů, chromozómů, pohlavních orgánů i na celkové anatomii jedince (Lee *et al.*, 2006). Jsou to právě tyto odchylky v genech klíčových pro vývoj, které pro vědce představují materiál s rozsáhlou výpovědní hodnotou, a tudíž stále přitahují jejich pozornost.

Vztah mezi změnou sekvence genu a projevem fenotypu není vždy jasný. Mnoho informačních mutací v kritických genech je letálních již v raném vývoji, zděděné mutace nemusí odrážet všechny funkční úlohy proteinů a získané somatické projevy mohou odrážet široké spektrum mutací. Identifikace mutace je proto velmi obtížná a získané závěry nemusí být úplné.

Tato práce se zabývá především genetickými aspekty abnormálního vývoje samčích pohlavních žláz (*testes*), jejichž příčina leží v mutacích několika vybraných genů, jež ovlivňují procesy proliferace, diferenciace a morfogeneze varlat. Není možné obsáhnout veškeré známé projevy poruch vývoje pohlaví, proto zde pouze uvádím několik nejčastěji se vyskytujících mutací, zajímavé nebo nově objevené mutace a jejich následky. Také výčet genů, kterými se zabývám, není úplný především kvůli prostorovým omezením bakalářské práce. Některé případy mutací či interakcí mezi jednotlivými komponenty genové regulační sítě si dovoluji demonstrovat na modelových organismech. Dané jevy nemusí u člověka probíhat zcela identicky. Jisté výzkumy však na člověka aplikovatelné nejsou buďto z morálních nebo praktických důvodů.

2 Mutace ovlivňující indiferentní stádium vývoje varlat

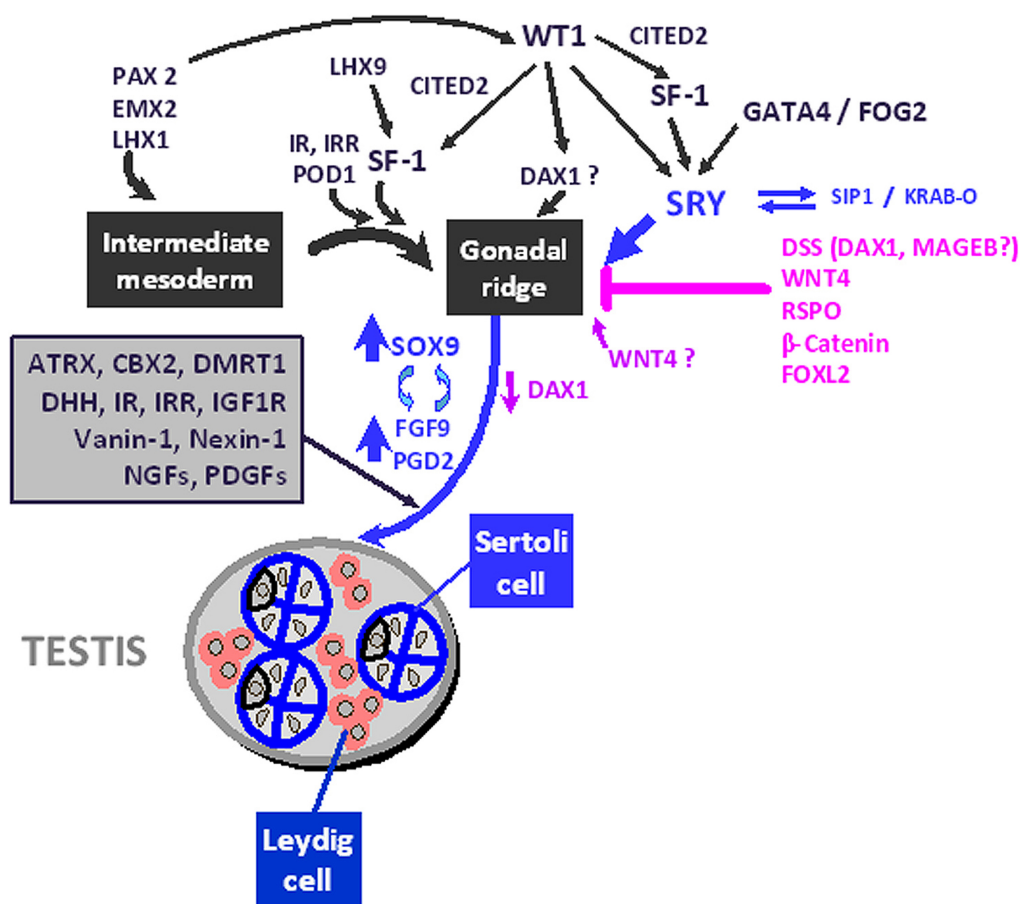
Indiferentní stádium je fáze ve vývoji jak samčí tak samičí pohlavní žlázy, ve kterém ještě není možné rozlišit gonády ani morfologicky ani na základě rozdílných genových expresí. Procesy, kterými se tato struktura utváří jsou stejné pro obě pohlaví. Porucha v této části vývoje vede téměř nevyhnutelně k zastavení vývoje gonád i ledvin (viz níže).

K utvoření funkčního orgánu nestačí jeden či dva specializované geny. Jedná se o dlouhý a komplikovaný proces, ve kterém hrají roli desítky genů, které se navíc vzájemně ovlivňují pomocí zvyšování, snižování nebo úplného zastavování genové exprese. Takovému systému se říká genová regulační síť. Její odhalení není snadné a bylo a stále je k němu nutné provést mnoho experimentů na vhodných modelových organismech. Regulační síť, která je níže popsána, byla převážně zjištěna na základě experimentů na myším modelu (*Mus musculus*), vybraném pro předpokládanou vysokou podobnost mezi genomy savců, tedy i mezi primáty (*Primates*) a hlodavci (*Rodentia*). Poznatky ze studií na myších však nemohou být extrapolovány na všechny zbývající savce. Na tyto drobné rozdíly poukázala kupříkladu studie porovnávající příbuzné druhy myš domácí (*Mus musculus*) a krtek iberský (*Talpa occidentalis*) (Carmona *et al.*, 2009).

Vývoj gonád začíná vytvořením intermediálního mezodermu, na němž se podílejí především geny *Paired box 2 (PAX2)*, *Empty spiracles homeobox 2 (EMX2)*, *Lim homeobox 1 (LHX1)* (Torres *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1997; Shawlot & Behringer 1995). Formování genitální rýhy se účastní zejména *Steroidogenic factor 1 (SF1)*, který je regulován expersí genů *Lim homeobox 9 (LHX9)* a *Wilms tumor 1 (WT1)* (Wilhelm & Englert 2002). Pomocí *in vitro* experimentů byla odhalena interakce WT1 se čtyřmi vazebnými místy (všechny obsahující motiv GTGGG) na promotoru genu *SF1* (Wilhelm & Englert 2002). Pomocí genů *WT1*, *SF1* a *GATA binding protein 4 (GATA4)* je aktivována exprese jednoho z nejvýznamnějších genů, *SRY*, který stanovuje determinaci varlat (Hossain *et al.*, 2001; Barbara *et al.*, 2001; Tevosian *et al.*, 2002).

Příčiny a důsledky poruch vývoje varlat jsou uspořádány dle časového spádu. Důvodem začlenění mutací genů do ontogenetického kontextu je zachování časové souslednosti, ve které jednotlivé geny působí a navození tak reálnější představy o celkovém dění během embryogeneze.

MALE SEX DETERMINATION



Obr. č. 4 Geny zapojené do určení samčího pohlaví: Na nediferencovanou gonádu působí faktory společné pro obě pohlaví (černě), diferenciaci do podoby testes určují samčí regulační geny v raném vývoji (modře), samičí regulační faktory naopak tlumí vývoj testes (růžově). (převzato z <http://www.endotext.org/>)

2.1 Změny během formování intermediálního mezodermu

2.1.1 PAX2

Gen *Paired box 2* (*PAX2*) (10q24) odhalil zajímavý fakt, a to, že formování gonád a Wolfovy trubice jsou dva nezávislé procesy, pobíhající pod vlivem různých faktorů (Torres *et al.*, 1995).

Pozorované mutace v tomto genu mají za následek malformace ve vývoji ledvin, očí a středního ucha (Sanyanusin *et al.*, 1995; Dehbi *et al.*, 1996; Tellier *et al.*, 2000). Jeho exprese je snížena při poruše *WT1*, což vede k Wilmsovu tumoru (viz níže), narušení vývoje urogenitálního systému a Denys-Dashovu syndromu, projevující se pseudohermafroditismem, mesangiální sklerózou ledvin (Yang *et al.*, 1999).

2.1.2 *EMX2*

Empty spiracles homeobox 2 (10q26.1) je lidský homolog genu „empty spiracles“ (*ems*) u modelového organismu *Drosophila melanogaster*. Jeho exprese je mimo epitel vyvíjejícího se urogenitálního systému patrná také v dorzální části *telencefala* (Yoshida *et al.*, 1997).

U homozygotně mutovaného myšího modelu (*Emx2*^{-/-}) je znemožněn vývoj gonády i ledvin. Mláďata tak umírají do několika hodin od narození (Pellegrini *et al.*, 1996; Miyamoto *et al.*, 1997). Poškození genu *EMX2* se považovalo za možnou příčinu Kalmannova syndromu nebo vrozeného poškození „idiopathic hypogonadotropic hypogonadism“. Kalmanův syndrom se projevuje sníženou produkcí pohlavních hormonů způsobenou nedostatkem hormonu uvolňující gonadotropin (GnRH). Rozsáhlá studie sekvenace genu u pacientů s těmito chorobami však zmíněné podezření nepotvrdili (Taylor *et al.*, 1999).

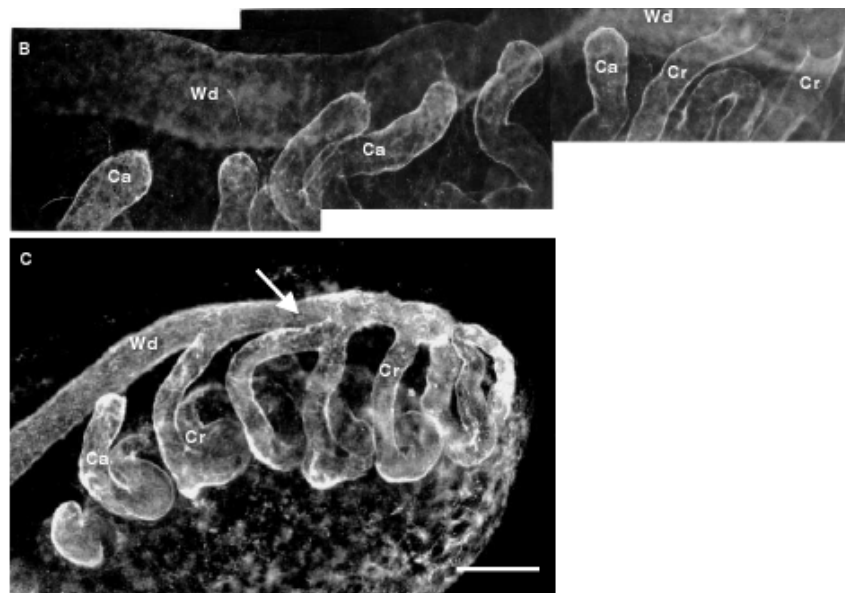
2.2 *Poruchy při utváření urogenitální rýhy*

2.2.1 *WT1*

Gen *Wilms tumor 1* (*WT1*) je přepisován v podobě deseti exonů. Produktem genu je transkripční faktor se čtyřmi „zinc-finger“ motivy na C-konci a DNA vazebnou doménou na N-konci proteinu. Protein *WT1* se díky alternativnímu sestřihu vyskytuje v buňce ve čtyřech formách. Obzvláště zajímavé jsou formy +KTS a méně častá ale významnější forma -KTS, která se účastní vývoje gonád (Haber *et al.*, 1991).

Jeden z prvních genů, které můžeme v prekurzoru gonády zaznamenat je *WT1* (11p13) (Armstrong *et al.*, 1993). Produkt genu je jaderný protein, významný především u dělících se buněk. Ve zdravé gonádě pravděpodobně působí jako supresor rakovinového bujení. Jeho činnost se později dostává pod kontrolu *SRY* (Bradford *et al.*, 2009). Zkratka WT, Wilms' tumor, označuje také nemoc, projevující se nádorovým bujením v oblasti ledvin poprvé popsané M. Wilmsem roku 1899.

Ztráta sestřihové formy +KTS bývá příčinou Wilmsova syndromu (asi u 15 - 20 % případů). Snížená exprese +KTS formy se může projevit také jako Frasierův syndrom, kdy u pacientů kompletně selhává vývoj gonád a vyvíjí se ženský fenotyp (Bradford *et al.*, 2009). Další nemoci, jejímž viníkem je také mutace *WT1*, jsou WAGR syndrom neboli Denysův-Drashův syndrom, Mesangial sclerosis (porucha ve vývoji ledvin, smrtelná do 1. roku dítěte).



Obr. č.5 Charakteristika dvou souborů myších mezonefrických kanálků v raném vývoji. Ke zviditelnění struktur byla použita whole-mount imunohistochemie s protilátkou proti lamininu. : (Wd) Wolfova trubice, (Cr) kraniální mezonefrické kanálky, (Ca) kaudální mezonefrické kanálky. (převzato z Sainio *et al.*, 1997).

U mutanta *WT1*^{-/-} na myším modelu pozorujeme rozdílné chování mezonefrických kanálků (obr. č. 5). V kraniální oblasti se kanálky řádně připojují k Wolfově trubici, kdežto v kaudální části k připojení nedochází. Můžeme tak usuzovat na dvojitý mechanismus tvorby připojení kanálků k vývodu (Sainio *et al.*, 1997).

Mimo poruchy ve vývoji gonád, zasahuje *WT1* také diferenciaci ve vývoji ledvin, sleziny, nadledvin a srdce.

2.2.2 *LHX9*

Lim homeobox 9 (LHX9) (1q31.1) patří do rodiny LIM homeoboxu transkripčních faktorů exprimujících se během embryonálního vývoje. Mimo jiné můžeme mRNA genu *LIM homeobox 9* najít i ve tkáni formující urogenitální rýhu (Retaux *et al.*, 1999). Jedna forma *LHX9* je přepisována do šesti exonů o velikosti 10kb, druhý možný transkript (*LHX9* alfa) je podroben alternativnímu sestřihu v exonu 5 (Failli *et al.*, 2000). Protein obsahuje mimo homeodoménu také dvě na cystein bohaté zinek vázající LIM domény, zahrnuté do protein-proteinových interakcí. Stejně jako *WT1* se *LHX9* váže přímo na promotor genu *SF1* (do evolučně konzervovaného místa TAACAA) a je tedy dalším z faktorů spouštějících jeho expresi (Wilhelm & Englert, 2002). Jedná se o vysoce konzervovaný gen, až 98% podobnosti s myším homologem (Ottolengi *et al.*, 2001).

Není známo příliš mnoho poruch tohoto genu spojeného s poruchou vývoje pohlaví. V roce

2000 se objevil případ myši s chybějícím genem *Lhx9*, které postrádaly diferencované somatické buňky uvnitř gonády. Orgán nenabýval správného tvaru a pokulhával i v sekreci hormonů (AMH, testosteron). Fenotypově byli všichni jedinci s touto poruchou samice. Za povšimnutí stojí také pozorované současné snížené exprese genu *Sf1*, který tak patrně leží ve vývojové kaskádě pod *Lhx9* (Birk *et al.*, 2000).

O genu *Lhx9* bylo uvažováno jako o možné příčině změně pohlaví u několika psů s karyotypem 78, XX bez přítomnosti genu *SRY* (Melniczek *et al.*, 1999). Avšak tato souvislost nebyla prokázána (Pujar *et al.*, 2005).

Mnoho malých pojitků nás tedy vede k závěru, že LHX9 je pohlavně specifický gen i u člověka, i když o tom zatím nejsou přímé důkazy (Ottolenghi *et al.*, 2001).

2.2.3 *SF1*

Steroidogenní faktor 1 (*SF1*) nebo-li *NR5A1* (NE11q13) (9q33) je významný jaderný receptor mnoha genů specifických pro gonády. Produktem tohoto genu je sestřihový faktor rozpoznávající sekvence v místě větvení intronu na pre-mRNA molekule v jádře buňky. Jeho exprese se spouští již v brzkých fázích vývoje gonády, ale u mužských žláz přetrvává po celou dobu diferenciaci. Jako názorná ukázka slouží kooperace s transkripčním faktorem *SRY*, kdy společně spouští prepis genu *SOX9* a poté se komplex *SF1/SOX9* váže znovu na *enhancer* genu *SOX9* a udržuje tak vlastní expresi i poté, co se *SRY* vytratí (Sekido *et al.*, 2008). Nezbytnost *SF1* dokázali studie s cíleným porušením tohoto genu u myši, které způsobilo zastavení vývoje nadledvin i genitální rýhy (Luo *et al.* 1994).

U jedince s karyotypem 46, XY a heterozygotní mutací (p.G35E/wt), která má vliv na aminokyseliny účastnící se vazby k DNA, došlo ke zvratu pohlaví, zastavení vývoje nadledvin a přetrvání Müllerových trubic (Achermann *et al.*, 1999).

Homozygotní mutace (p.R92Q/R92Q) v oblasti A-boxu sekundární DNA-vazebné domény příliš stabilizuje vazbu *SF1* na DNA a u postiženého jedince bylo pozorováno zastavení vývoje gonád (Achermann *et al.*, 2002).

Další známý případ mutace v *SF1* je ztráta osmi bazických párů (8bp del/wt). Překládanému proteinu tak chybí AF2 strana, která se spolupodílí na vazbě k DNA. Postižený jedinec neměl vyvinuté gonády, ale jeho nadledviny vykazovaly správnou činnost (Correa *et al.*, 2004).

Zajímavý případ je také u pacienta 46, XY s heterozygotní mutací (p.C16X/wt), která způsobí předčasné ukončení translace, a tím i ztrátu smyslu proteinu. Pozorujeme normální funkci nadledvin, ale porušení vývoje gonád (Mallet *et al.*, 2004).

Další mutace odhalil výzkum (Kohler *et al.*, 2008) u pěti pacientů 46, XY s ženským fenotypem. Jedná se o tři substituce (p.C33S), (p.R84H), (p.Y138X) a dvě duplikace (c.1277 dupT), (c.424_427 dupCCCA + p.G146A polymorfismus). Výsledkem těchto mutací je sice nízká hladina androgenů (mužských pohlavních hormonů) způsobují přetrvání Müllerových chodeb a vytvoření ženských zevních pohlavních orgánů, ale bez selhání nadledvin.

2.2.4 *DAX1*

DAX1 (*dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1*) nebo také NR0B1 (Xp21.3) je významný spíše pro vývoj samičích pohlavních žláz, neboť působí antagonisticky proti genu *SRY*. Jeho exprese je patrná v genitální rýze okolo 33. dne po ovulaci (dpo) a v nízké hladině přetrvává v kůře nadledvin a ve varleti i během diferenciaci gonády (Hanley *et al.*, 2000). Vliv *DAX1* na vývoj je přímo úměrný množství, ve kterém je exprimován. Duplikace tohoto genu je u pacientů s genotypem 46, XY spojena se změnou pohlaví (Bardoni *et al.*, 1994; Zanaria *et al.*, 1994). Porušení *DAX1* vede k adrenální hypoplazii (neúplné vyvinutí nadledvin) (Muscatelli *et al.*, 1994; Reutens *et al.*, 1999).

2.2.5 *GATA4*

GATA4, lokalizován na chromozómu 8 (8p23.1-p22) patří do GATA rodiny transkripčních faktorů. Tyto transkripční faktory rozpoznávají GATA motiv v promotoru mnoha genů, na jejichž regulaci se tak podílí, mj. i u genů *AMH* nebo *SRY* (Trevosian *et al.*, 2002).

Nalezená heterozygotní mutace p.Gly221Arg v N-terminální zinc finger doméně je asociovaná s 46, XY DSD (*disorders of sex development*). Způsobuje nejednoznačné ustanovení pohlaví při narození, srdeční vady a další poruchy. Je zajímavé, že i přes tento defekt, je protein *GATA4* schopný interagovat s promotorem *AMH* (Lourenco *et al.*, 2011).

2.2.6 *CBX2*

Chromobox homolog 2 (*CBX2*) (17q25.3) je součástí polycomb multiproteinového komplexu, jež je nezbytný k umlčování transkripce mnoha genů (včetně Hox genů) napříč embryonálním vývojem. Děje se tak pomocí remodelace chromatinu a modifikace histonů.

Před dvěma lety byl popsán pacient s karyotypem 46, XY, jenž měl po narození vyvinutá ovaria i s folikuly, dělohu i vnější genitálem. Sekvenování odhalilo dvě heterozygotní mutace v genu *CBX2* (c.C293T; c.G1370C), obě v exonu 5, což vedlo k záměnám P98L a R443P v proteinu.

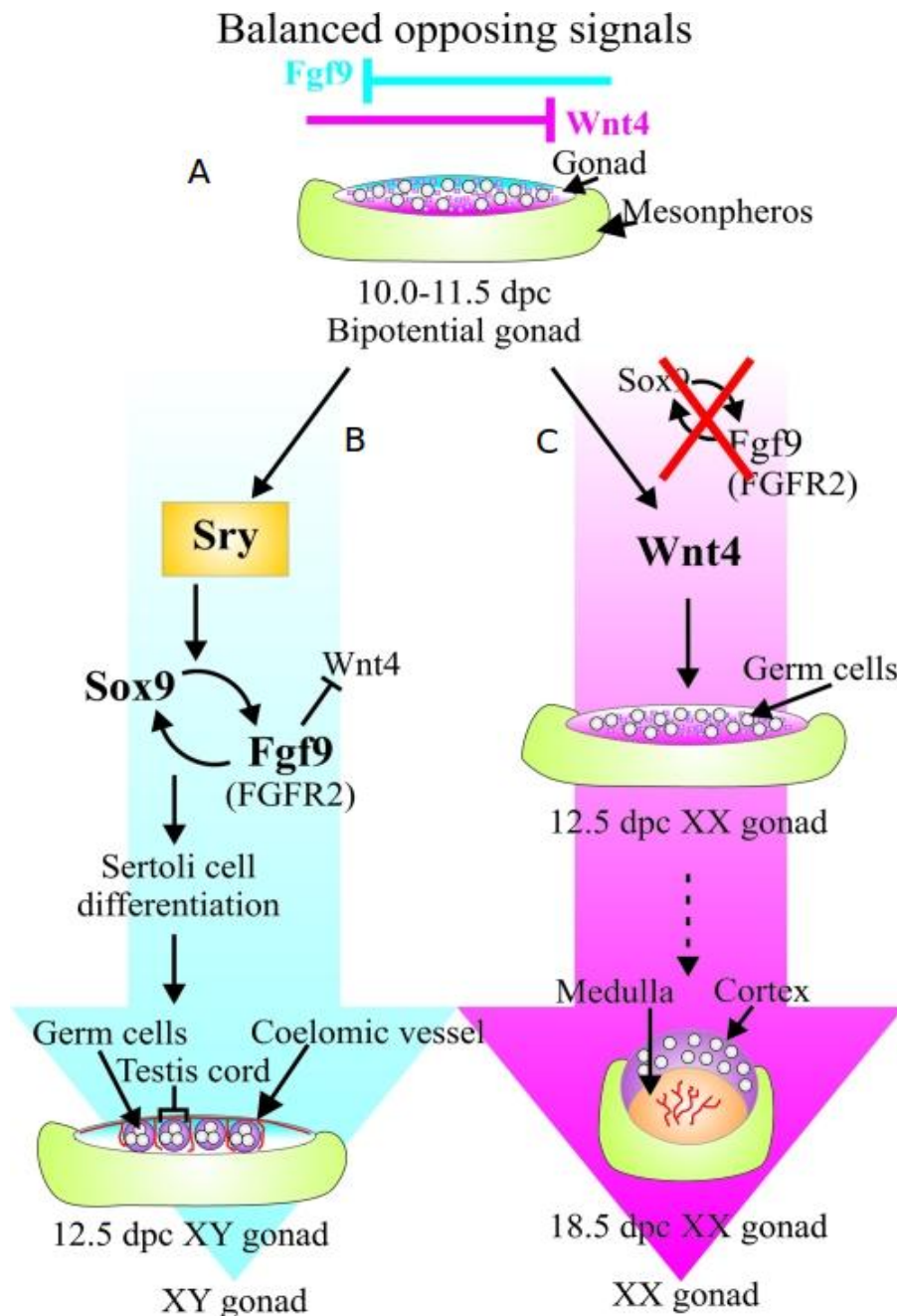
Můžeme se tudíž domnívat, že CBX2 ovlivňuje diferenciaci pohlaví pomocí regulace SRY buďto přímo nebo prostřednictvím jiných regulačních faktorů (Biaison-Lauber *et al.*, 2009).

3 Mutace ovlivňující diferenciační stádium vývoje varlat

Aby se z indiferentního orgánu vytvořila varlata, je třeba do vývojového procesu zapojit další, doposud mlčící geny. Hlavním aktivátorem je *SRY*, situovaný na Y chromozómu. Jeho exprese dosahuje nejvyšších hodnot během 6. týdne vývoje, kdy spouští transkripci genu *sex determining region Y - box 9 (SOX9)*, který je spřažen v pozitivní zpětné smyčce s *fibroblast growth factor 9 (FGF9)* a *fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)* (obr. č. 6). Dále se spouští kaskáda regulačních genů jako jsou *alpha thalassemia/retardation syndrome X-linked (ATRX)*, *chromobox homolog 2 (CBX2)*, *doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1)*, *desert hedgehog (DHH)* a mnohých dalších.

Zvýšení množství těchto regulačních faktorů vede k diferenciaci prvního pozorovatelného typu buněk, Sertoliho buněk. Zatím jsou rozptýlené a neuspořádané, nazýváme je tedy pre-Sertoliho buňky. Během dozrávání se formují do kanálků ve vnitřní části gonády (*medulla*), zatímco povrchová část (*cortex*) atrofuje. Pozorovatelné jsou také další proudy buněk z mesonefros směřující do žlázy, ze kterých se diferencují různé buněčné typy. Leydigovy buňky produkující androgeny se seskupují poblíž kapilár kvůli snadnějšímu přenosu jejich sekretů do krve, peritubulární svalové buňky mají částečně stavební funkci a také napomáhají zralým spermii opustit semenotvorné kanálky a v neposlední řadě buňky endotelu, které vystylají cévy. Žlázy v této době nabírají na objemu a jsou již dobře patrné.

Mutace, které postihují výše zmíněné geny, již nemají velký vliv na utváření močových cest či ledvin, zato pro vývoj *testes* jsou zcela nezbytné. Poškození některého z genů zpravidla zastaví diferenciaci nebo přímo znemožní její zahájení. Následující vývoj gonády pak ustává a jedinec se rodí s částečnou nebo úplnou poruchou vývoje pohlaví nebo se navodí vývoj samičích pohlavních žláz. Jedinci s karyotypem 46, XY a samičím pohlavním ústrojím jsou ovšem často sterilní, přestože se mohou z vnějšku jevit zcela zdravě.



Obr. č. 6 **Regulace ustanovení pohlaví v indifentní gonádě:** (A) *Fgf* je detekován na povrchu gonády, kdežto *Wnt4* (*wingless-type MMTV integration site family*) poblíž hranice gonády a mezonefros, tyto dva transkripty spolu kompetují; (B) Vývoj XY gonády: spuštěním *Sry* se aktivuje dráha pro vývoj samčích gonády. Dále se exprimuje *Sox9* a *Fgf9*, který přes receptor *FGFR2* udržuje tento přepis pozitivní zpětnou vazbou. Gen *Wnt4* je umlčený. (C) Vývoj XX gonády: Nepřítomnost aktivačního impulsu způsobuje nízkou expresi *Sox9* i *Fgf9*, která dovoluje zvýšení transkripce genu *Wnt4*, který naopak umlčuje přepis *Fgf9* a zahajuje vývoj samičích pohlavních žláz. Uvedené časové údaje platí pro myš *modelový organismus*. (převzato z Cotton *et al.*, 2008)

3.1 Ovlivnění časné fáze determinace vývoje samčích gonád

3.1.1 SRY

Sex determining region Y (SRY) (Yp11.3) má v diferenciaci *testes* klíčovou roli. Byl objeven před 21 lety jako hlavní aktivátor diferenciaci samčích pohlavních žláz (Sinclair *et al.*, 1990). Je lokalizován na distální části krátkého raménka chromozómu Y. V jeho sekvenci je přítomen homeobox, sekvence 180 párů bazí (bp), jež má schopnost vázat se a ohýbat DNA. To naznačuje, že se jedná o regulátor transkripce. Jeho exprese zahajuje diferenciaci samčí gonády u většiny savců.

Z evolučního pohledu, gen *Sry* převzal svou funkci teprve nedávno. Tato událost je odhadována přibližně do doby oddělení linií živorodých (*Theria*) a ptakořitných (*Monotremata*), tedy před 166 mil. lety (Wallis *et al.*, 2008). Nasvědčují tomu i data ze studií na některých výjimečných zástupcích savců. Jsou známy druhy, u kterých se sekvence podobná genu *Sry* vyskytuje na jiném lokusu v genomu, například u ptakopyska podivného (*Ornithorhynchus anatinus*) nebo ježury australské (*Tachyglossus aculeatus*) (Foster *et al.*, 1994; Wallis *et al.*, 2007). Zajímavá je také situace u slepušky pontské (*Ellobius lutescens*), slepušky východní (*Ellobius tancrei*) a krysy japonské (*Tokudaia osimensis*), u kterých *Sry* chybí (Just *et al.*, 1995; Sutou *et al.*, 2001). Možným kandidátem pro původní verzi genu *Sry* by mohl být *Sox3* (Xq27.1) (Foster *et al.*, 1994). K této domněnce vede, mimo jiné, případ, kdy umělé zvýšení exprese *Sox3* u myšího zárodku spustilo diferenciaci *testes*. Je tudíž pravděpodobné, že gen *Sry* je evoluční novinkou, která vznikla kaskádou mutací z původní sekvence genu *Sox3* (Sutton *et al.*, 2011).

Většina mutací nalezených v genu *SRY* se nachází uvnitř homeoboxové sekvence. Tato skutečnost zdůrazňuje zásadní a zároveň kritickou roli domény homeoboxu. (Shahid *et al.*, 2004).

Od doby, kdy byl *SRY* objeven a prohlášen za základní determinační faktor vývoje *testes*, byl proveden nespočet studií hledajících mutace v tomto genu. 20% případů narušení vývoje pohlaví je způsobeno poškozením genu *SRY* (Hawkins *et al.*, 1992). Jmenuji zde pouze některé z nich.

Mezi pacienty s karyotypem 46, XY a vyvinutým ženským pohlavím byla odhalena substituce A681G vedoucí ke záměně glycinu za serin na pozici 91 v proteinu. Tuto mutaci sdílel i otec pacienta, ale pouze v jednom z vláken DNA. Jiná tranzice, C784T vedoucí k P125L v doméně homeoboxu, se vyskytovala u tří sester. I otec těchto dětí vykazoval mozaikový genotyp (Schmitt-Ney *et al.*, 1995). Podobný případ pacientky s částečnou poruchou vývoje gonád (PGD) a jejího zdravého otce a bratrů, kteří nesou substituční mutaci (G→A) na pozici 2128 *upstream* od 5' hranice homeoboxu, která vede k substituci S18N (Domenice *et al.*, 1998).

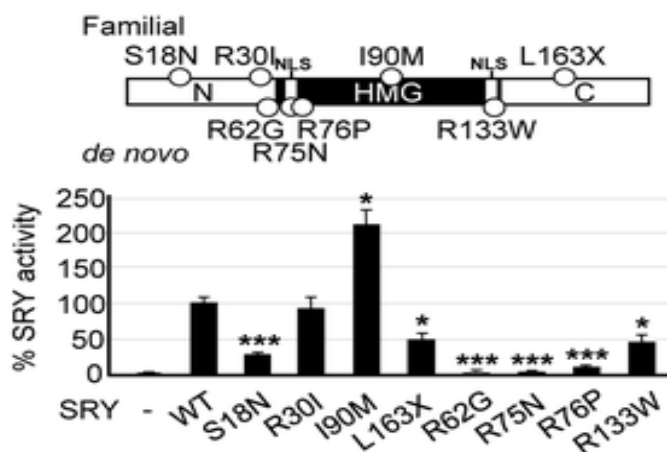
V případě záměny Q57R (způsobené tranzicí A→G) se do blízkosti homeodomény dostává

polární aminokyselina arginin ($pK_a = 12,5$), která může znemožnit přesun proteinu do jádra a ovlivnit tak genovou expresi. Ze dvou popsaných pacientů, první vykazoval kompletní ženský fenotyp a narušení proliferace zárodečných buněk. U druhého byl částečně narušen sekundární pohlavní vývoj. Oběma pacientům se nedostavila menstruace (primární amenorea) (Shahid *et al.*, 2004). Obdobná porucha ve funkci proteinu byla popsána u pacienta 46, XY s narušením vývoje gonád, jehož protein SRY nesl substituci v 70. kodónu, která způsobila W70L mutaci. Pozměněný protein vykazuje o 50% menší akumulaci v jádře oproti divokému typu. U pacienta se v pozdějším věku projevil gonadoblastom (zhoubný nádor pohlavních žláz) (Hersmus *et al.*, 2009).

Mezi nejvíce postihující mutace patří inserce a delece. Inserce adeninu do pozice 265 vedla k posunutí čtecího rámce (*frameshift mutation*), což způsobilo ukončení translace na 103. kodónu (nt 265 insA Stop103). Postižený jedinec s ženským fenotypem a karyotypem 46, XY má porušen gonadální vývoj, primární amenoreu, absenci sekundárních pohlavních znaků a další. V gonádě nejsou známky testikulární tkáně (Salehi *et al.*, 2006).

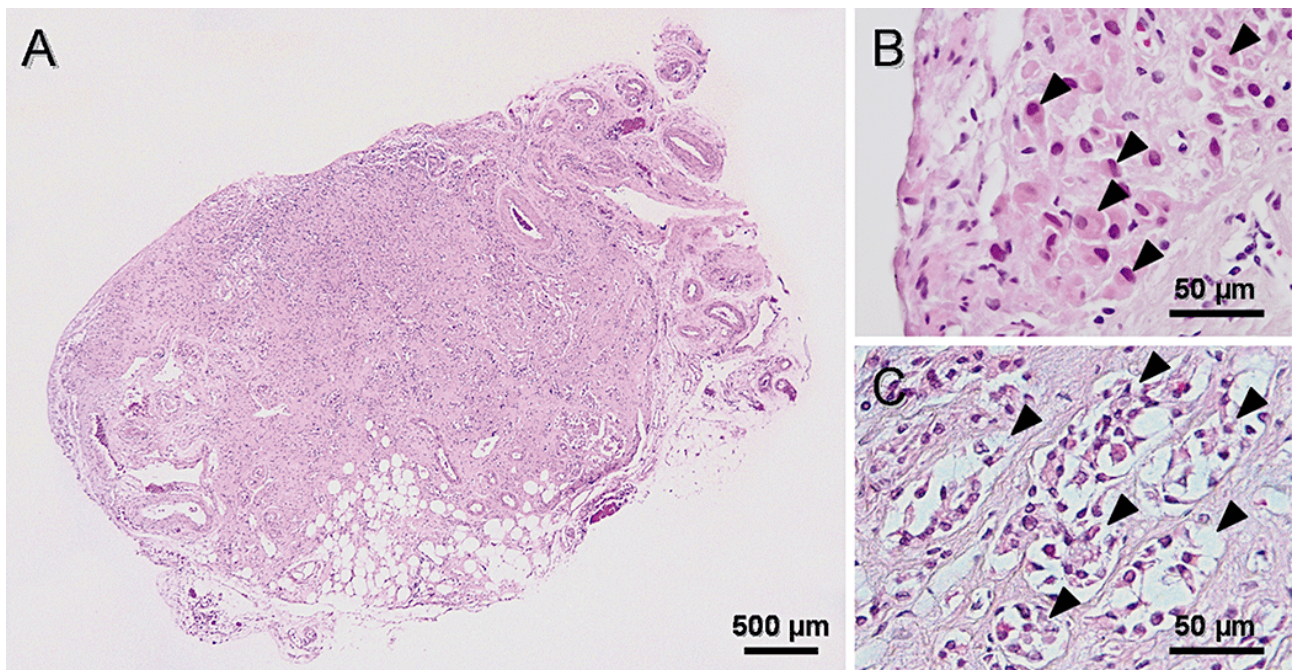
Velmi zajímavá je substituce aminokyseliny na 90. pozici (I90M), která způsobuje signifikantní zvýšení aktivace faktoru *human homologous SOX9 testis-specific enhancer (hTES)* oproti divokému typu (Knower *et al.*, 2011). *hTES* je významný regulátor exprese genů *SRY*, *SOX9* a *SFI*. Aktivita proteinu je porovnávána s divokým typem a jinými zkoumanými mutacemi (obr. č. 7).

SRY mutations in XY gonadal dysgenesis



Obr. č. 7 **Mutace SRY**: Lokalizace mutace I90M; (převzato z Knower *et al.*, 2011)

Byla také popsána pacientka s poruchou vývoje pohlaví s pericentrickou inverzí chromozómu Y, karyotyp 46, X, inv(Y) (p11.2 q11.2). Během vývoje došlo k prodloužení exprese *SRY*, což pravděpodobně mělo efekt i na ostatní geny, ovlivňované genem *SRY*. U pacientky byly při narození přítomny ženské vnější pohlavní orgány, v dospělosti však ovaria nebyla rozpoznatelná (obr. č. 8) (Mitsubishi *et al.*, 2010).



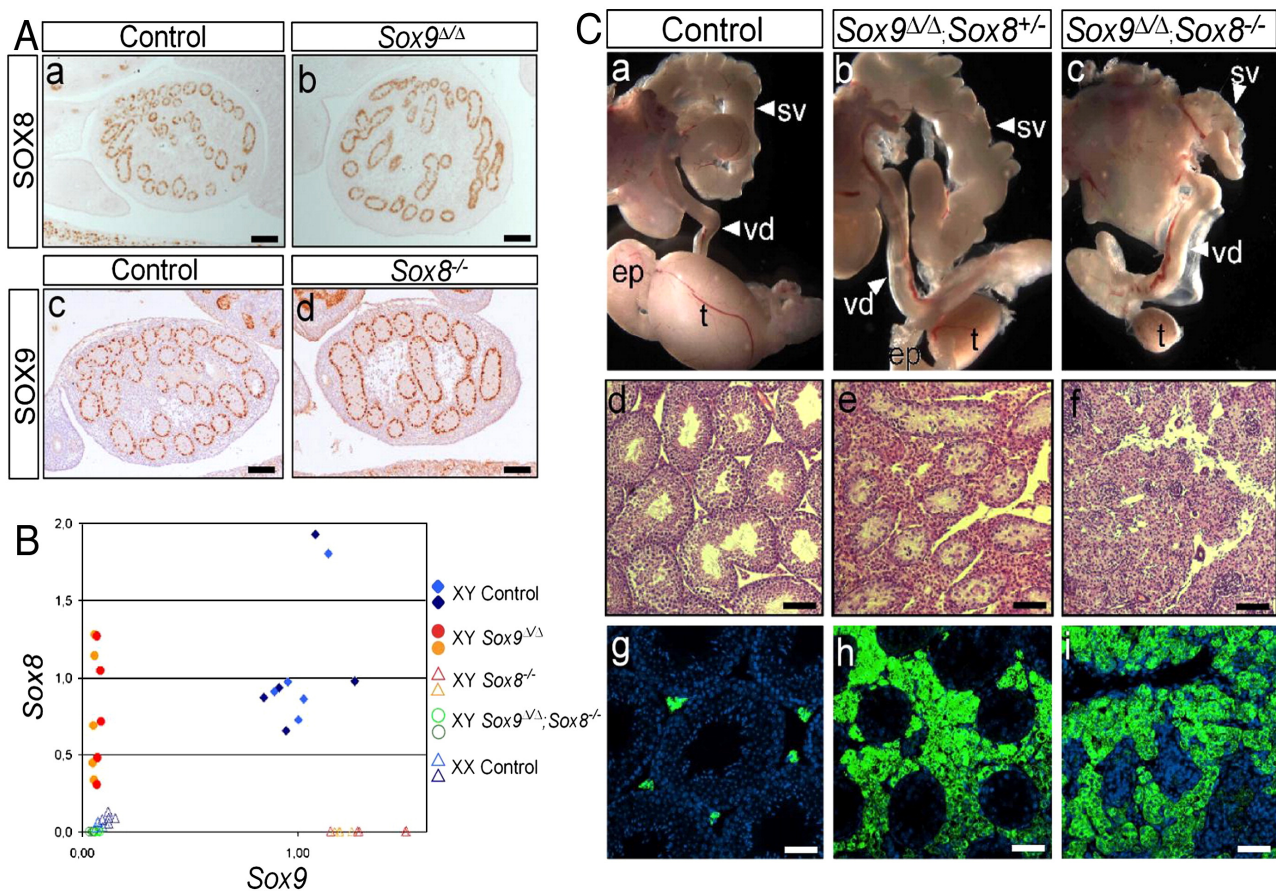
Obr. č. 8 Řez tkání gonády s vláknitým stroma bez známek diferenciace a bez zárodečných buněk: (A) histologický obrázek gonády pacientky, (B) Buňky podobné Leydigovým s eosinofilní cytoplazmou (značeny šipkami), (C) Formování struktur podobných kanálkům (značeny šipkami). (převzato z Mitsuhashi *et al.*, 2010)

3.1.2 SOX9

Poruchy v sekvenci genu *SOX9* (*SRY-related HMG box 9*) (17q24,1-25,1) jsou lékařům známy především ve spojitosti genetickou poruchou – karpodelická displázie. Onemocnění je charakterizováno malformacemi ve vývoji kostí, *tracheomalacia* (zúžení průdušnice), zvratem ve vývoji pohlaví a smrtí v dětském věku (Maroteaux *et al.*, 1971). Jeho transkripce se v gonádách zahajuje téměř ihned po expresi *SRY*. Společně s SF1 reguluje transkripci *AMH*.

Na myším modelu byla ukázána zajímavá skutečnost, že selhání buď genu *Sox9* nebo *Sox8* nezpůsobuje větší poruchu vývoje *testes*, ale mutant v obou těchto genech má *testes* atrofované. U jedinců s jedním mutovaným genem nastávají poruchy reprodukce v dospělosti. Oba geny spolu během vývoje neinteragují (obr. č. 9) (Barrionuevo *et al.*, 2009).

Největší zásah do proteinu způsobují mutace uvnitř domény homeoboxu. Jednou z takových je i substituce G472A (A158T v proteinu), která nemá vliv na terciální strukturu proteinu, ale přesto snižuje aktivitu proteinu, schopnost importu SOX9 do jádra a mění jeho DNA vazebné schopnosti. Tato mutace patrně způsobila u pacientky s karyotypem 46, XY zvrát ve vývoji pohlaví (Preiss *et al.*, 2001). Ke karpodelické dysplazii doprovázející zvrát ve vývoji pohlaví, vedou různé mutace. Dokazuje to i případ dítěte (46, XY) se substitucí Q401X (Stoeva *et al.*, 2011).



Obr. č. 9 Zapojení genů *Sox9* a *Sox8* do vývoje testes: (A) Imunohistochemie ukazuje, že u barvení *Sox8* mezi mutantním fenotypem *Sox9* Δ/Δ (b) a kontrolou (a) není rozdíl. Stejně tak se neliší ani barevná *Sox9* mezi *Sox8* $^{-/-}$ (d) a kontrolou (c) (stádium E15,5). (B) RT-PCR expresní analýza pro *Sox8* a *Sox9* kontrolní a mutované gonády. Úroveň transkripce neukazuje signifikantní pokles. (C) Fenotyp reprodukčních vývodů (a-c), histologie gonády (barveno hematoxylin/eosin) (d-f) a inkubování s protilátkou P450SCC (g-i) u genů *Sox9*, *Sox8* dvojitého mutantu a kontroly (ve 2 měsících). Kontrola vykazuje normální morfologii kanálků, mutantní testes naopak kanálky postrádají a obsahují vysoký poměr Leydigových buněk (zeleně) (g-i). (ep) epididymis, (sv) semenný váček, (t) testis, (vd) vas deferens. Měřítka: (A) 100 μ m, (C:d-f) 50 μ m, (C:g-i) 25 μ m. (převzato z Barrionuevo *et al.*, 2009)

3.1.3 FGF9

Fibroblast growth factor (FGF9) (13q11-13) patří do rodiny proteinů významně zasahujících do procesu proliferace a diferenciaci buněk. FGF9 se účastní proliferace prekurzorů Sertolihových buněk a stimulace jejich diferenciaci v rané fázi vývoje (Smahl *et al.*, 2004). K tomu potřebuje určité komponenty mezibuněčné hmoty jako např. HSPG (*heparan sulphate proteoglycan*), polysacharid, který se nachází ve všech živočišných tkáních a který formuje komplex FGF9 a FGFR2 (Yayon *et al.*, 1991). FGF9 zprostředkovává přesun buněk intermediálního mezodermu (původně tvořících mesonefros) do gonády (Yoshioka *et al.*, 2005). I když je exprese tohoto růstového faktoru typická pro raný vývoj, u myši se mRNA pro protein Fgf9 a isoformy Fgfr (Fgfr2IIIc, Fgfr3 and Fgfr4)

objevuje i v postnatálním vývoji v Leydigových buňkách, kde se spolupodílí na sekreci testosteronu. Také u člověka je tedy možné očekávat jeho aktivitu v postnatálním vývoji varlat, a tedy i poruchy jím způsobené (Lin *et al.*, 2010).

Nepřítomnost genu *FGF9* vede k blokování vývoje varlat a projevení fenotypu druhého pohlaví (Schmahl *et al.*, 2004). Při zastavení diferenciaci Sertoliho buněk blokováním *Wt1* (+KTS) u kultury z myši XY gonády se objeví také ztráta exprese genů *Sox9* a *Fgf9*, hlavních transkripčních faktorů genu *Amh* (Bradford *et al.*, 2009).

3.2 Ovlivnění pozdní fáze determinace vývoje samčích gonád

3.2.1 AMH

Funkcí antimüllerova hormonu (*AMH*) (19q13.2), jak sám název tohoto hormonu napovídá, je degradovat prekuzory samičích pohlavních cest - Müllerovy chodby a Wolfovým cestám tak nechat prostor pro stabilizaci a diferenciaci.

Transverze G2096T v 5. exonu genu *AMH* způsobuje záměnu tripletu GAA (Glu) za stop kodón, což vede ke zkrácení proteinu o 178 aminokyselin. Mutace je asociována se syndromem přetrvávajících Müllerových chodeb, zachování dělohy (*uterus*) a jiných derivátů Müllerových chodeb u samců (Knebelmann *et al.*, 1991). Stejný fenotyp se projevuje i u mutací receptoru vázající *AMH* (*AMHR*).

3.2.2 TSPYL

Testis-specific protein, Y-encoded-like 1 (*TSPYL1*) (6q22-q23) se translatuje jako pouze jediný exon. Je exprimován již v časně fázi embryonálního vývoje a to ve všech tkáních, zkoumaných týmem berlínských vědců. Dále se uvažuje, díky absenci intronů, o vzniku tohoto genu jako o staré retropoziční události (Vogel *et al.*, 1998). Zatím málo prozkoumaný protein (z rodiny *TSPY-SET-NAP1L1*) se mimo jiné skládá z evolučně velmi konzervované *NAP* domény, která interaguje s cyklinem B více než s ostatními cykliny (Kellogg *et al.*, 1995). Je aktivní nejen v pohlavních žlázách plodu, ale také v jeho mozku (Puffenberger *et al.*, 2004).

Syndrom *SIDDT* (*sudden infant death with dysgenesis of the testes syndrome*) je spojován s mutací způsobující ztrátu smyslu v genu *TSPYL1*. Syndrom končí náhlou a nevysvětlitelnou smrtí

novorozence. Avšak tento vztah nebyl zcela potvrzen (Hering *et al.*, 2006).

Podle pozdějších pozorování je zřejmé, že gen *TSPYL* jistě hraje ve vývoji varlat svou roli a přispívá k anomáliím, které u vývoje varlat pozorujeme na pacientech s DSD. Náhrada glutaminu za histidin v pozici 82 (c.264G→C, p.Q82H) a ani alaninu za valin v pozici 282 (c.845C→T, p.A282V) pravděpodobně nemá na funkci proteinu žádný vliv. Nicméně u jedince 46,XY s ženským fenotypem a primární amenorrheou (absence první menstruace) byla nalezena heterozygotní záměna (c.960A→G, p.K320R) opět v NAP doméně. Jelikož tato mutace nebyla v populaci nalezena, patrně se jedná o mutaci *de novo*. Další mutace v tomto genu (c.266G→A, p.R89H) vyvolává azospermii (nízký počet spermií vedoucí k neplodnosti) (Vinci *et al.*, 2009). U jedinců se syndromem SIDDT se na 153. kodónu našla posunová mutace (457_458insG) v homozygotním stavu, která způsobuje předčasné ukončení translace na 169. kodónu. Díky tomuto zkrácení evolučně staré domény protein ztrácí schopnost vázat se na nukleozóm, a tak i své umístění v jádře. U dalšího zkoumaného genu *TSPYL4* nebyla potvrzena souvislost s SIDDT (Puffenberger *et al.*, 2004).

3.2.3 *DMRT1* a *DMRT2*

Doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1) (9p24.3) kóduje protein s evolučně velmi konzervovanou doménou. Vyskytuje se i u mnoha prvoústých (*Protostomia*) jako jsou octomilky (*Drosophila*) nebo hlístice (*Nematoda*). Podobný motiv sdílí i *doublesex and mab-3 related transcription factor 2 (DMRT2)* ležící ve stejné oblasti genomu. Oba geny jsou spojovány s poruchami vývoje samčího pohlaví.

Částečná porucha vývoje pohlaví (narušená diferenciací vnějších genitálií) u jedince 46, XY byla pravděpodobně zapříčiněna inzercí thyminu do 3'UTR nepřekládané oblasti, 12 nukleotidů za stop kodónem. Tato oblast podléhá alternativnímu splicingu. Byla nalezena také heterozygotní substituce (T→A) v exonu 1, která způsobuje S45T záměnu v proteinu, pravděpodobně však nemá žádný biologický vliv na funkci proteinu (de Mello *et al.*, 2010).

Gen *DMRT1* má navíc zvláštní postavení mezi geny zapojujícími se do utváření pohlaví. Není exprimován pouze během embryonálního vývoje, ale také po dobu celého života. Mutantní myši *Dmrt1^{-/-}* se rodily s vyvinutými *testes*, ale v postnatálním období Sertoliho buňky začaly exprimovat *Foxl2* (transkripční faktor granulózniých buněk *ovaria*) namísto *Sox9*. Antagonismus mezi geny *Dmrt1* a *Foxl2* tak zřejmě přetrvává i během dospělosti a osud Sertoliho buněk zůstává plastický i po konečné diferenciaci (Matson *et al.*, 2011).

3.2.4 AR

Androgen receptor (AR) (Xq11-12) jsou jaderné receptory, na které se váží androgeny (testosteron, dihydrotestosteron) a aktivují je. Aktivní forma receptoru se váže na DNA a reguluje tak expresi genů (Mooradian *et al.*, 1987). Jsou přítomny i v jiných tkáních než pohlavních orgánech. Jsou nezbytné pro formování primárních i sekundárních pohlavních znaků.

Gen se skládá z 8 exonů. Jeho protein můžeme strukturně rozdělit na N-koncovou transaktivační doménu proteinu, centrální DNA vazebnou doménu a doménu vázající ligand, ale také různé proteiny. Exon1 kóduje celou N-koncovou doménu proteinu. V exonu1 se nachází dvě oblasti s polymorfními opakovanými motivy - CAG kódující glutamin a GGN kódující vždy glycin (Faber *et al.*, 1989).

Podle databáze na internetové stránce <http://www.androgendb.mcgill.ca/> je k dnešnímu datu známo necelých 1 000 mutací v genu pro AR. Poruchy genu androgen receptoru způsobují různé stupně syndromu necitlivosti buněk k hladině testosteronu v krvi a projeví se tak na výsledném fenotypu jedince. Počet repetitivních oblastí v exonu1 ovlivňuje funkčnost transaktivační domény. Snižuje se při velkém množství CAG opakování a při malém množství opakování GGN (Faber *et al.*, 1989, Gao *et al.*, 1996). Mutace C3693T v exonu7 na 859 pozici v ligand vázající doméně způsobí náhradu leucinu za fenylalanin (Singh *et al.*, 2006). A také mutace se ztrátou smyslu (2578C→T, L859F) v této doméně způsobí nahrazení leucinu fenylalaninem. Díky těmto změnám ztrácí receptor senzitivitu k ligandům (androgenům). Porucha se projevuje jako *androgen insensitivity syndrom*, dochází k částečnému nebo úplnému zvratu ve vývoji pohlaví (Rajender *et al.*, 2007).

4 Další geny ovlivňující vývoj *testes*

V následujícím výčtu jsou uvedeny další významné geny účastníci se embryonálního vývoje *testes* u člověka. Z prostorových omezení jejich vliv na vývoj uvádím pouze formou tabulky.

Název genu	Lokalizace	Funkce	Projev poruchy	Zdroj
<i>AMHR2</i>	12q13	Receptor	Syndrom perzistujícího ductus Mülleri	Hoshiya <i>et al.</i> , 2003
<i>ARX</i>	Xp21.3	Transkripční faktor	Lisencefalie vázaná na X chromozóm s abnormálními genitáliemi	Kato <i>et al.</i> , 2004
<i>ATRX</i>	Xq13	Protein remodelující chromatin	α talasémie	Gibbons <i>et al.</i> , 2003
<i>DAZL</i>	3p24.3	RNA-vazebný faktor	Poruchy spermatogeneze	Teng <i>et al.</i> , 2002
<i>DHH</i>	12q13.1	Signální faktor	Porušený vývoj gonád	Canto <i>et al.</i> , 2004
<i>FGFR2</i>	10q26	Transkripční faktor	Porušený vývoj gonád	Bagheri-Fam <i>et al.</i> , 2008
<i>HOXA10</i>	7p15.2	Transkripční faktor	Kryptorchizmus	Kolon <i>et al.</i> , 1999
<i>HOXA11</i>	7p15.2	Transkripční faktor	Kryptorchizmus	Yuan <i>et al.</i> , 2006
<i>INSL3</i>	19p13.2-p12	Signální faktor	Dysfunkce Leydigových buněk	Bay & Andersson 2011
<i>LGR8</i>	13q13.1	Receptor	Kryptorchizmus	Ferlin <i>et al.</i> , 2009
<i>MAP3K1</i>	5q11.2	Enzym	Porušený vývoj gonád	Pearlman <i>et al.</i> , 2010
<i>PDGFR α</i>	4q12	Receptor	Nádory varlat	Basciani <i>et al.</i> , 2002
<i>PGDS</i>	4q22.3	Enzym	Azoospermie (nedostatek spermií ve spermatu)	Welter <i>et al.</i> , 2011
<i>TCF21 (POD1)</i>	6q23-24	Transkripční faktor	Zvrat vývoje pohlaví u XY	Cui <i>et al.</i> , 2004
<i>VASA</i>	5p15.2-p13.1	Transkripční faktor	Neplodnost	Guo <i>et al.</i> , 2007

Tabulka č. 1 Další geny ovlivňující vývoj *testes* spolu s projevy jejich mutací

5 Závěr

Formování gonád je z ontogenetického pohledu nesmírně zajímavý proces. Utvoření indiferentního orgánu a následné dvě cesty (samčí a samičí) diferenciaci gonád jsou ojedinělé a nesamozřejmé vývojové i evoluční události. Vývoj pohlavních žláz a soustavy Wolfových nebo Müllerových chodeb navíc probíhá prakticky nezávisle na sobě.

Ke zkoumání těchto procesů se využívá dvou hlavních přístupů. Prvním z nich je vyhledávání jedinců s narušeným vývojem pohlavních žláz nebo celkového projevu změn pohlaví. Pomocí analýzy jejich genomu je možné odhalit možnou příčinu chybného vývoje na genové úrovni. Setkáváme se tak s běžně se vyskytujícími formami odchylek od normálního vývoje. Druhou variantou je cílené poškozování jednotlivých regulačních genů a pozorování a testování jejich projevů. Pro tuto metodu se využívá modelových organismů, především *Mus musculus*, *Xenopus leavis*, *Gallus gallus* a jiných. Další metodou používanou ke zkoumání vývojových procesů jsou *in vitro* experimenty, které mohou sloužit například k ověřování úlohy jednotlivých regulačních faktorů. Mutace, tedy poruchy v genech, tak pro vědce mají velkou výpovědní hodnotu. Je třeba však dbát na správnou interpretaci výsledků a obzvláště u přirozeně se vyskytujících poškození, která mohou být způsobena mnoha faktory, z nichž některé mohou zůstat skryty díky složitosti přírodních systémů i nedokonalostí technik, které jsou používány.

Ne u všech druhů probíhá vývoj pohlaví pomocí shodných mechanismů. Naopak jsme svědky široké škály determinantů vývoje od vnějších faktorů (teploty), přes zastoupení jednotlivých genů v genomu jedince (přítomnost *Sry*) až po specifické poměry množství exprimovaných genů (poměry X:Y chromozómů). Důležité informace tohoto typu stále chybí. Výzkum také komplikuje charakter některých mutací. Poškození genu, jež nese významnou roli během ontogeneze jedince, se může stát letální ještě předtím, než se jedinec stačí vyvinout a nejsou tak pozorovatelné.

Podle nedávných pozorování není ustanovení pohlaví během ontogeneze definitivní. Samčí a samičí regulační sítě udržují gonadální pohlaví ještě dlouhou dobu po volbě plodu mezi mužem a ženou. Regulační geny *Dmrt1* a *Foxl2* jsou evolučně velmi konzervované. Podobný mechanismus proto může způsobovat samovolnou změnu pohlaví v dospělosti při nedostatku jednoho z pohlaví u mnoha druhů ryb nebo obojživelníků.

Mutační změny jsou přirozeným jevem, který postihuje všechny informační molekuly. Ačkoli organismy investují mnoho energie do reparačních mechanismů, nemohou se zásahům do

DNA vyhnout úplně. Tendence bránit se je logická už proto, že většina zásahů do sekvencí genů má negativní vliv na strukturu či funkci proteinu. Není ale vyloučeno, že dojde k pozitivní mutaci, která naopak může strukturu či funkci proteinu vylepšit. Příkladem je substituce (I→M) na 90. pozici v proteinu SRY (Knower *et al.*, 2011).

Mutace a projevy, které je doprovází, jak u člověka tak na modelových organismech, jsou také velmi užitečným jevem, který nám dovoluje odhalit a pochopit složité procesy proliferace, diferenciaci a morfogeneze gonád. Volba člověka jako modelového druhu se potýká jak s časovými, tak i morálními omezeními a závazky. Nicméně člověk stále zůstává v popředí zájmu výzkumných týmů. Je nesmírně zajímavé vyhledávat přirozeně se objevující mutace a sledovat jejich následky na kvalitu života jedince. Sledují se tak přirozené poruchy dynamiky informačních molekul *in vivo*. Genové mutace jsou sice zdrojem variability pro přirozený výběr, ale jejich účinky jsou pro postiženého jedince jen málokdy výhodné.

O vývoji pohlaví stále víme velmi málo na to, abychom byli schopni tvrdit, že dokonale chápeme jakým způsobem je utvářeno, jak může být narušeno a jak konkrétní poškození opravit či jim dokonce předcházet.

6 Použitá literatura

- ACHERMANN, J. C., ITO, M., HINDMARSH, P. C. & JAMESON, J. L. (1999). A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nature Genetics* **22**, 125-126.
- ACHERMANN, J. C., OZISIK, G., ITO, M., ORUN, U. A., HARMANCI, K., GURAKAN, B. & JAMESON, J. L. (2002). Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**, 1829-1833.
- ARMSTRONG, J. F., PRITCHARD-JONES, K., BICKMORE, W. A., HASTIE, N. D. & BARD, J. B. (1993). The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* **40**, 85-97.
- BAGHERI-FAM, S., SIM, H., BERNARD, P., JAYAKODY, I., TAKETO, M. M., SCHERER, G. & HARLEY, V. R. (2008). Loss of Fgfr2 leads to partial XY sex reversal. *Developmental Biology* **314**, 71-83.
- BARATELLI, G. M., LANZANI, A. & SACCO, R. N. (2002). Biography of Enrico Sertoli. *Urology* **60**, 196-198.
- BARBARA, P. D., MEJEAN, C., MONIOT, B., MALCLES, M. H., BERTA, P. & BOIZET-BONHOURE, B. (2001). Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biology of Reproduction* **64**, 775-783.
- BARDONI, B., ZANARIA, E., GUIOLI, S., FLORIDIA, G., WORLEY, K. C., TONINI, G., FERRANTE, E., CHIUMELLO, G., MCCABE, E. R. B., FRACCARO, M., ZUFFARDI, O. & CAMERINO, G. (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genetics* **7**, 497-501.
- BARRIONUEVO, F., GEORG, I., SCHERTHAN, H., LECUREUIL, C., GUILLOU, F., WEGNER, M. & SCHERER, G. (2009). Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of Sox9 but fails in the combined absence of Sox9 and Sox8. *Developmental Biology* **327**, 301-312.
- BASCIANI, S., MARIANI, S., ARIZZI, M., ULISSE, S., RUCCI, N., JANNINI, E. A., DELLA ROCCA, C., MANICONE, A., CARANI, C., SPERA, G. & GNESSI, L. (2002). Expression of platelet-derived growth factor-A (PDGF-A), PDGF-B, and PDGF receptor-alpha and -beta during human testicular development and disease. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**, 2310-2319.
- BAY, K. & ANDERSSON, A. M. (2011). Human testicular insulin-like factor 3: in relation to development, reproductive hormones and andrological disorders. *International Journal of Andrology* **34**, 97-109.

- BIASON-LAUBER, A., KONRAD, D., MEYER, M., DEBEAUFORT, C. & SCHOENLE, E. J. (2009). Ovaries and Female Phenotype in a Girl with 46,XY Karyotype and Mutations in the CBX2 Gene. *American Journal of Human Genetics* **84**, 658-663.
- BIRK, O. S., CASIANO, D. E., WASSIF, C. A., COGLIATI, T., ZHAO, L. P., ZHAO, Y. G., GRINBERG, A., HUANG, S. P., KREIDBERG, J. A., PARKER, K. L., PORTER, F. D. & WESTPHAL, H. (2000). The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature* **403**, 909-913.
- BRADFORD, S. T., WILHELM, D., BANDIERA, R., VIDAL, V., SCHEDL, A. & KOOPMAN, P. (2009). A cell-autonomous role for WT1 in regulating Sry in vivo. *Human Molecular Genetics* **18**, 3429-3438.
- CANTO, P., SODERLUND, D., REYES, E. & MENDEZ, J. P. (2004). Mutations in the Desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 4480-4483.
- CARMONA, F. D., LUPIANEZ, D. G., MARTIN, J. E., BURGOS, M., JIMENEZ, R. & ZURITA, F. (2009). The spatio-temporal pattern of testis organogenesis in mammals - insights from the mole. *International Journal of Developmental Biology* **53**, 1035-1044.
- CORREA, R. V., DOMENICE, S., BINGHAM, N. C., BILLERBECK, A. E. C., RAINEY, W. E., PARKER, K. L. & MENDONCA, B. B. (2004). A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 1767-1772.
- COTTON, L. M., O'BRYAN, M. K. & HINTON, B. T. (2008). Cellular signaling by fibroblast growth factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction. *Endocrine Reviews* **29**, 193-216.
- CUI, S. Y., ROSS, A., STALLINGS, N., PARKER, K. L., CAPEL, B. & QUAGGIN, S. E. (2004). Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice. *Development* **131**, 4095-4105.
- DE MELLO, M. P., COELI, F. B., ASSUMPCAO, J. G., CASTRO, T. M., MACIEL-GUERRA, A. T., MARQUES-DE-FARIA, A. P., BAPTISTA, M. T. M. & GUERRA, G. (2010). Novel DMRT1 3' UTR+11insT mutation associated to XY partial gonadal dysgenesis. *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia* **54**, 749-753.
- DEHBI, M., GHAREMANI, M., LECHNER, M., DRESSLER, G. & PELLETIER, J. (1996). The paired-box transcription factor, PAX2, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Oncogene* **13**, 447-453.
- DOMENICE, S., NISHI, M. Y., BILLERBECK, A. E. C., LATRONICO, A. C., MEDEIROS, M. A., RUSSELL, A. J., VASS, K., CARVALHO, F. M., FRADE, E. M. C., ARNHOLD, I. J. P. & MENDONCA, B. B. (1998). A novel missense mutation (S18N) in the 5' non-HMG box region of the SRY gene in a patient with partial gonadal dysgenesis and his normal male relatives. *Human Genetics* **102**, 213-215.

- FABER, P. W., KUIPER, G., VANROOIJ, H. C. J., VANDERKORPUT, J., BRINKMANN, A. O. & TRAPMAN, J. (1989). The N-terminal domain of the human androgen receptor is encoded by one, large exon. *Molecular and Cellular Endocrinology* **61**, 257-262.
- FAILLI, V., ROGARD, M., MATTEI, M. G., VERNIER, P. & RETAUX, S. (2000). Lhx9 and Lhx9 alpha LIM-homeodomain factors: Genomic structure, expression patterns, chromosomal localization, and phylogenetic analysis. *Genomics* **64**, 307-317.
- FERLIN, A., ZUCCARELLO, D., GAROLLA, A., SELICE, R., VINANZI, C., GANZ, F., ZANON, G. F., ZUCCARELLO, B. & FORESTA, C. (2009). Mutations in INSL3 and RXFP2 Genes in Cryptorchid Boys. *Relaxin and Related Peptides: Fifth International Conference* **1160**, 213-214.
- FOSTER, J. W. & GRAVES, J. A. M. (1994). An SRY-related sequence on the marsupial x-chromosome - implications for the evolution of the mammalian testis-determining gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 1927-1931.
- GAO, T. S., MARCELLI, M. & MCPHAUL, M. J. (1996). Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **59**, 9-20.
- GIBBONS, R. J., PELLAGATTI, A., GARRICK, D., WOOD, W. G., MALIK, N., AYYUB, H., LANGFORD, C., BOULTWOOD, J., WAINSCOT, J. S. & HIGGS, D. R. (2003). Identification of acquired somatic mutations in the gene encoding chromatin-remodeling factor ATRX in the alpha-thalassemia myelodysplasia syndrome (ATMDS). *Nature Genetics* **34**, 446-449.
- GILBERT S.F. (2006). *Developmental Biology*. Eight Edition. *Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Publishers*.
- GRAY H. (2000). *Anatomy of the Human Body*. 20th U.S. Edition. *Philadelphia: Lea & Febiger, 1918*.
- GRISWOLD, M. D. (1995). Interactions between germ-cells and sertoli cells in the testis. *Biology of Reproduction* **52**, 211-216.
- GUO, X., GUI, Y. T., TANG, A. F., LU, L. H., GAO, X. & CAI, Z. M. (2007). Differential expression of VASA gene in ejaculated spermatozoa from normozoospermic men and patients with oligozoospermia. *Asian Journal of Andrology* **9**, 339-344.
- HABER, D. A., SOHN, R. L., BUCKLER, A. J., PELLETIER, J., CALL, K. M. & HOUSMAN, D. E. (1991). Alternative splicing and genomic structure of the wilms-tumor gene-WT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 9618-9622.
- HANLEY, N. A., HAGAN, D. M., CLEMENT-JONES, M., BALL, S. G., STRACHAN, T., SALAS-CORTES, L., McELREAVEY, K., LINDSAY, S., ROBSON, S., BULLEN, P., OSTRER, H. & WILSON, D. I. (2000). SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanisms of Development* **91**, 403-407.

- HAWKINS, J. R., TAYLOR, A., GOODFELLOW, P. N., MIGEON, C. J., SMITH, K. D. & BERKOVITZ, G. D. (1992). Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal-dysgenesis. *American Journal of Human Genetics* **51**, 979-984.
- HERING, R., FRADE-MARTINEZ, R., BAJANOWSKI, T., POETS, C. F., TSCHENTSCHER, F. & RIESS, O. (2006). Genetic investigation of the TSPYL1 gene in sudden infant death syndrome. *Genetics in Medicine* **8**, 55-58.
- HERSMUS, R., DE LEEUW, B., STOOP, H., BERNARD, P., VAN DOORN, H. C., BRUGGENWIRTH, H. T., DROP, S. L. S., OOSTERHUIS, J. W., HARLEY, V. R. & LOOIJENGA, L. H. J. (2009). A novel SRY missense mutation affecting nuclear import in a 46, XY female patient with bilateral gonadoblastoma. *European Journal of Human Genetics* **17**, 1642-1649.
- HOSHIYA, M., CHRISTIAN, B. P., CROMIE, W. J., KIM, H., ZHAN, Y., MACLAUGHLIN, D. T. & DONAHOE, P. K. (2003). Persistent Mullerian duct syndrome caused by both a 27-bp deletion and a novel splice mutation in the MIS type II receptor gene. *Birth Defects Research Part a-Clinical and Molecular Teratology* **67**, 868-874.
- HOSSAIN, A. & SAUNDERS, G. F. (2001). The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 16817-16823.
- JUST, W., RAU, W., VOGEL, W., AKHVERDIAN, M., FREDGA, K., GRAVES, J. A. M. & LYAPUNOVA, E. (1995). Absence of SRY in species of the vole *ellobius*. *Nature Genetics* **11**, 117-118.
- KARL, J. & CAPEL, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology* **203**, 323-333.
- KATO, M., DAS, S., PETRAS, K., KITAMURA, K., MOROHASHI, K. I., ABUELO, D. N., BARR, M., BONNEAU, D., BRADY, A. F., CARPENTER, N. J., CIPERO, K. L., FRISONE, F., FUKUDA, T., GUERRINI, R., IIDA, E., ITOH, M., LEWANDA, A. F., NANBA, Y., OKA, A., PROUD, V. K., SAUGIER-VEBER, P., SCHELLEY, S. L., SELICORNI, A., SHANER, R., SILENGO, M., STEWART, F., SUGIYAMA, N., TOYAMA, J., TOUTAIN, A., VARGAS, A. L., YANAZAWA, M., ZACKAI, E. H. & DOBYNS, W. B. (2004). Mutations of ARX are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. *Human Mutation* **23**, 147-159.
- KELLOGG, D. R., KIKUCHI, A., FUJINAKATA, T., TURCK, C. W. & MURRAY, A. W. (1995). Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins. *Journal of Cell Biology* **130**, 661-673.
- KNEBELMANN, B., BOUSSIN, L., GUERRIER, D., LEGEAI, L., KAHN, A., JOSSO, N. & PICARD, J. Y. (1991). Anti-mullerian hormone Bruxelles - a nonsense mutation associated with the persistent mullerian duct syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 3767-3771.
- KNOWER, K. C., KELLY, S., LUDBROOK, L. M., BAGHERI-FAM, S., SIM, H., BERNARD, P., SEKIDO, R., LOVELL-BADGE, R. & HARLEY, V. R. (2011). Failure of SOX9 Regulation in 46XY Disorders of Sex Development with SRY, SOX9 and SF1 Mutations. *Plos One* **6**, 9.

- KOHLER, B., LIN, L., FERRAZ-DE-SOUZA, B., WIEACKER, P., HEIDEMANN, P., SCHRODER, V., BIEBERMANN, H., SCHNABEL, D., GRUTERS, A. & ACHERMANN, J. C. (2008). Five novel mutations in sterolidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. *Human Mutation* **29**, 59-64.
- KOLON, T. F., WIENER, J. S., LEWITTON, M., ROTH, D. R., GONZALES, E. T. & LAMB, D. J. (1999). Analysis of homeobox gene HOXA10 mutations in cryptorchidism. *Journal of Urology* **161**, 275-280.
- LEE, P. A., HOUK, C. P., AHMED, S. F., HUGHES, I. A. & INT CONSENSUS CONF, I. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *Pediatrics* **118**, E488-E500.
- LIN, Y. M., TSAI, C. C., CHUNG, C. L., CHEN, P. R., SUN, H. S., TSAI, S. J. & HUANG, B. M. (2010). Fibroblast growth factor 9 stimulates steroidogenesis in postnatal Leydig cells. *International Journal of Andrology* **33**, 545-553.
- LOURENCO, D., BRAUNER, R., RYBCZYNSKA, M., NIHOUL-FEKETE, C., MCELREAVEY, K. & BASHAMBOO, A. (2011). Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 1597-1602.
- LUO, X. R., IKEDA, Y. Y. & PARKER, K. L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual-differentiation. *Cell* **77**, 481-490.
- MALLET, D., BRETONES, P., MICHEL-CALEMARD, L., DIJOURD, F., DAVID, M. & MOREL, Y. (2004). Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: A case of SF1 haploinsufficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 4829-4832.
- MAROTEAU, P., SPRANGER, J., OPITZ, J. M., KUCERA, J., LOWRY, R. B., SCHIMKE, R. N. & KAGAN, S. M. (1971). Campomelic syndrome. *Presse Medicale* **79**, 1157-&.
- MATSON C. K., MURPHY M. W., SARVER A. L., GRISWOLD M. D., BARDWELL V. J. & ZARKOWER D. (2011). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature* **476**, 101-104.
- MELNICZEK, J. R., DAMBACH, D., PROCIUK, U., JEZYK, P. F., HENTHORN, P. S., PATTERSON, D. E. & GIGER, U. (1999). Sry-negative XX sex reversal in a family of Norwegian Elkhounds. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **13**, 564-569.
- MERCHANTLARIOS, H., MORENOMENDOZA, N. & BUEHR, M. (1993). The role of the mesonephros in cell-differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *International Journal of Developmental Biology* **37**, 407-415.
- MITSUHASHI, T., WARITA, K., SUGAWARA, T., TABUCHI, Y., TAKASAKI, I., KONDO, T., HAYASHI, F., WANG, Z. Y., MATSUMOTO, Y., MIKI, T., TAKEUCHI, Y., EBINA, Y., YAMADA, H., SAKURAGI, N., YOKOYAMA, T., NANMORI, T., KITAGAWA, H., KANT, J. A. & HOSHI, N. (2010). Epigenetic abnormality of SRY gene in the adult XY female with pericentric inversion of the Y chromosome. *Congenital Anomalies* **50**, 85-94.

- MIYAMOTO, N., YOSHIDA, M., KURATANI, S., MATSUO, I. & AIZAWA, S. (1997a). Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* **124**, 1653-1664.
- MOORADIAN, A. D., MORLEY, J. E. & KORENMAN, S. G. (1987). Biological actions of androgens. *Endocrine Reviews* **8**, 1-28.
- MUSCATELLI, F., STROM, T. M., WALKER, A. P., ZANARIA, E., RECAN, D., MEINDL, A., BARDONI, B., GUIOLI, S., ZEHETNER, G., RABL, W., SCHWARZ, H. P., KAPLAN, J. C., CAMERINO, G., MEITINGER, T. & MONACO, A. P. (1994). Mutations in the *DAX-1* gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* **372**, 672-676.
- OTTOLENGHI, C., MOREIRA, C., MENDONCA, B. B., BARBIERI, M., FELLOUS, M., BERKOVITZ, G. D. & McELREAVEY, K. (2001). Absence of mutations involving the lim homeobox domain gene *LHX9* in 46,XY gonadal agenesis and dysgenesis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**, 2465-2469.
- PEARLMAN, A., LOKE, J., LE CAIGNEC, C., WHITE, S., CHIN, L., FRIEDMAN, A., WARR, N., WILLAN, J., BRAUER, D., FARMER, C., BROOKS, E., ODDOUX, C., RILEY, B., SHAJAHAN, S., CAMERINO, G., HOMFRAY, T., CROSBY, A. H., COUPER, J., DAVID, A., GREENFIELD, A., SINCLAIR, A. & OSTRER, H. (2010). Mutations in *MAP3K1* Cause 46,XY Disorders of Sex Development and Implicate a Common Signal Transduction Pathway in Human Testis Determination. *American Journal of Human Genetics* **87**, 898-904.
- PELLEGRINI, M., MANSOURI, A., SIMEONE, A., BONCINELLI, E. & GRUSS, P. (1996). Dentate gyrus formation requires *Emx2*. *Development* **122**, 3893-3898.
- PREISS, S., ARGENTARO, A., CLAYTON, A., JOHN, A., JANS, D. A., OGATA, T., NAGAI, T., BARROSO, I., SCHAFER, A. J. & HARLEY, V. R. (2001). Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon *SOX9* structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 27864-27872.
- PUFFENBERGER, E. G., HU-LINCE, D., PAROD, J. M., CRAIG, D. W., DOBRIN, S. E., CONWAY, A. R., DONARUM, E. A., STRAUSS, K. A., DUNCKLEY, T., CARDENAS, J. F., MELMED, K. R., WRIGHT, C. A., LIANG, W., STAFFORD, P., FLYNN, C. R., MORTON, D. H. & STEPHAN, D. A. (2004). Mapping of sudden infant death with dysgenesis of the testes syndrome (SIDDT) by a SNP genome scan and identification of *TSPYL* loss of function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 11689-11694.
- PUJAR, S., KOTHAPALLI, K. S., KIRKNESS, E., VAN WORMER, R. H. & MEYERS-WALLEN, V. N. (2005). Exclusion of *Lhx9* as a candidate gene for Sry-negative XX sex reversal in the American cocker spaniel model. *Journal of Heredity* **96**, 452-454.
- RAJENDER, S., SINGH, L. & THANGARAJ, K. (2007). L859F mutation in androgen receptor gene results in complete loss of androgen binding to the receptor. *Journal of Andrology* **28**, 772-776.
- RATO, L., SOCORRO, S., CAVACO, J. E. B. & OLIVEIRA, P. F. (2010). Tubular Fluid Secretion in the Seminiferous Epithelium: Ion Transporters and Aquaporins in Sertoli Cells. *Journal of Membrane Biology* **236**, 215-224.

- RETAUX, S., ROGARD, M., BACH, I., FAILLI, V. & BESSON, M. J. (1999). Lhx9: A novel LIM-homeodomain gene expressed in the developing forebrain. *Journal of Neuroscience* **19**, 783-793.
- REUTENS, A. T., ACHERMANN, J. C., ITO, M., GU, W. X., HABIBY, R. L., DONOHUE, P. A., PANG, S. Y., HINDMARSH, P. C. & JAMESON, J. L. (1999). Clinical and functional effects of mutations in the DAX-1 gene in patients with adrenal hypoplasia congenita. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **84**, 504-511.
- SAINIO, K., HELLSTEDT, P., KREIDBERG, J. A., SAXEN, L. & SARIOLA, H. (1997). Differential regulation of two sets of mesonephric tubules by WT-1. *Development* **124**, 1293-1299.
- SALEHI, L. B., SCARCIOLLA, O., VANNI, G. F., NARDONE, A. M., FRAJESE, G., NOVELLI, G. & STUPPIA, L. (2006). Identification of a novel mutation in the SRY gene in a 46, XY female patient. *European Journal of Medical Genetics* **49**, 494-498.
- SANYANUSIN, P., SCHIMMENTI, L. A., MCNOE, L. A., WARD, T. A., PIERPONT, M. E. M., SULLIVAN, M. J., DOBYNS, W. B. & ECCLES, M. R. (1995). Mutation of the PAX2 gene in a family with optic-nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nature Genetics* **9**, 358-364.
- SCHMAHL, J., KIM, Y., COLVIN, J. S., ORNITZ, D. M. & CAPEL, B. (2004). Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development* **131**, 3627-3636.
- SCHMAHL, J. P., COLVIN, J., ORNITZ, D. & CAPEL, B. (2001). The role of FGF9 and proliferation in sex determination. *Developmental Biology* **235**, 177.
- SCHMITT-NEY, M., THIELE, H., KALTWASSER, P., BARDONI, B., CISTERNINO, M. & SCHERER, G. (1995). 2 NOVEL SRY Missense mutations reducing DNA-binding identified in XY females and their mosaic fathers. *American Journal of Human Genetics* **56**, 862-869.
- SEKIDO, R., BAR, I., NARVAEZ, V., PENNY, G. & LOVELL-BADGE, R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Developmental Biology* **274**, 271-279.
- SEKIDO, R. & LOVELL-BADGE, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* **453**, 930-934.
- SHAHID, M., DHILLION, V. S., JAIN, N., HEDAU, S., DIWAKAR, S., SACHDEVA, P., BATRA, S., DAS, B. C. & HUSAIN, S. A. (2004). Two new novel point mutations localized upstream and downstream of the HMG box region of the SRY gene in three Indian 46,XY females with sex reversal and gonadal tumour formation. *Molecular Human Reproduction* **10**, 521-526.
- SHAWLOT, W. & BEHRINGER, R. R. (1995). Requirement for LIM1 in head-organizer function. *Nature* **374**, 425-430.

- SINCLAIR, A. H., BERTA, P., PALMER, M. S., HAWKINS, J. R., GRIFFITHS, B. L., SMITH, M. J., FOSTER, J. W., FRISCHAUF, A. M., LOVELLBADGE, 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.
- SINGH, R., SHASTRY, P. K., RASALKAR, A. A., SINGH, L. & THANGARAJ, K. (2006). A novel androgen receptor mutation resulting in complete androgen insensitivity syndrome and bilateral Leydig cell hyperplasia. *Journal of Andrology* **27**, 510-516.
- STOEVA, R., GROZDANOVA, L., SCHERER, G., KRASTEVA, M., BAUSCH, E., KRASTEV, T., LINEV, A. & STEFANOVA, M. (2011). A novel SOX9 nonsense mutation, Q401X, in a case of campomelic dysplasia with XY sex reversal. *Genetic Counseling* **22**, 49-53.
- SUTOU, S., MITSUI, Y. & TSUCHIYA, K. (2001). Sex determination without the Y Chromosome in two Japanese rodents *Tokudaia osimensis osimensis* and *Tokudaia osimensis* spp. *Mammalian Genome* **12**, 17-21.
- SUTTON, E., HUGHES, J., WHITE, S., SEKIDO, R., TAN, J., ARBOLEDA, V., ROGERS, N., KNOWER, K., ROWLEY, L., EYRE, H., RIZZOTI, K., MCANINCH, D., GONCALVES, J., SLEE, J., TURBITT, E., BRUNO, D., BENGTSOON, H., HARLEY, V., VILAIN, E., SINCLAIR, A., LOVELL-BADGE, R. & THOMAS, P. (2011). Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 328-341.
- TAYLOR, H. S., BLOCK, K., BICK, D. P., SHERING, R. J. & LAYMAN, L. C. (1999). Mutation analysis of the EMX2 gene in Kallmann's syndrome. *Fertility and Sterility* **72**, 910-914.
- TELLIER, A. L., AMIEL, J., DELEZOIDE, A. L., AUDOLLENT, S., AUGÉ, J., ESNAULT, D., ENCHA-RAZAVI, F., MUNNICH, A., LYONNET, S., VEKEMANS, M. & ATTIE-BITACH, T. (2000). Expression of the PAX2 gene in human embryos and exclusion in the CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics* **93**, 85-88.
- TENG, Y. N., LIN, Y. M., LIN, Y. H., TSAO, S. Y., HSU, C. C., LIN, S. J., TSAI, W. C. & KUO, P. L. (2002). Association of a single-nucleotide polymorphism of the deleted-in-azoospermia-like gene with susceptibility to spermatogenic failure. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**, 5258-5264.
- 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.
- TORRES, M., GOMEZPARDO, E., DRESSLER, G. R. & GRUSS, P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* **121**, 4057-4065.
- UHLENHAUT, N. H., JAKOB, S., ANLAG, K., EISENBERGER, T., SEKIDO, R., KRESS, J., TREIER, A. C., KLUGMANN, C., KLASSEN, C., HOLTER, N. I., RIETHMACHER, D., SCHUTZ, G., COONEY, A. J., LOVELL-BADGE, R. & TREIER, M. (2009). Somatic Sex Reprogramming of Adult Ovaries to Testes by FOXL2 Ablation. *Cell* **139**, 1130-1142.

- VINCI, G., BRAUNER, R., TAR, A., ROUBA, H., SHETH, J., SHETH, F., RAVEL, C., MCELREAVEY, K. & BASHAMBOO, A. (2009). Mutations in the TSPYL1 gene associated with 46,XY disorder of sex development and male infertility. *Fertility and Sterility* **92**, 1347-1350.
- VOGEL, T., DITTRICH, O., MEHRAEIN, Y., DECHEND, F., SCHNIEDERS, F. & SCHMIDTKE, J. (1998). Murine and human TSPYL genes: Novel members of the TSPY-SET-NAP1L1 family. *Cytogenetics and Cell Genetics* **81**, 265-270.
- WALLIS, M. C., WATERS, P. D., DELBRIDGE, M. L., KIRBY, P. J., PASK, A. J., GRUTZNER, F., RENS, W., FERGUSON-SMITH, M. A. & GRAVES, J. A. M. (2007). Sex determination in platypus and echidna: autosomal location of SOX3 confirms the absence of SRY from monotremes. *Chromosome Research* **15**, 949-959.
- WELTER, H., KOHN, F. M. & MAYERHOFER, A. (2011). Mast cells in human testicular biopsies from patients with mixed atrophy: increased numbers, heterogeneity, and expression of cyclooxygenase 2 and prostaglandin D2 synthase. *Fertility and Sterility* **96**, 309-313.
- WILHELM, D. & ENGLERT, C. (2002). The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes & Development* **16**, 1839-1851.
- YANG, Y. X., JEANPIERRE, C., DRESSLER, G. R., LACOSTE, M., NIAUDET, P. & GUBLER, M. C. (1999). WT1 and PAX-2 podocyte expression in Denys-Drash syndrome and isolated diffuse mesangial sclerosis. *American Journal of Pathology* **154**, 181-192.
- YAYON, A., KLAGSBRUN, M., ESKO, J. D., LEDER, P. & ORNITZ, D. M. (1991). Cell-surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth-factor to its high-affinity receptor. *Cell* **64**, 841-848.
- YOSHIDA, M., SUDA, Y., MATSUO, I., MIYAMOTO, N., TAKEDA, N., KURATANI, S. & AIZAWA, S. (1997). Emx1 and Emx2 functions in development of dorsal telencephalon. *Development* **124**, 101-111.
- YOSHIOKA, H., ISHIMARU, Y., SUGIYAMA, N., TSUNEKAWA, N., NOCE, T., KASAHARA, M. & MOROHASHI, K. (2005). Mesonephric FGF signaling is associated with the development of sexually indifferent gonadal primordium in chick embryos. *Developmental Biology* **280**, 150-161.
- YUAN, F. P., LIN, D. X., RAO, C. V. & LEI, Z. M. (2006). Cryptorchidism in LhrKO animals and the effect of testosterone-replacement therapy. *Human Reproduction* **21**, 936-942.
- ZANARIA, E., MUSCATELLI, F., BARDONI, B., STROM, T. M., GUIOLI, S., GUO, W. W., LALLI, E., MOSER, C., WALKER, A. P., MCCABE, E. R. B., MEITINGER, T., MONACO, A. P., SASSONECORSI, P. & CAMERINO, G. (1994). An unusual member of the nuclear hormone-receptor superfamily responsible for x-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* **372**, 635-641.