RAFAŁ P. PIPREK¹, JACEK Z. KUBIAK^{2,3}

¹*Zakład Anatomii Porównawczej
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków*

²*UnivRennes, CNRS, UMR 6290
Institute of Genetics and Development of Rennes
Cell Cycle Group, Faculty of Medicine
F-35000 Rennes, Francja*

³*Zakład Medycyny Regeneracyjnej i Biologii Komórki
Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii (WIHE)
Kozielska 4, 01-163 Warszawa
E-mail: rafal.piprek@uj.edu.pl*

HISTORIA BADAŃ NAD DETERMINACJĄ PŁCI

PIERWSZE KONCEPCJE DETERMINACJI PŁCI

Płeć jest zespołem cech budowy, funkcji i zachowania organizmu, umożliwiających zaklasyfikowanie go jako osobnika męskiego lub żeńskiego. Dla organizmów rozmnażających się płciowo prawidłowa budowa i funkcja układu rozrodczego jest warunkiem posiadania zdrowego i zdolnego do dalszego rozrodu potomstwa, co leży u podstaw utrzymania ciągłości gatunku. Na rozwój cech płciowych składa się determinacja (wyznaczenie) rozwoju gonad niezróżnicowanych w kierunku jąder lub jajników. Dalsze różnicowanie się struktur anatomicznych narządów płciowych zależne jest od typu gonady. Do głównych funkcji gonad należy wytworzenie komórek rozrodczych w procesie gametogenezy oraz aktywność hormonalna. Gametogeneza zapewnia dużą różnorodność potomstwa. Tym samym populacje organizmów rozmnażających się płciowo mogą łatwiej przystosowywać się do zmieniającego się środowiska. Od wieków ludzkość intrygowała istota płci, sens jej istnienia i pochodzenie. Zagadnienie płci pojawia się już w *Księdze Rodzaju* (2:21-24), w której zapisano opowieść o stworzeniu mężczyzny przez Boga i kobiety z żebra Adama. Platon

w swoim dziele pod tytułem *Uczta* z około 385-370 roku p.n.e. przedstawił własną wizję pochodzenia płci człowieka. W dziele tym Arystofanes opowiada o ludziach pierwotnych posiadających kragłe kształty, po dwie pary rąk i nóg oraz dwie twarze. Ludzie ci posiadać mieli nadzwyczajną siłę wzbudzającą lęk nawet wśród bogów. Zeus, by ustrzec się przed owymi silnymi istotami, postanowił ich poprzecinać na pół. W ten sposób powstały mężczyźni i kobiety. Obie połówki zaczęły za sobą tęsknić, wykazując potrzebę zjednania się wyrażającą się w postaci miłości. W ten sposób Platon tłumaczył istotę płci nierozłącznie związaną z uczuciem miłości.

Jedną z najbardziej tajemniczych kwestii pozostawał przez wieki problem tego, co decyduje o płci osobnika, a więc jak następuje determinacja płci. Grecki filozof Parmenides, żyjący ok. 540-470 lat p.n.e. twierdził, że płeć dziecka jest determinowana przez położenie płodu w łonie matki. Rozwój płci męskiej byłby determinowany przez położenie płodu po prawej stronie łona, a żeńskiej po stronie lewej. Kolejny grecki filozof, Anaksagoras (ok. 500-428 lat p.n.e.), uznał, że to czynnik ojcowski decyduje o płci dziecka; mianowicie z nasienia pochodzącego z prawego jądra rozwija się chłopiec, a z lewego

go jądra dziewczynka. Z kolei Empedokles (494-434 lat p.n.e.) dowodził, że organizmy składają się z czterech elementów: z ognia (ciepło), wody (zimno), powietrza (wilgoć) i ziemi (suchość), a mężczyźni mają więcej składnika ciepłego (LESKY 1951). Najwybitniejszy biolog starożytności, Arystoteles (384-322 lat p.n.e.), nie zgadzał się z twierdzeniami poprzedników. Uważał on, że ma dowody wskazujące, iż potomstwo obu płci może rozwijać się po obu stronach macicy, oraz zauważył, że mężczyźni mający tylko jedno jądro mogą spłodzić zarówno potomka płci męskiej, jak i żeńskiej (PECK 1942, MITTWOCH 2000). Arystoteles upatrywał mechanizmów determinacji płci w przewadze składników ciepłych lub zimnych w organizmie (LESKY 1951). W swoim dziele *Historia Animalium* wskazywał, że wśród zwierząt samce są silniejsze, co wynika z ich wyższego ciepła, umożliwiającego przemianę pożywienia na skoncentrowane nasienie. Samice natomiast są słabe i chłodniejsze, przez co nie mają zdolności przemienienia pożywienia w nasienie, a w zamian produkują większą ilość krwi uchodzącą podczas menstruacji. Według niego to właśnie z połączenia nasienia z krwią menstruacyjną miał się rozwijać płód. Zgęstnienie nasienia w wyniku ciepła doprowadzać miało do rozwoju osobnika męskiego, natomiast upłynnienie nasienia w niższej temperaturze, prowadzące do jego wymieszania z krwią matki, prowadzić miało do rozwoju osobnika żeńskiego. To właśnie Arystoteles stwierdził, że zarówno mężczyzna, jak i kobieta (poprzez nasienie i krew) mają udział w spłodzeniu potomka. Założył także, co okazało się prawdą, że narządy płci męskiej i żeńskiej wyodrębniają się podczas rozwoju z niezróżnicowanych związków. Co istotne, stwierdził, że jądra są odpowiedzialne za rozwój cech męskich, czyli za maskulinizację, gdyż u pozbawionych jąder eunuchów obserwowano pogłębiające się cechy feminizacji (PECK 1942). Tak więc, spośród starożytnych myślicieli, to właśnie Arystoteles był najbliższy prawdy, a jego obserwacje rzeczywiście przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat determinacji płci.

PIERWSZE NAUKOWE DOWODY NA DETERMINACJĘ PŁCI

Wierzenia w to, że ciepło, położenie płodu i pożywienie determinuje płeć na bardzo długo zagnieździło się w umysłach ludzi i przetrwało przez blisko dwa tysiące lat (MITTWOCH 2000). Jeszcze w drugiej połowie XIX w. uważano, że ciepło i odżywianie wpływa na płeć dziecka (DÜSING 1884). Wiara ta porbrzmiewa nawet dzisiaj w ludowych wierzeniach i przekazach. Kamieniem milowym w

badaniach biologicznych było odkrycie chromosomów w 1888 r. Dokonał tego niemiecki anatom, fizjolog i patolog Heinrich Waldeyer (Ryc. 1) (CREMER i CREMER 1988). Już trzy lata później, bo w 1891 r., niemiecki cytolog Hermann Henking, badając podział mejotyczny w jądrach pluskwiaka kowala bezskrzydłego zauważył, że niektóre plemniki tego gatunku mają 12 chromosomów, a niektóre 11. Stwierdził, że jeden chromosom zachowuje się podczas mejozy inaczej niż pozostałe i nazwał go chromosomem X. Chciał w ten sposób podkreślić tajemniczą naturę owego dziwnego chromosomu (HENKING 1891, SCHWARTZ 2009). Następnie poszukiwał chromosomu X w komórkach konika polnego, jednak bezskutecznie (HENKING 1891). Dopiero w 1901 r. amerykański zoolog Clarence Erwin McClung wskazał, że chromosom X, jako „dodatkowy chromosom”, może być związany z determinacją płci (MCCLUNG 1902).

W 1905 r. amerykański genetyk Edmund Beecher Wilson, badający spermatogenezę owadów wykazał, że istnieją dwa rodzaje plemników, różniące się obecnością lub brakiem jednego z chromosomów (Ryc. 1) (WILSON 1905). W tym samym roku amerykańska genetyk Nettie Maria Stevens, badając gametogenezę chrząszcza mącznika młynarka stwierdziła, że u samców, ale nie u samic, jeden chromosom różnił się znacznie wielkością od innych (STEVENS 1905). Stevens stwierdziła, że większy chromosom jest chromosomem X, natomiast mniejszy chromosom nazwała Y i stwierdziła, że musi on być odpowiedzialny za determinację płci męskiej (STEVENS 1905). Dowodziła, że w chromosomie Y musi znajdować się jakiś czynnik determinujący rozwój samca. Wilson natomiast uważał, że oba chromosomy, X i Y, w równym stopniu determinują płeć (RICHARDSON 2013). Stevens zmarła w 1912 r. nie potwierdziwszy swojej hipotezy, zaś Wilson został opisany w literaturze naukowej jako odkrywca chromosomów X i Y determinujących płeć (RICHARDSON 2013).

Opisanie chromosomów płciowych przyczyniło się do stwierdzenia, że płeć determinowana jest przez geny. Mniej więcej w tym samym okresie (początek XX w.) stwierdzono, że chromosomy są nośnikami informacji genetycznej. Dokonali tego niezależnie Walter Sutton i Theodor Boveri w 1903 r. (Ryc. 1). Termin „gen” został wprowadzony w 1909 r. przez duńskiego botanika Wilhelma Johannsena. W 1910 r. amerykański genetyk Thomas Hunt Morgan, badając dziedziczenie cech u wywiltnej karłowatej (*Drosophila melanogaster*) pokazał, że geny znajdują się w chromosomach, są ułożone liniowo i zajmują ściśle określone miejsca, tzw. loci (MOR-

Ryc. 1. Chronologia najważniejszych odkryć w badaniach nad determinacją płci.

GAN 1910a). Dodatkowo wykazał, że niektóre cechy (np. kolor oczu) są sprzężone z płcią, gdyż ich geny leżą w chromosomach płciowych (MORGAN 1910b). Zrozumienie podstaw mechanizmów dziedziczenia przypadło właśnie na początek XX w. i znów dzięki badaniom prowadzonym na owadach, ale mechanizm, w którym chromosomy płciowe determinują płęć, długo jeszcze miał pozostać niewyjaśniony.

Dopiero kilka dekad później, bo w 1956 r., w Wielkiej Brytanii, Charles Ford i

John Hamerton, wykorzystując metody cytogenetyczne, ustalili liczbę chromosomów u człowieka i stwierdzili, że mężczyźni mają chromosomy X i Y (kariotyp 46,XY), a kobiety dwa chromosomy X (kariotyp 46,XX) (FORD i HAMERTON 1956). Już trzy lata po tym odkryciu, opisano pierwsze aberracje chromosomalne u ludzi (Ryc. 1). Zauważono mianowicie, że osoby z zespołem Klinefeltera to mężczyźni z kariotypem 47,XXY (JACOBS i STRONG 1959), natomiast osoby z zespołem Turnera to kobiety z kariotypem 45,X0

(FORD i współaut. 1959). Był to pierwszy naukowy dowód potwierdzający, że chromosom Y u ludzi jest odpowiedzialny za determinację płci męskiej.

POSZUKIWANIE CZYNNIKA DETERMINUJĄCEGO PŁEĆ MĘSKĄ

Odkrycie funkcji chromosomu Y w determinacji płci męskiej u ludzi zapoczątkowało poszukiwania hipotetycznie zawartego w nim czynnika determinującego tę właśnie płć. Ów hipotetyczny czynnik nazwano TDF (ang. testis-determining factor) u ludzi, a u myszy *Tdy* (ang. testis-determining factor on Y chromosome). Najcenniejszym w tych czasach obiektem badań nad determinacją płci byli pacjenci z objawami odwrócenia płci (ang. sex reversal), a więc niezgodności między składem chromosomów płciowych a cechami fenotypowymi.

Analizy aberracji chromosomalnych, takich jak translokacje, czyli przeniesienie fragmentu chromosomu na inny chromosom wskazały, że to krótkie ramie chromosomu Y odpowiada za determinację płci męskiej (JACOBS i ROSS 1966). Pole poszukiwań czynnika TDF ulegało sukcesywnemu zawężaniu. Spośród genów mniejszego ramienia chromosomu Y, w pierwszej kolejności skupiono się na genie antygeny H-Y i genie *Bkm*, ale nie wykazano ich udziału w determinacji płci (MITTWOCH 2000). Kolejnym badanym genem był *Zfy* (ang. zinc-finger protein Y-linked). Okazało się, że on także nie determinuje płci, gdyż nie ulega ekspresji w gonadach myszy. Ponadto zaobserwowano, że u mężczyzn o kariotypie 46,XX męskie cechy fenotypu męskiego pojawiają się, pomimo braku genu *SRY* (PALMER i współaut. 1989).

Opisani przez Palmera i współpracowników pacjenci (czterej mężczyźni o kariotypie 46,XX) posiadali w swym genomie niewielki, liczący 35 tysięcy par zasad, fragment chromosomu Y. Wyizolowano ten region, podzielono na fragmenty i poddano analizie metodą Southern blot, porównując z fragmentami chromosomu Y innych ssaków. W rezultacie okazało się, że istnieje tylko jeden konserwatywny fragment chromosomu Y ssaków, a więc taki, który nie wykazuje dużej zmienności między gatunkami. Założono, że prawdopodobnie właśnie w tym fragmencie znajduje się gen determinujący płć. Sekwencjonowanie konserwatywnego fragmentu wskazało na istnienie w tym miejscu tylko jednej otwartej ramki odczytu (ORF) kodującej gen składający się z pojedynczego egzonu. Gen ten nazwano „sex determining region on the Y chromosome” (*SRY* u ludzi, a *Sry* u myszy) (Ryc. 1) (GUBBAY i współaut. 1990, SINCLAIR i współaut. 1990). Badanie

ekspresji tego genu metodą RT-PCR wykazało, że gen *Sry* ulega ekspresji w rozwijających się gonadach myszy XY w 11,5 dnia życia płodowego, tuż przed pojawieniem się pierwszych objawów płciowego różnicowania się jąder (GUBBAY i współaut. 1990). Ostateczny dowód potwierdzający determinowanie płci męskiej przez gen *Sry* został dostarczony dzięki badaniom transgenicznym myszy XX, do genomu których wprowadzono transgen *Sry*. Osobniki te, pomimo żeńskiego kariotypu XX, rozwinęły się w typowe samce, posiadające normalnie rozwinięte jądra (odwrócenie płci), jednak były one bezpłodne z powodu braku chromosomu Y, który, jak się okazało, zawiera także geny odpowiedzialne za prawidłowy przebieg spermatogenezy (KOOPMAN i współaut. 1991). Wykazano w ten sposób, że właśnie gen *Sry* jest konieczny i zarazem wystarczający do zdeterminowania płci męskiej. Okazało się następnie, że występuje on jedynie u torbaczy i łżyskowców, a więc u wszystkich ssaków poza stekowcami (FOSTER i współaut. 1992, WALLIS i współaut. 2007).

BADANIA NAD SZLAKIEM DETERMINACJI PŁCI MĘSKIEJ

Identyfikacja głównej funkcji genu *SRY* była niewątpliwie najważniejszym odkryciem w badaniach determinacji płci, obok odkrycia samych chromosomów płciowych. Jednak rozwój jądra, a więc narządu o dość skomplikowanej strukturze, z pewnością musi być kontrolowany przez liczne geny, a gen *Sry* stanowiłby zapewne czynnik indukujący kolejne zmiany w trakcie rozwoju jądra. Następne badania ujawniały kolejne geny zaangażowane w kontrolę rozwoju gonad. W 1994 r. opisano przypadki dzieci z dysplazją kampakomeliczną, która jest jednym z zespołów zaburzeń rozwojowych kośćca, mogącym współistnieć z nieprawidłową determinacją płci gonad i rozwojem żeńskich cech płciowych u płodów o męskim kariotypie 46,XY (feminizacja) (FOSTER 1994). Na podstawie kolejnych badań wykazano, że gen *Sox9* jest kluczowy dla determinacji płci męskiej, gdyż ulega ekspresji w rozwijających się jądrach, a konkretnie w różnicujących się komórkach Sertoliego u wszystkich zbadanych kręgowców. Wyłączenie jego ekspresji doprowadza do całkowitego odwrócenia płci męskiej w żeńską (HUANG i współaut. 1999, BISHOP i współaut. 2000, VIDAL i współaut. 2001, CHABOISSIER i współaut. 2004). Natomiast podwyższenie ekspresji *Sox9* u myszy XX powoduje rozwój ich gonad w kierunku jąder. Tak więc gen ten okazał się konieczny i w określonych warunkach wystarczający do rozwoju

Ryc. 2. Współczesny molekularny mechanizm determinujący płć u myszy – szlaki determinacji płci męskiej (XY) i żeńskiej (XX).

U osobników XY dochodzi do ekspresji genu *Sry*, która jest wyzwalana przez geny *Sf1*, *Gata4*, *Wt1* i *Igf1*. Gen *Sry* wyzwalą ekspresję genu *Sox9*; oba te geny są głównymi genami determinującymi płć męską, koniecznymi do rozwoju gonad w jądra. Gen *Sox9* wyzwalą ekspresję *Fgf9* i *Ptgds* biorących udział w rozwoju jąder. U osobników XX nie dochodzi do ekspresji genu *Sry*, natomiast dochodzi do ekspresji genów *Rspo1* i *Wnt4*, podwyższających koncentrację kateniny β , która z kolei reguluje ekspresję genów odpowiedzialnych za rozwój gonad żeńskich.

gonad męskich. U ssaków SRY bezpośrednio podwyższa ekspresję genu *Sox9*, a *Sry* oraz *Sox9* są dwoma genami zajmującymi centralne i kluczowe miejsce w kaskadzie genów odpowiedzialnych za determinację płci męskiej (Ryc. 2). *Sry*, obecny jedynie u samców, stanowi rodzaj induktora wyzwalającego ekspresję *Sox9*, który następnie wyzwalą ekspresję szeregu genów zaangażowanych w rozwój gonady męskiej, takich jak czynnik wzrostu fibroblastów (*Fgf9*), syntaza prostaglandyny D2 (*Ptgds*), hormon anty-müllerowski (*Amh*) (Ryc. 2) (ARANGO i współaut. 1999, KIM i współaut. 2006, WILHELM i współaut. 2007). FGF9, czyli białkowy produkt genu *Fgf9*, jest istotny dla przyspieszenia podziałów komórkowych we wzrastających gonadach męskich, prostaglandyna D2 utrzymuje wysoką ekspresję *Sox9*, a AMH doprowadza do zaniku zawiązków wewnętrznych narządów płciowych żeńskich u samców. Wyłączenie ekspresji *Fgf9* lub *Ptgds* w gonadach myszy doprowadza do odwrócenia płci męskiej w żeńską, co wskazuje, że geny te są zaangażowane w determinację płci męskiej.

Przez stosunkowo długi czas niewyjaśniony pozostawał mechanizm wyzwalania

ekspresji samego genu *Sry*. Okazało się, że istotne są tu czynniki transkrypcyjne, takie jak: WT1 (czynnik Wilmsa 1), SF1 (czynnik steroidogenezy 1), GATA4 (4 białko wiążące sekwencję GATA) i IGF1 (insulino-podobny czynnik wzrostu 1) (Ryc. 2) (LARNEY i współaut. 2014).

POSZUKIWANIE CZYNNIKÓW DETERMINACJI PŁCI ŻEŃSKIEJ

Początkowo uważano, że rozwój jajnika jest procesem biernym i następuje po prostu *par défaut* przy braku czynników wywołujących rozwój jądra. Jednak w pewnym momencie badania zaczęły definiować coraz to liczniejsze geny zaangażowane w rozwój jajników wskazując, że w rzeczywistości kontrola rozwoju gonady żeńskiej jest procesem w pełni aktywnym. Początkowo kandydatami na geny determinacji płci żeńskiej były czynniki transkrypcyjne *Dax1*, *Foxl2* i czynnik wzrostu *Wnt4* (PIPREK 2009a). U kóz, wyłączenie ekspresji genu *Foxl2* doprowadziło do odwrócenia płci żeńskiej w męską, co wskazało na udział *Foxl2* w determinacji płci żeńskiej u tego gatunku (PAILHOX i współaut. 2002). U myszy wyłączenie ekspresji *Foxl2* nie powodowało całkowitego odwrócenia płci, ale zaburzało rozwój jajników i powodowało pojawienie się struktur charakterystycznych dla jądra w jajnikach noworodków mysich. Sugerowało to udział *Foxl2* w utrzymaniu struktury jajników (UHLENHAUT i współaut. 2009). Natomiast u ludzi opisano duplikację genów *DAX1* i *WNT4*, doprowadzającą do odwrócenia płci męskiej w żeńską (JORDAN i współaut. 2001, ZANARIA i współaut. 1994), co wskazywało na ich zaangażowanie w determinację płci żeńskiej. Wyłączenie ekspresji *Dax1* u myszy nie powodowało odwrócenia płci, a jedynie bezpłodność mutantów, natomiast wyłączenie ekspresji *Wnt4* wiązało się z jedynie częściowym odwróceniem płci żeńskiej w męską wskazując, że istnieją międzygatunkowe różnice w kaskadach determinacji płci, a proces ten jest kierowany kaskadą ekspresji genów ulegających szybkim zamianom podczas ewolucji (YU i współaut. 1998, VAINIO i współaut. 1999).

Istotnym wydarzeniem w badaniach nad determinacją płci żeńskiej było opisanie w 2006 r. przypadku pewnej włoskiej rodziny, u członków której występowało nadmierne rogowacenie skóry, a także bezpłodność u mężczyzn (Ryc. 1). Badania genetyczne wykazały, że mężczyźni ci mają typowy żeński genotyp, a więc 46,XX bez genu SRY (PARMA i współaut. 2006). Mogło to sugerować mutację genu determinującego płć żeńską, którego unieczynnienie wywołało zaburzenie rozwoju jajników, a w to miejsce wykształ-

cenie się jąder (całkowite odwrócenie płci u mężczyzn, obecnie zwane od ang. XX testicular DSD – disorder of sex development). Analiza genetyczna pozwoliła na wykazanie mutacji w genie *RSPO1*, kodującym czynnik wzrostu, R-spondynę 1. Był to pierwszy przypadek u ludzi, w którym mutacja pojedynczego genu spowodowała odwrócenie płci żeńskiej w męską. Okazało się, że gen *Rspo1* ulega ekspresji w różnicujących się jajnikach myszy na wczesnym etapie, co potwierdziło udział tego genu w kontroli rozwoju gonad żeńskich (CHASSOT i współaut. 2008). Natomiast unieczynnienie tego genu u myszy doprowadziło jedynie do częściowego odwrócenia płci żeńskiej w męską (CHASSOT i współaut. 2008). R-spondyna 1 wraz z czynnikiem WNT4 łączy się z receptorami błonowymi, co skutkuje stabilizacją kateniny β , a to z kolei chroni przed jej degradacją w cytoplazmie komórki (Ryc. 2). W efekcie, katenina β trafia do jądra komórkowego, gdzie pełni funkcję regulatora ekspresji genów. Wycisza tam ekspresję genów zaangażowanych w rozwój gonad męskich i tym samym wywołuje rozwój gonad żeńskich (PIPEK 2009a). Szlak ten pełni centralną rolę w determinacji płci żeńskiej nie tylko ssaków, ale także ptaków i być może także innych kręgowców (SMITH i współaut. 2008). Potwierdzenie znajduje koncepcja wypracowana na podstawie wielu eksperymentów, prowadzonych na przełomie XX i XXI w., że determinacja płci opiera się na skomplikowanych interakcjach wielu genów zachodzących w rozwijających się gonadach. U ssaków produkt genu *Sry*, który jest obecny jedynie u genetycznych samców (XY), podwyższa ekspresję genu *Sox9*, a wysoki poziom ekspresji tego ostatniego genu jest utrzymywany przez FGF9 i prostaglandynę D2 (Ryc. 2). Oba te czynniki jednocześnie hamują ekspresję genów determinacji płci żeńskiej *Rspo1* i *Wnt4* i w efekcie uruchamiany zostaje mechanizm różnicowania się gonad w jądra (PIPEK 2009b). Natomiast u genetycznych samic, czyli w przypadku braku genu *Sry*, *Sox9* osiąga niewielki poziom ekspresji, przez co ekspresja genów determinacji płci żeńskiej *Rspo1* i *Wnt4* nie jest wystarczająco hamowana. To zaś doprowadza do wzrostu poziomu kateniny β w cytoplazmie, co z kolei powoduje uruchomienie maszyneryi różnicowania się gonad w jajniki (Ryc. 2) (PIPEK 2009a). Tak więc, istnieją dwa szlaki determinacji płci, męski i żeński, a pomiędzy nimi zachodzą interakcje antagonistyczne (PIPEK 2007). Los rozwoju gonad zostaje wyznaczony w wyniku przewagi ekspresji genów szlaku męskiego lub żeńskiego.

UDZIAŁ HORMONÓW W DETERMINACJI PŁCI

Kolejnym istotnym zagadnieniem wymagającym wyjaśnienia było to, jakie czynniki wpływają na rozwój drugorzędowych cech płciowych. Już starożytni zdawali sobie sprawę z roli jąder w wytworzeniu męskich cech płciowych, wiedzieli bowiem, że kastracja doprowadza do utraty tych cech. Pierwsza udokumentowana naukowa próba, mająca na celu wyjaśnienie roli gonad w rozwoju płciowym, pochodzi z 1849 r. Wówczas to, niemiecki fizjolog i zoolog Arnold Berthold wykastrował cztery koguty, a dwóm z nich wszczepił ponownie jądra (BERTHOLD 1849). Koguty po wszczepieniu jąder zachowywały się jak typowe samce, w przeciwieństwie do kastratów, a więc pisały, prowadziły między sobą walki i wykazywały zainteresowanie kurami. Czterdzieści lat później, w 1889 r., francuski fizjolog i neurolog Charles Brown-Séquard wstrzykiwał sobie sporządzoną przez siebie samego mieszaninę składającą się z nasienia, krwi i płynu otrzymanego z jąder psów i kawii domowej (popularnie zwanej świnką morską) (BROWN-SEQUARD 1889). Utrzymywał, że zabieg ten odmlodził go i przedłużył mu życie. Był to zapewne efekt placebo, gdyż wykorzystana przez niego metoda wodnej ekstrakcji eliminowała hydrofobowe androgeny, które ewentualnie mogłyby wywrzeć jakiś efekt (RENGACHARY i COLEN 2008).

Pierwsze wartościowe dowody na rolę hormonów w rozwoju płciowym otrzymano dzięki obserwacjom płodów bydłowych, potocznie zwanych frymartynami (KELLER i TANDLER 1916, LILLIE 1916). Frymartynizm (ang. freemartinism) jest zjawiskiem maskulinizacji układu rozrodczego u płodu płci żeńskiej w ciąży bliźniaczej, z towarzyszącym płodem płci męskiej. W wyniku tych oddziaływań krew obu płodów miesza się ze sobą, dając w efekcie osobniki męskie rozwijające się normalnie i osobniki żeńskie wykazujące maskulinizację w postaci zaniku jajowodów i zaburzeń rozwoju jajników. Na tej podstawie stwierdzono, że pewne hormony pochodzące z płodów męskich wywołują cechy maskulinizacji u płodów żeńskich.

W 1929 r. amerykańscy fizjologowie T.F. Gallagher i Fred C. Koch wstrzykiwali kastrowanym kogutom (tzw. kapłonom) ekstrakt z jąder byka. Kapłony nie pieją i nie wykazują zachowania typowego dla kogutów, jednak iniekcja ekstraktu wywołała u nich pianie (GALLAGHER i współaut. 1929). Wskazało to, że w gonadach męskich pochodzących od byków produkowany jest czynnik odpowiedzialny za męskie cechy i działający w dodatku na ptaki. W 1935 r. szwajcarska

grupa endokrynologów wyizolowała z jąder byka 10 mg hormonu, który nazwano testosteronem (DAVID i współaut. 1935). Jeszcze w tym samym roku dokonano pierwszej syntezy testosteronu w warunkach laboratoryjnych (BUTENANDT i HANISCH 1935).

Istnieje także szereg zaburzeń u ludzi, które pomagają wyjaśnić udział hormonów w kształtowaniu się drugorzędowych cech płciowych. Na przykład, niektórych chorych z wrodzonym rozrostem kory nadnerczy cechuje nadprodukcja androgenów, które u osób z żeńskim kariotypem 46,XX mogą doprowadzić do rozwoju męskich drugorzędowych cech płciowych (maskulinizacja). Natomiast pacjenci z kariotypem 46,XY i częściovą, receptorową niewrażliwością na androgeny (ang. partial androgen insensitivity syndrome zespół, PAIS), pomimo produkcji androgenów, wykazują zaburzenia rozwoju narządów płciowych, co dowodzi roli androgenów w różnicowaniu się męskich narządów płciowych (MCPhaul 2002).

Możliwość rozwoju w układzie rozrodczym cech płci przeciwnej wynika z bipotencjalnego charakteru zawiązków tego układu. Początkowo u płodów obu płci genetycznych powstają przewody Müllera i przewody Wolffa. Podczas rozwoju osobnika męskiego, przewody Wolffa rozwijają się w nasieniowody, a przewody Müllera zanikają. Natomiast podczas rozwoju osobnika żeńskiego z przewodów Müllera rozwijają się jajowody, macica i górny odcinek pochwy, a przewody Wolffa zanikają.

Jednym z najistotniejszych osiągnięć w badaniach roli hormonów w rozwoju płciowym były eksperymenty Alfreda Josta. Ten francuski endokrynolog w latach 40. XX w. mikrochirurgicznie usuwał z płodów królików niezróżnicowane jeszcze płciowo zawiązki gonad i opisał wpływ tego zabiegu na dalszy rozwój płodów króliczych (JOST 1948). Okazało się, że przy braku gonad, drogi układu rozrodczego rozwijały się w kierunku żeńskim, a więc z przewodów Müllera rozwijały się jajowody, macica i górny odcinek pochwy, a zanikały przewody Wolffa. Natomiast usunięcie gonad na późniejszym etapie rozwoju nie zaburzało różnicowania układu rozrodczego, co pokazało, że wczesne rozwijające się gonady męskie powodują maskulinizację układu rozrodczego. Następnie Jost wszczepiał rozwijające się jądra żeńskim płodom królika. Powodowało to rozwój męskiego układu rozrodczego, a więc zanik przewodów Müllera i rozwój przewodów Wolffa w nasieniowody. Kolejny eksperyment polegał na wszczepieniu kryształu propionianu testosteronu płodom po uprzednim usunięciu gonad. Okazało się, że testosteron powodował zarówno rozwój

nasieniowodów, jak i męskich genitaliów, ale nie hamował rozwoju jajowodów (JOST 1953). Jost wysnuł więc wniosek, że testosteron produkowany w jądrach odpowiada za rozwój męskiego układu rozrodczego, nasieniowodów i męskich genitaliów, ale musi być jeszcze dodatkowo wytwarzana w jądrach płodów pewna hipotetyczna substancja hamująca rozwój zawiązków jajowodów (przewodów Müllera). Substancję ową nazwano MIF (z ang. müllerian-inhibiting factor; czynnik hamujący rozwój przewodów Müllera). Wiele lat trwały badania mające na celu identyfikację tej substancji. Dopiero w latach 70. XX w. francuska endokrynolog Nathalie Josso wyizolowała białko, które zostało nazwane hormonem anty-müllerowskim (ang. anti-müllerian hormone, AMH) (JOSSO 1973). Później okazało się, że gen determinacji płci męskiej (*Sox9*) bezpośrednio aktywuje w jądrach ekspresję genu *Amh*, którego produkt, jako hormon, dyfunduje do sąsiednich tkanek i wywołuje apoptozę (programowaną śmierć komórkową) w zawiązkach wewnętrznych narządów płciowych żeńskich (ROBERTS i współaut. 2002). Zapobiega to rozwojowi układu rozrodczego żeńskiego u samców.

Reasumując, dla rozwoju męskich cech płciowych istotne są przede wszystkim dwa hormony: pierwszy to testosteron syntetyzowany dzięki współpracy płodowych komórek Leydiga i płodowych komórek Sertoliego, a drugi to AMH wydzielany przez płodowe komórki Sertoliego (SHIMA i współaut. 2013).

Jednak kontrola hormonalna rozwoju drugorzędowych cech płciowych jest bardziej skomplikowana. Już w latach 60. XX w. stwierdzono, że testosteron wydzielany przez jądra dopiero w narządach docelowych ulega przemianie do bardziej aktywnego androgenu zwanego dihydrotestosteronem (DHT), który jest odpowiedzialny przede wszystkim za rozwój prącia i moszny (WILSON i WALKER 1969). Ponadto, ostatnie badania rzucają nowe światło na zrozumienie kontroli rozwoju płciowego wskazując, że u ludzi dla rozwoju męskich cech płciowych istotne są nie tylko gonady, ale także inne źródła androgenów, takie jak łożysko, wątroba i kora nadnerczy (O'SHAUGHNESSY i współaut. 2019).

DETERMINACJA PŁCI – CZYNNIKI ŚRODOWISKOWE CZY GENY?

Jak już wspomniano na wstępie, wczesne, np. starożytne, koncepcje determinacji płci zakładały, że płeć determinowana jest przez wewnętrzne (zależne od rodziców) czynniki biologiczne, takie jak temperatura ciała, czy położenie płodu w łonie matki. Jeszcze pod koniec XIX w. dominował pogląd, że dieta ma decydujący wpływ na płeć dziecka.

Szczególne znaczenie przypisywano odżywianiu matki w pierwszych trzech miesiącach ciąży (DÜSING 1884). Uważano, że dobre odżywianie prowadzi do zdeterminowania płci żeńskiej, a gorsze odżywianie determinuje płć męską. Nie twierdzono natomiast, aby temperatura miała znaczny wpływ na płć. GEDDES i THOMSON (1898) przeprowadzili obserwacje, które doprowadziły do wniosku, że wiele czynników współdziała w określeniu płci. Niekorzystne czynniki, a wśród nich przede wszystkim złe odżywianie i po części niekorzystna temperatura, prowadzić miały do rozwoju samców, korzystne zaś do rozwoju samic. Dopiero na początku XX w., po stwierdzeniu, że chromosomy są nośnikiem informacji genetycznej oraz, że samce i samice różnią się składem chromosomów, zaczęto skłaniać się ku idei, że płć jest zapisana w genach.

Jednak w latach 60. XX w. zaczęły pojawiać się naukowe dowody na udział czynników środowiskowych w determinacji płci. Dotyczyło to jednak tylko niektórych gatunków, co wskazało, że u różnych gatunków płć może być determinowana w dwojaki sposób: przez informację zapisaną w genach lub przez wpływ czynników środowiskowych. Madeline Charnier z Uniwersytetu w Dakarze opisała pierwszy przypadek temperaturowej determinacji płci (ang. temperature sex determination, TSD). Pokazała ona, że w potomstwie agamy czerwonogłowej (*Agama agama*) stosunek liczby samców do samic (stosunek płci) zależy od temperatury, w której następuje inkubacja jaj (CHARNIER 1966). W 1967 r. Susumo OHNO opublikował książkę pod tytułem *Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes*, w której podsumował wiedzę na temat determinacji płci u różnych gatunków. Autor postulował, że płć jest determinowana genetycznie, a doniesienia o wpływie temperatury na płć uznał jedynie za zaburzenie tego procesu. Przyczyniło się to do ignorowania przez pewien czas badań dotyczących temperaturowej determinacji płci. W 1971 r. francuski badacz z Uniwersytetu Paryskiego Claude Pieau opublikował wyniki badań nad wpływem temperatury na płć u żółwia greckiego (*Testudo graeca*) i żółwia błotnego (*Emys orbicularis*) (PIEAU 1971, 1972). U żółwia greckiego z jaj inkubowanych w niższej temperaturze (25–30°C) wylęgają się prawie wyłącznie samce, a w wyższej temperaturze (31–35°C) prawie wyłącznie samice (Ryc. 3). Podobnie u żółwia błotnego, po inkubacji poniżej 28°C wylęgają się samce, a powyżej 29°C samice; w temperaturze pośredniej wylęgają się osobniki obu płci (Ryc. 3). Było to pierwsze dobrze udokumentowane i opublikowane doniesienie potwierdzające istnienie u niektórych ga-

Ryc. 3. Wpływ temperatury inkubacji jaj na płć potomstwa u dwóch gatunków żółwi (żółw śródziemnomorski i żółw błotny) oraz u aligatora amerykańskiego.

tunków temperaturowej determinacji płci. To właśnie Pieau wskazał, że istnieją dwa typy determinacji płci: u większości gatunków genetyczna determinacja płci i u niektórych gatunków temperaturowa determinacja płci. Dodatkowo wskazał on, że istnieje ściśle określony okres w rozwoju płodowym żółwi, w czasie którego temperatura warunkuje ich płć. Kolejne badania ujawniały istnienie temperaturowej determinacji płci u coraz większej liczby gadów. Dobrze udokumentowane zostało to np. u aligatora amerykańskiego (*Alligator mississippiensis*), u którego niższa i wyższa temperatura determinuje płć żeńską, a pośrednia temperatura płć męską (Ryc. 3) (FERGUSON i JOANEN 1982).

Przez długie lata nie było wiadomo w jaki sposób temperatura może wpływać na płć. Dopiero zastosowanie zaawansowanych metod badań ekspresji genów pokazało, że w rozwijających się gonadach żółwia czerwonołeciego (*Trachemys scripta*) temperatura wpływa na ekspresję genu kodującego demetylazę histonu KDM6B (GE i współaut. 2018). Demetylaza ta odłącza od histonu (histony to białka eukariontów, na które nawinięte jest ich DNA) grupy metylowe ($-\text{CH}_3$), wpływając w ten sposób miejscowo na ekspresję genów zawartych w nici DNA nawiniętej na histony. Demetylaza KDM6B u tego gatunku żółwia ulega ekspresji w niższej temperaturze i wyzwała ekspresję genu *Dmrt1* odpowiedzialnego za rozwój gonad męskich.

W 1995 r. grupa z Uniwersytetu w Austin w Teksasie pokazała, że często zanieczyszczające wody polichlorowane bifenyl-

le (PCB) powodują u żółwi i u innych gadów wodnych zaburzenia rozwoju płciowego (CREWS i współaut. 1995). Tak więc wykazano, że istnieją związki chemiczne, w tym zanieczyszczenia, wpływające na rozwój płciowy i doprowadzające do zaburzeń determinacji płci, takich jak całkowite odwrócenie płci lub obojnactwo. Obserwacje te zainicjowały prowadzone obecnie na szeroką skalę badania nad wpływem na płęć różnorodnych zanieczyszczeń i wielu innych substancji chemicznych, takich jak np. hormony antykoncepcyjne dostające się wraz z moczem do środowiska.

PODSUMOWANIE

Różnice płciowe od dawna intrygują ludzkość zarówno w kontekście naukowym, jak i społecznym. Dokładne poznanie mechanizmów determinujących rozwój płciowy zostało osiągnięte dzięki wykorzystaniu zaawansowanych technik naukowych opracowanych w XX w. Jednocześnie zaskakujące jest to, że sieć genów kontrolujących determinację płci jest wciąż stosunkowo słabo poznana. Kolejne badania zapewne ujawnią jeszcze więcej nowych genów zaangażowanych w rozwój gonad, pokazując złożoność mechanizmów kontroli rozwoju płciowego. Okazuje się, że kaskada wydarzeń składających się na determinację płci jest znacznie bardziej skomplikowana niż pierwotnie sobie wyobrażano. Ponadto, w wielu przypadkach zaburzeń determinacji płci u ludzi ich źródło pozostaje nieznane, co wskazuje, że badania nad genami zaangażowanymi w rozwój gonad wymagają kontynuacji.

Streszczenie

Jedną z podstawowych kwestii, które intrygowały i fascynowały ludzkość od zarania dziejów jest to, skąd wywodzą się różnice między płciami. W dziełach starożytnych filozofów odnajdujemy próby intuicyjnego lub wręcz poetyckiego wyjaśnienia pochodzenia cech odróżniających mężczyzn od kobiet. Wykrycie mechanizmów kierujących rozwojem płciowym zawdzięczamy zastosowaniu metod naukowych, które były rozwijane przez stulecia i osiągnęły swój szczyt dopiero w XX w. Wśród kamieni milowych w badaniach nad determinacją płci należy wymienić przede wszystkim odkrycie chromosomu X w XIX w., opisanie udziału chromosomów płciowych w determinacji płci na początku XX w., uznanie w latach 50. chromosomu Y za chromosom determinujący płęć męską u ludzi, oraz odkrycie w 1990 r. genu SRY determinującego u ssaków płęć męską.

LITERATURA

ARANGO N., LOVELL-BADGE R., BEHRINGER R., 1999. *Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development*. Cell 99, 409-419.

- BERTHOLD A. A., 1849. *Transplantation der Hoden*. Arch. Anat. Physiol. Wissensch. 42-46.
- BISHOP C. E., WHITWORTH D. J., QIN Y., AGOULNIK A. I., AGOULNIK I. U., HARRISON W. R., BEHRINGER R. R., OVERBEEK P. A., 2000. *A transgenic insertion upstream of *Sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse*. Nat. Genet. 26, 490-494.
- BROWN-SEQUARD C. E., 1889. *The effects produced on man by subcutaneous injection of a liquid obtained from the testicles of animals*. Lancet 137, 101-107.
- BUTENANDT A., HANISCH G., 1935. *The transformation of dehydroandrosterone into androstendiol and testosterone; a method for producing testosterone from cholesterol*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 237, 89-98.
- CHABOISSIER M. C., KOBAYASHI A., VIDAL V. I. P., LÜTZKENDORF S., VAN DE KANT H. J. G., WEGNER M., DE ROOIJ D. G., BEHRINGER R. R., SCHEDL A., 2004. *Functional analysis of *Sox8* and *Sox9* during sex determination in the mouse*. Development 131, 1891-1901.
- CHARNIER M., 1966. *Action of temperature on sex ratio in the *Agama agama* (Agamidae: Lacertilia) embryo*. Records of Meetings of the Society of Biology of West Africa 160, 620-622.
- CHASSOT A. A., RANC F., GREGOIRE E. P., ROEPERS-GAJADIEN H. L., TAKETO M. M., CAMERINO G., DE ROOIJ D. G., SCHEDL A., CHABOISSIER M. C., 2008. *Activation of beta-catenin signaling by *Rspo1* controls differentiation of the mammalian ovary*. Hum. Mol. Genet. 17, 1264-1277.
- CREMER T., CREMER C., 1988. *Centennial of Wilhelm Waldeyer's introduction of the term "chromosome" in 1888*. Cytogenet. Cell Genet. 48, 65-7.
- CREWS D., BERGERON J., MCLACHLAN J., 1995. *The role of estrogen in turtle sex determination and the effect of PCBs*. Environ. Health Perspect. 103, 73-77.
- DAVID K., DINGEMANSE E., FREUD J., LAQUEUR E., 1935. *Crystalline male hormone from testes (testosterone) more active than androsterone preparations from urine or cholesterol*. Zeitschrift Physiologische Chemie 233, 281-293.
- DÜSING C., 1884. *Die Regulierung des Geschlechterverhältnisses bei der Vermehrung der Menschen, Tiere und Pflanzen*. Jenaische Zeitschrift Für Naturwiss 16, 428-464.
- FERGUSON W. J., JOANEN T., 1982. *Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis**. Nature 296, 850-853.
- FORD C. E., HAMERTON J. L., 1956. *The chromosomes of man*. Nature 178, 1020-1023.
- FORD C. E., JONES K. W., POLANI P., DE ALMEIDA J. C., BRIGGS J. H., 1959. *A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome)*. Lancet 1, 711-713.
- FOSTER J. W., BRENNAN F. E., HAMPIKIAN G. K., GOODFELLOW P. N., SINCLAIR A. H., LOVELL-BADGE R., SELWOOD L., RENFREE M. B., COOPER D. W., GRAVES J. A., 1992. *Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials*. Nature 35, 531-533.
- FOSTER J. W., DOMINGUEZ-STEGLICH M. A., GUJOLI S., KWOK C., WELLER P. A., STEVANOVIĆ M., WEISSENBACH J., MANSOUR S., YOUNG I. D., GOODFELLOW P. N., 1994. *Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene*. Nature 372, 525-530.
- GALLAGHER T. F., KOCH F. C., 1929. *The testicular hormone*. J. Biol. Chem. 84, 495-500.

- GE C., YE J., WEBER C., SUN W., ZHANG H., ZHOU Y., CAI C., QIAN G., CAPEL B., 2018. *The histone demethylase KDM6B regulates temperature-dependent sex determination in a turtle species*. Science 360, 645-648.
- GEDDES P., THOMSON J. A., 1889. *The evolution of sex*. London: Walter Scott.
- GUBBAY J., COLLIGNON J., KOOPMAN P., CAPEL B., ECONOMOU A., MÜNSTERBERG 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.
- HENKING H., 1891. *Spermatogenese und deren Beziehung zur Entwicklung bei Pyrrhocoris apterus L.* Zeit. Schrift. Für Wissenschaftliche Zool. 51, 685-736.
- HUANG B., WANG S., NING Y., LAMB A. N., BARTLEY J., 1999. *Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9*. Am. J. Med. Genet. 87, 349-353.
- JACOBS P. A., ROSS A., 1966. *Structural abnormalities of the Y chromosome in man*. Nature 210, 352-354.
- JACOBS P. A., STRONG J. A., 1959. *A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism*. Nature 183, 302-303.
- JORDAN B. K., MOHAMMED M., CHING S. T., DÉLOT E., CHEN X. N., DEWING P., SWAIN A., RAO P. N., ELEJALDE B. R., VILAIN E., 2001. *Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans*. Am. J. Hum. Genet. 68, 1102-1109.
- JOSSO N., 1973. *In vitro synthesis of mullerian-inhibiting hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis*. Endocrinology 93, 829-834.
- JOST A., 1953. *Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones*. Recent Prog. Horm. Res. 33, 117-160.
- JOST P. A., 1948. *Le controle hormonale de la différenciation du sexe*. Biol. Rev. 23, 201-236.
- KELLER K., TANDLER J., 1916. *Über das Verhalten der Eihäute bei der Zwillingsfruchtbarkeit des Rindes*. Wiener Tierärztl. Wochenschr. 3, 513-526.
- KIM Y., KOBAYASHI A., SEKIDO R., DI NAPOLI L., BRENNAN J., CHABOISSIER M. C., POULAT F., BEHRINGER R. R., LOVELL-BADGE R., CAPEL B., 2006. *Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination*. PLoS Biol. 4, 1000-1009.
- 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.
- LARNEY C., BAILEY T. L., KOOPMAN P., 2014. *Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry*. Development 141, 2195-2205.
- LESKY E., 1951. *Die Zeugungs- und Vererbungslehren der Antike und ihr Nachwirken*. Verlag der Akademie der Wissenschaften und der Literatur.
- LILLIE F. R., 1916. *The theory of the free-martin*. Science 43, 611-613.
- MCCLUNG C. E., 1902. *The accessory chromosome-sex determinant?* Biol. Bull. 3, 43-84.
- MCPHAUL M. J., 2002. *Androgen receptor mutations and androgen insensitivity*. Mol. Cell Endocrinol. 198, 61-67.
- MITTWOCH U., 2000. *Three thousand years of questioning sex determination*. Cytogenet. Cell Genet. 91, 186-191.
- MORGAN T. H., 1910a. *Chromosomes and heredity*. Am. Natural. 44, 449-496.
- MORGAN T. H., 1910b. *Sex limited inheritance in Drosophila*. Science 32, 120-122.
- OHNO S., 1967. *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Berlin: Springer-Verlag.
- O'SHAUGHNESSY P. J., ANTIGNAC J. P., LE BIZEC B., MORVAN M. L., SVECHNIKOV K., SÖDER O., SAVCHUK I., MONTEIRO A., SOFFIENTINI U., JOHNSTON Z. C., BELLINGHAM M., HOUGH D., WALKER N., FILIS P., FOWLER P. A., 2019. *Alternative (backdoor) androgen production and masculinization in the human fetus*. PLoS Biol. 17, e3000002.
- PAILLOUX E., VIGIER B., VAIMAN D., SERVEL N., CHAFFAUX S., CRIBIU E. P., COTINOT C., 2002. *Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats*. Dev. Dynam. 224, 39-50.
- PALMER M. S., SINCLAIR A. H., BERTA P., ELLIS N. A., GOODFELLOW P. N., ABBAS N. E., FELLOUS M., 1989. *Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor*. Nature 342, 937-939.
- PARMA P., RADI O., VIDAL V., CHABOISSIER M. C., DELLAMBRA 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.
- PECK A. L., 1942. *Aristotle - generation of animals*. Harvard University Press.
- PIEAU C., 1971. *Sur la Proportion Sexuelle chez les Embryons de Deux Cheloniens (Testudo graeca L. et Emys orbicularis L.)* Issus d'Oeufs Incubés Artificiellement. Comp. Rend. Acad. Sci., Paris 272, 3071-3074.
- PIEAU C., 1972. *Effets de la Temperature sur le Developpement des Glandes Genitales chez les Embryons de Deux Cheloniens, Emys orbicularis L. et Testudo graeca L.* Comp. Rend. Acad. Sci., Paris 274, 719-722.
- PIPEK R. P., 2007. *Genetyczne mechanizmy determinacji płci i różnicowania gonad ssaków*. Kosmos 56, 39-48.
- PIPEK R. P., 2009a. *Molecular mechanisms underlying female sex determination - antagonism between female and male pathway*. Fol. Biol. 57, 105-113.
- PIPEK R. P., 2009b. *Genetic mechanisms underlying male sex determination in mammals*. J. Appl. Genet. 50, 347-360.
- RENGACHARY S. S., COLEN C., 2008. *Charles-Edouard Brown-Séquard: an eccentric genius*. Neurosurgery 62, 954-964.
- RICHARDSON S., 2013. *Sex itself: the search for male and female in the human genome*. Chicago and London, University of Chicago Press.
- ROBERTS L. M., VISSER J. A., INGRAHAM H. A., 2002. *Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development*. Development 129, 1487-1496.
- SCHWARTZ J., 2009. *In pursuit of the gene: from Darwin to DNA*. Harvard University Press.
- SHIMA Y., MIYABAYASHI K., HARAGUCHI S., ARAKAWA T., OTAKE H., BABA T., MATSUZAKI S., SHISHIDO Y., AKIYAMA H., TACHIBANA T., TSUTSUI K., MOROHASHI K., 2013. *Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes*. Mol. Endocrinol. 27, 63-73.
- SINCLAIR A. H., BERTA P., PALMER M. S., HAWKINS J. R., GRIFFITHS B. L., SMITH M. J., FOSTER J. W., FRISCHAUF A. M., LOVELL-BADGE 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.
- SMITH C. A., SHOEMAKER C. M., ROESZLER K. N., QUEEN J., CREWS D., SINCLAIR A. H., 2008. *Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development.* BMC Dev. Biol. 8, 72.
- STEVENS N. M., 1905. *Studies in spermatogenesis with especial reference to the "Accessory Chromosome"*. Forgotten Books.
- 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., SCHÜTZ 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.
- VAINIO S., HEIKKILÄ M., KISPÉRT A., CHIN N., MCMAHON A. P., 1999. *Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling.* Nature 397, 405-409.
- VIDAL V. P., CHABOISSIER M. C., DE ROOIJ D. G., SCHEDL A., 2001. *Sox9 induces testis development in XX transgenic mice.* Nat. Genet. 28, 216-217.
- WALLIS M. C., WATERS P. D., DELBRIDGE M. L., KIRBY P. J., PASK A. J., GRÜTZNER F., RENS W., FERGUSON-SMITH M. A., GRAVES J. A., 2007. *Sex determination in platypus and echidna: autosomal location of SOX3 confirms the absence of SRY from monotremes.* Chromosom Res. 15, 949-959.
- WILHELM D., PALMER S., KOOPMAN P., 2007. *Sex determination and gonadal development in mammals.* Physiol. Rev. 87, 1-28.
- WILSON E., 1905. *The chromosomes in relation to the determination of sex in insects.* Science 22, 500-502.
- WILSON J. D., WALKER J. D., 1969. *The conversion of testosterone to 5 α -androstane-17 β -ol-3-one (dihydrotestosterone) by skin slices of man.* J. Clin. Invest. 48, 371-379.
- YU R. N., ITO M., SAUNDERS T. L., CAMPER S. A., JAMESON J. L., 1998. *Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis.* Nat. Genet. 20, 353-357.
- ZANARIA E., MUSCATELLI F., BARDONI B., STROM T. M., GUIOLI S., GUO W., LALLI E., MOSER C., WALKER A. P., MCCABE E. R. B., 1994. *An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita.* Nature 372, 635-641.

KOSMOS Vol. 68, 4, 523-533, 2019

RAFAL P. PIPREK¹, JACEK Z. KUBIAK^{2,3}

¹Department of Comparative Anatomy, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Kraków, ²UnivRennes, CNRS, UMR 6290, Institute of Genetics and Development of Rennes, Cell Cycle Group, Faculty of Medicine, F-35000 Rennes, France, ³Laboratory of Regenerative Medicine and Cell Biology, Military Institute of Hygiene and Epidemiology (WIHE), Kozielska 4, 01-163 Warszawa, E-mail: rafal.piprek@uj.edu.pl

HISTORY OF STUDIES ON SEX DETERMINATION

Summary

One of the fundamental questions that intrigued and fascinated humanity since ancient times has been how the differences between sexes are determined. Even ancient philosophers tried to explain the nature of sex. Nevertheless, the description of mechanisms of sex determination was possible only owing to scientific methods developed through recent centuries that reached a summit in XX century. Among the milestones in studies on the sex determination, one should mention: the discovery of the X chromosome in XIX century, discovery that X and Y chromosomes are involved in sex determination at the beginning of XX century, the indication that Y chromosome determines the male sex in human (the 50s of XX century), and the discovery of SRY gene determining male sex in mammals (1990).

Keywords: sex determination, sexual development, gonad development, sex hormones