

*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιστολογίας και Εμβρυολογίας,
Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ*

Εισαγωγή

Όπως όλα τα όργανα του εμβρύου, οι γονάδες προέρχονται από μία αδιαφοροποίητη καταβολή, η οποία, σε αντίθεση προς τα άλλα αρχέγονα, μπορεί να ακολουθήσει αντί μιας δύο αναπτυξιακές οδούς. Ο καθορισμός του αρσενικού ή του θηλυκού γοναδικού φύλου εκφράζεται με τη μορφογένεση του όρχι ή της ωοθήκης, και αποτελεί ουσιαστικό γεγονός ελέγχου της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των εσωτερικών και εξωτερικών γεννητικών δομών. Όπως έδειξε ο Alfred Jost το 1947, με κλασικά πειράματα ευνουχισμού αρσενικών εμβρύων *in utero*, το βασικό πρόγραμμα ανάπτυξης της γοναδικής καταβολής ακολουθεί την οδό της θηλυκής διαφοροποίησης και η ανάπτυξη του αρσενικού φαινοτύπου επιβάλλεται από την παρουσία φυσιολογικά αναπτυγμένων όρχεων.

Σύμφωνα με αυτό το πρότυπο, κατά τη γονιμοποίηση του απλοειδικού ωοκύτταρου που φέρει τη Χ χρωματίδα, από το σπερματοζώαριο που φέρει χρωματίδα Χ ή Υ, καθορίζεται το γενετικό φύλο XX ή ΧΥ του εμβρύου. Με βάση το γενετικό φύλο πραγματοποιείται η γοναδική οργανογένεση σε όρχι, αν το γενετικό φύλο είναι ΧΥ και σε ωοθήκη, αν είναι ΧΧ. Μετά την ολοκλήρωση αυτού του σταδίου, αναγνωρίζεται το γοναδικό φύλο. Η λειτουργική διαφοροποίηση των γονάδων οδηγεί στην παραγωγή και έκκριση των ειδικών ορμονών του φύλου, οι οποίες ελέγχουν την ανάπτυξη του φαινοτυπικού φύλου, με την προϋπόθεση ότι, οι καταβολές των οργάνων-στόχων φέρουν τους ειδικούς υποδοχείς για τη δέσμευση αυτών. Στον άνθρωπο, ανάλογα με τον τρόπο που κάθε άτομο εννοεί τη φυλετική του ταυτότητα, καθορίζεται και το φύλο της συμπεριφοράς.

Σήμερα, γνωρίζουμε ότι ο καθορισμός του άρρενος φύλου, στα θηλαστικά, εξαρτάται από το γονίδιο Sry που εντοπίζεται στο Υ χρωμόσωμα, δρα στην αδιαφοροποίητη γεννητική καταβολή και επιβάλλει την εφαρμογή του προγράμματος που οδηγεί στη διαφοροποίηση του όρχι. Από αρκετά στοιχεία φαίνεται ότι το Sry ασκεί τη δράση του σε μία από τις σωματικές κυτταρικές σειρές της γεννητικής ακρολοφίας και προκαλεί τη διαφοροποίηση των κυττάρων αυτής σε κύτταρα Sertoli. Όταν λείπει το Sry ή η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί, τα κύτταρα αυτής της σειράς ακολουθούν τη θηλυκή οδό και διαφοροποιούνται σε θυλακικά (κοκκιώδη). Συνε-

πώς, το ερώτημα για τον τρόπο έναρξης της γοναδικής οντογένεσης στο έμβρυο μπορεί να τεθεί ως εξής: Διαφοροποιούνται ή όχι κύτταρα Sertoli στη γοναδική καταβολή; Μετά τη διαφοροποίησή τους, τα κύτταρα Sertoli εκπέμπουν σήματα προς τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές υποστηρίζοντας την ορχική μορφογένεση.

Από την εξέταση των ασθενών που παρουσιάζουν ανωμαλίες της ανάπτυξης των φυλετικών χαρακτήρων, όπως μερική ή πλήρη αντιστροφή του φύλου, συγγενείς ανωμαλίες του γεννητικού συστήματος ή υπογονιμότητα προκύπτει ότι, σε ποσοστό 10% πρόκειται για μεταλλάξεις του γονιδίου SRY. Η μελέτη των μεταλλάξεων αυτών, έδειξε ότι εκτός από το ορχεοκαθοριστικό γονίδιο SRY, του οποίου η παρουσία είναι αναγκαία και αρκετή για το σχηματισμό του όρχι και τη δημιουργία του άρρενος φαινοτύπου και άλλα γονίδια εμπλέκονται στη γοναδική οντογένεση. Όπως φαίνεται στο σχήμα 1 ορισμένα εκφράζονται στο γοναδικό αρχέγονο πριν από το Sry και στα 2 φύλα. Άλλα αποτελούν τους μεταγραφικούς στόχους του Sry στο άρρεν ενώ άλλα εξειδικεύουν τη διαφοροποίηση της ωθήκης. Παρακάτω, αναφέρονται τα χαρακτηριστικά μέλη κάθε ομάδας.

1. Ανάπτυξη της αδιαφοροποίητης γονάδας

Η αδιαφοροποίητη γονάδα αναπτύσσεται από την ουρογεννητική ακρολοφία, σε συνδυασμό με το ουροποιητικό σύστημα, το οποίο προέρχεται από το διάμεσο μεσόδερμα και εκτείνεται σε μεγάλο μήκος του εμβρύου, εκατέρωθεν της μέσης γραμμής. Αυτή η ουρογεννητική ακρολοφία υποδιαιρείται, κεφαλοουραία, σε τρία τμήματα: τον πρόνεφρο, στον οποίο περιλαμβάνεται και η καταβολή των επινεφριδίων, το μεσόνεφρο, επί του οποίου αναπτύσσεται η γονάδα και το μετάνεφρο, από τον οποίο προέρχεται ο μόνιμος νεφρός. Στο ανθρώπινο έμβρυο, η γοναδική καταβολή εμφανίζεται την 4η εβδομάδα και παραμένει στο αδιαφοροποίητο ή αμφιφυλετικό στάδιο έως την 7η εβδομάδα. Κατά την ίδια περίοδο, το έμβρυο αποκτά και ένα διπλό σύστημα γεννητικών πόρων, Wolff και Müller, προδρόμων των εσωτερικών γεννητικών οργάνων του αρσενικού και του θηλυκού. Μόνο ένα από αυτά θα διατηρηθεί και αυτό θα εξαρτηθεί από το αν η αδιαφοροποίητη γονάδα θα εξελιχθεί σε όρχι ή ωθήκη. Οι ορμόνες του εμβρυϊκού όρχι, ανδρογόνα [Τεστοστερόνη, DHT (- Δ 5-Dihydrotestosterone) σχήμα 2] και AMH (anti-Müllerian hormone) επάγουν την ανάπτυξη των παραγώγων των πόρων του Wolff και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του αρσενικού φύλου ενώ η AMH που εκκρίνεται από τα κύτταρα Sertoli αναστέλλει την ανάπτυξη των παραγώγων των πόρων του Müller.

2.1. Τα γονίδια που εκφράζονται στην ουρογεννητική ακρολοφία πριν από το Sry

Emx2 (*Empty spiracles homolog 2*). Η εξάλειψη του γονιδίου προκαλεί σοβαρές ανωμαλίες της ανάπτυξης του πρόσθιου εγκέφαλου και της ουρογεννητικής καταβο-

λής, όπως η απουσία νεφρών, ουρητήρων και γονάδων.

Τα αρσενικά ποντίκια που φέρουν τριπλή εξάλειψη των γονιδίων *Ir*, *Irr*, *Igf1r* (*insulin receptor*, *insulin-related receptor*, *Igf1 receptor*) παρουσιάζουν αντιστροφή του φύλου, ελαττωμένη έκφραση των *Sry* και *Sox9* και απουσία όλων των καθοδικών δεικτών του όρχι. Και στα δύο φύλα, οι γονάδες είναι μικρού μεγέθους και, αργότερα εκφράζουν ωθητικούς δείκτες. Πρόκειται για έμμεση δράση που απορρέει από μία γενική διαταραχή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με αποτέλεσμα την ελάττωση του αριθμού των σωματικών κυττάρων που εκφράζουν το *Sry*, πράγμα που τονίζει τη σημασία της σηματοδότησης της ινσουλίνης στα αρχικά στάδια της γοναδογένεσης.

Το γονίδιο *Lhx9*, από το ομοιοτικό κουτί LIM είναι ουσιαστικής σημασίας για τη γοναδική ανάπτυξη. Τα ποντίκια, στα οποία λείπει το *Lhx9*, δεν έχουν γονάδες και λόγω της απουσίας AMH και τεστοστερόνης τα XY άτομα έχουν φαινότυπο ατόμου XX.

Το γονίδιο *M33*, ανήκει στην ομάδα των γονιδίων *polycomb* που δρουν με μεταγραφική αποσιώπηση. Οι πρωτεΐνες τους λειτουργούν ως σύμπλεγμα με αρνητική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων *hox*. Η μηδενική έκφραση του γονιδίου προκαλεί γοναδική δυσγενεσία με καθυστέρηση της ανάπτυξης των όρχεων και αντιστροφή του φύλου.

Δύο από τα γονίδια αυτής της ομάδας είναι αναγκαία για τη διαφοροποίηση το διαμέσου μεσοδέρματος και συνολικά του ουρογεννητικού συστήματος. Πρόκειται για το γονίδιο του στεροειδογόνου παράγοντα 1 (*Sf-1*) και το γονίδιο του όγκου του *Wilm's* (*WT1*).

Το γονίδιο του στεροειδογόνου παράγοντα 1 (*Sf-1*) ενεργοποιεί τη μεταγραφή του *Dax1* και τα δύο εκφράζονται στις γονάδες, τα επινεφρίδια, τα γοναδοτρόφα κύτταρα της αδενόυπόφυσης και τον υποθάλαμο. Τα πρώτα μετάγραφα *SF1* ανιχνεύονται την 9η ημέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης, στο ποντίκι, μέσα στο γοναδικό βλάστημα. Η έκφρασή του *Sf-1* στα κύτταρα *Sertoli* και *Leydig*, στον όρχι, παραμένει σταθερή και μετά τη γέννηση. Η παρουσία θέσεων δέσμευσης της *SF1* σε όλους τους υποκινητές των γονιδίων που κωδικοποιούν για τη σύνθεση των στεροειδογόνων κυτοχρωμάτων P450 υποδηλώνει ότι η *SF1* παίζει πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των ενζύμων της στεροειδογένεσης, του υποδοχέα της ACTH και των υποφυσιακών γοναδοτροφινών, στα επινεφρίδια και τις γονάδες. Η ανίχνευση του *Sf-1* στα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται σημαίνει ότι, άμεσα ή έμμεσα, διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα ποντίκια με μηδενική μετάλλαξη του *Sf-1* και στα δύο φύλα πεθαίνουν, αμέσως μετά τη γέννηση, από επινεφριδιακή ανεπάρκεια και παρουσιάζουν αγενεσία των επινεφριδίων, των γονάδων και του μέσου κοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου.

Το γονίδιο *Wt1*, λειτουργεί πριν από τους πυρηνικούς υποδοχείς *Sf-1* (*Steroidogenic factor 1*) και *Dax1* (*Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenital, X*

chromosome). Wt1 και Sf-1 συνεργάζονται για να ενισχύσουν τη μεταγραφή του γονιδίου της αντιμυλλερείου ορμόνης - AMH, μία ενέργεια που καταστέλλεται από το Dax1.

Τα γονίδια GATA4 και Fog2 (Friend of GATA) εμπλέκονται στη μορφογένεση της καρδιάς αλλά επηρεάζουν και τη γοναδική μορφογένεση. Το γονίδιο GATA4 είναι μεταγραφικός παράγοντας δακτύλων ψευδαργύρου που εκφράζεται και στα δύο φύλα, στα σωματικά κύτταρα της αναπτυσσομένης γονάδας. Στον άνθρωπο, το γονίδιο GATA4 εκφράζεται από την αρχή της ορχικής ανάπτυξης ως την ώριμη ηλικία, στα κύτταρα Sertoli και στα κύτταρα Leydig. Η έκφρασή του συμπίπτει με τις περιόδους έντονης σύνθεσης ανδρογόνων, γεγονός που υποδηλώνει μία σχέση μεταξύ του GATA4 και της στεροειδογένεσης.

2. 2. Τα γονίδια που εκφράζονται στον αναπτυσσόμενο όρχι, μετά το Sry

Το γονίδιο SOX9 ανήκει στην οικογένεια των ομολόγων του SRY γονιδίων (οικογένεια SOX για τα SRY related HMG box genes). Το γονίδιο SOX9 είναι το μόνο μέλος της οικογένειας SOX που παρουσιάζει την ιδιαιτερότητα να έχει ιντρονικές αλληλουχίες. Η αναμενόμενη πρωτεΐνη αποτελείται από 509 αμινοξέα και περιέχει μία περιοχή HMG 78 αμινοξέων, η οποία μοιάζει αντίστοιχα κατά 100 και 71% με τη Sox στο ποντίκι και την SRY στον άνθρωπο. Η καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης είναι πλούσια σε προλίνη και γλουταμίνη γεγονός που υποδηλώνει ένα ρόλο παράγοντα μεταγραφής, με μία περιοχή ενεργοποιητή. Στον άνθρωπο και στο ποντίκι, το μήνυμα μπορεί να ανιχνευτεί, εκτός από άλλους ιστούς, στον υπό σχηματισμό οστίτη ιστό και τον όρχι, που αποτελούν τις κύριες θέσεις έκφρασης του. Στους πάσχοντες από καμπτομελική δυσπλασία (Campromelic dysplasia) παρατηρούνται στοιχεία προσβολής του σκελετού (αγκύλωση των άκρων, ανώμαλος σχηματισμός του χόνδρου, ατυπία στον αριθμό των πλευρών, κ.λ.π.), των ώτων και σε πολλές περιπτώσεις οδηγεί στον θάνατο, κατά τη νεαρή ηλικία, λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας. Περίπου στα 2/3 των ασθενών αυτών, με φαινότυπο θήλεος, ο καρυότυπος είναι XY.

Τα γονίδια Dhh και Pdgfra είναι ειδικά του αρσενικού για τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των κυττάρων Leydig. Το Dhh εκφράζεται από τα κύτταρα Sertoli και ο υποδοχέας του Ptch1 από τα κύτταρα του διαμέσου ιστού. Κατά παρόμοιο τρόπο το γονίδιο Pdgfra εκφράζεται στο διάμεσο ιστό και επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων Leydig. Στις γονάδες XY, με μηδενική έκφραση του Dhh διακόπτεται η διαφοροποίηση των κυττάρων Leydig και ο σχηματισμός των σπερματικών χορδών. Οι γονάδες Pdgfra^{-/-} παρουσιάζουν ανώμαλες σπερματικές χορδές και ανάπτυξη του διαμέσου ιστού.

Το γονίδιο της ομοειδούς της ινσουλίνης ορμόνης 3 (InsI3) που εμπλέκεται στη διακοιλιακή φάση της καθόδου των όρχεων εκφράζεται κυρίως στα εμβρυϊκά κύτταρα Leydig.

Το γονίδιο Sox9 ενεργοποιεί το Fgf9 (μέσω του FGFR2) και δημιουργείται ένα θετικό κύκλωμα ανάδρασης μεταξύ τους στις αναπτυσσόμενες αρσενικές γονάδες XY. Ο υποδοχέας FgfR2 κατευθύνει τη διαφοροποίηση των κυττάρων Sertoli. Οι ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν πολλαπλές αναπτυξιακές διεργασίες. Ο Fgf9 εκφράζεται ευρέως στο έμβρυο του ποντικίου και από τις 11,5 ημέρες της κύησης ανιχνεύεται στις σπερματικές χορδές της αναπτυσσόμενης αρσενικής γονάδας. Στοχευμένη διακοπή της έκφρασής του προκαλεί αντιστροφή του φύλου και διαταραχή του πολλαπλασιασμού του μεσεγγύματος, της μετανάστευσης των μεσονεφρικών κυττάρων και της ανάπτυξης των κυττάρων Sertoli.

3. Η διαφοροποίηση του όρχι και ο σχηματισμός των σπερματικών χορδών

Την 7η εβδομάδα της κύησης, στον άνθρωπο, αρχίζει η ορχική διαφοροποίηση με το σχηματισμό των σπερματικών χορδών, οι οποίες αποτελούνται από γεννητικά κύτταρα περιβαλλόμενα από κύτταρα Sertoli και μυοειδή κύτταρα. Τα κύτταρα Sertoli, στα οποία εκφράζεται αποκλειστικά το Sry, κατευθύνουν τη διαφοροποίηση άλλων κυτταρικών τύπων της αρσενικής γονάδας. Για παράδειγμα, η διαφοροποίηση των κυττάρων Leydig, από τα μεσεγγυματικά κύτταρα, μεταξύ των σπερματικών χορδών, μεταξύ 8ης και 9ης εβδομάδας, στον άνθρωπο, εξαρτάται από παρακρινή σήματα, μέσω της εξωκυττάριας πρωτεΐνης Desert Hedgehog, που εκκρίνεται από τα κύτταρα Sertoli. Παρατηρείται ταχεία αγγείωση του οργάνου και η σχηματιζόμενη ορχική αρτηρία αποτελεί ένα από τα αρχικά μορφολογικά γνωρίσματα του διαφοροποιούμενου όρχι. Τα στοιχεία του συνδετικού ιστού και τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν μία στιβάδα, τον ινώδη χιτώνα, ο οποίος χωρίζει τις σπερματικές χορδές από τα υπερκείμενα κύτταρα του κοιλωματικού επιθηλίου.

4. Η διαφοροποίηση της ωοθήκης και το γονίδιο Dax1

Όταν πρόκειται για έμβρυα XY το γονίδιο Dax1 (DSS-AHC critical region on the X chromosome gene 1) εντοπίζεται στην αδιαφοροποίητη γεννητική ακρολοφία στα σωματικά κύτταρα που προορίζονται να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα Sertoli. Καθώς η ανάπτυξη του όρχι προχωρά η έκφραση του ελαττώνεται στην αρσενική γονάδα, διατηρείται όμως, κατά την αντίστοιχη περίοδο, στις αναπτυσσόμενες ωοθήκες. Αυτό σημαίνει ότι το Dax1 εμπλέκεται στον φυλετικό καθορισμό υπό την έννοια ότι η παράταση της έκφρασής του στην γοναδική καταβολή είναι ασυμβίβαστη με την ανάπτυξη του όρχι. Για το λόγο αυτό χαρακτηρίζεται και ως αντι-ορχικό γονίδιο, μάλλον, παρά ως γονίδιο υπεύθυνο για την ανάπτυξη της ωοθήκης.

Η σημασία του γονιδίου φαίνεται από το αποτέλεσμα του διπλασιασμού του στα αρσενικά. Στην περίπτωση αυτή και ανεξάρτητα από την έκφραση των SRY και SOX9, το DAX1 προκαλεί τη θηλεοποίηση της γεννητικής οδού, λόγω αμέσου

ανταγωνισμού με την SF1, μία διεργασία που χαρακτηρίζεται ως αντιστροφή του φύλου (θήλεια 46,XY) εξαρτώμενη από τη δόση (DSS). Στο XX έμβρυο, το γονίδιο Wnt4 καταστέλλει τη μεταγραφή του Fgf9 και με αυτόν τον τρόπο σηματοδοτείται η έναρξη διαφοροποίησης της ωοθήκης.

Η παρούσα εισήγηση πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΣ» που επιχορηγείται από τον ΕΛΚΕ, Κ.Α. 70/4/6574.

Βιβλιογραφία

1. Jost A. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. Arch Anat Microsc Morph Exp 1947; 36: 271-315.
2. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature 1991; 351:117-121.
3. Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. Nature Reviews/Genetics 2004; 5: 509-521.
4. Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cigliati T, Zhao L, Zhao Y, et al. The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. Nature 2000; 403, 909-913.
5. Ikeda Y, Shen W-H, Ingraham HA, Parker KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. Mol Endocrinol 1994; 8:654-662.
6. Wilhelm D, Englert C. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. Genes Dev 2002; 16:1839-1851.
7. Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, Nemer M. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. Development 1998; 125:2665-2675.
8. Griswold SL, Behringer RR. Fetal Leydig Cell Origin and Development. Sex Dev 2009; 3: 1-15.
9. Sekido R, Lovell-Badge R. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? Trends Genet 2008; 25: 19-29.
10. Sim H, Argentaro A, Harley VR. Boys, girls and shuttling of SRY and SOX9. Trends Endocrinol Metab 2008; 19: 213-222.

Ερωτήσεις πολλαπλής επιλογής

1. Πώς ελέγχεται η ανάπτυξη του φαινοτυπικού φύλου;
 - α. από τη λειτουργική διαφοροποίηση των γονάδων
 - β. από την εκκριτική δραστηριότητα των επινεφριδίων
 - γ. από την υπόφυση
2. Ποιος είναι ο ρόλος του γονιδίου SRY στην οντογένεση των γονάδων;
 - α. προκαλεί την εκφύλιση των μεσονεφρικών πόρων
 - β. αποτελεί το ορχεοκαθοριστικό γονίδιο
 - γ. οδηγεί σε αποσιώπηση καθοδικών γονιδίων
3. Πότε εμφανίζεται το σύστημα των γεννητικών πόρων Wolff και Müller στο ανθρώπινο έμβρυο;
 - α. την 4η εμβρυϊκή εβδομάδα
 - β. παράλληλα με τη γοναδική καταβολή
 - γ. 7η εμβρυϊκή εβδομάδα
4. Ποιά είναι τα παράγωγα των πόρων του Wolff;
 - α. τα εσωτερικά γεννητικά όργανα του αρσενικού
 - β. η γοναδική καταβολή
 - γ. ο μεσόνεφρος και ο μετάνεφρος
5. Ποια ορμόνη του εμβρυϊκού όρχι αναστέλλει την ανάπτυξη των πόρων του Müller;
 - α. η αντιμυλλέριος ορμόνη -AMH
 - β. η Insl3
 - γ. η τεστοστερόνη
6. Ποιος είναι ο ρόλος του γονιδίου Wnt4 στη διαφοροποίηση της ωσθήκης;
 - α. καταστέλλει τη μεταγραφή του Fgf9
 - β. ανταγωνίζεται το Sf-1
 - γ. είναι ομόλογος του Dax1

Σωστές απαντήσεις κατά σειρά
α,β,γ,α,α