

SRY И SOX9 — ГЛАВНЫЕ ФАКТОРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© В. Г. Кожухарь

С.-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия;
электронный адрес: V. Kojukhar@yandex.ru

Прошло более 20 лет с открытия гена *SRY* (в геноме мыши обозначается *Sry*), который инициирует процесс детерминации и дифференцировки мужского пола у млекопитающих. Фактор *SRY* является ключевым триггером данного процесса, активируя экспрессию аутосомного гена *SOX9*. Транскрипт последнего представляет собой главный регулятор дифференцировки клеток Сертоли и развития гонады по мужскому типу. В обзоре обсуждены особенности экспрессии генов *SRY* и *SOX9*, внутриклеточный транспорт и мишени их транскриптов, механизмы начальной дифференцировки пола гонад, взаимодействие сигнальных путей, определяющих мужской или женский тип развития. Также сопоставлена роль *SRY* и *SOX9* в эволюционном аспекте, что позволяет судить о высокой консервативности процесса дифференцировки мужской гонады в ряду позвоночных и роли *SOX9* в качестве главного фактора данного процесса.

Ключевые слова: детерминация пола, *SRY*, *SOX9*, HMG-домен, NLS, экспрессия генов, клетки Сертоли, эволюция Y-хромосомы.

Детерминация и дифференцировка пола представляют собой чрезвычайно сложный каскад процессов. Только в пределах временного окна детерминация пола гонады XY у мыши (стадия E 11.5) активируется 266 генов и инактивируется более чем 50 (Beverdam, Koopman, 2006). Однако в качестве ключевых факторов детерминации пола у млекопитающих выступают 2 гена: *SRY* и *SOX9* (в геноме мыши соответственно *Sry* и *Sox9*). Первый был открыт в 1990 г. (Gubbay et al., 1990; Koopman et al., 1990; Sinclair et al., 1990), второй идентифицирован в 1994 г. (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994). С тех пор на протяжении 20 с небольшим лет оба названных гена и их транскрипты находятся в зоне повышенного внимания исследователей. Выполнено огромное количество работ, посвященных их роли (а эта роль — главная) в генетической детерминации мужского пола. Можно сказать, что произошла настоящая революция в представлениях о детерминации и дифференцировке пола млекопитающих. К сожалению, в отечественной литературе это не нашло достойного отражения. Настоящий обзор представляет попытку восполнить в некоторой степени данный пробел.

Ген *SRY* и его транскрипт

Роль *Sry* (sex-determining region Y) в тестикулярной дифференцировке была подтверждена экспериментально путем трансгенеза в опытах на мышах. Производился перенос *Sry* в зиготу с кариотипом XX. В результате развивалось животное с мужским фенотипом (Koopman et al., 1991). Наоборот, у мышей XY *Sry* $-/-$ гонада формировалась как яичник, и дальнейшее развитие половой системы шло по женскому типу (Lovell-Badge, Robertson, 1990;

Gubbay et al., 1992). В клинической практике мутации *SRY* были выявлены у женщин с кариотипом 46, XY и картиной чистого гонадного дисгенеза (McElreavey et al., 1992).

Ген *SRY* находится в дистальном отделе короткого плеча Y-хромосомы в непосредственной близости от псевдоаутосомной области PAR1 (pseudoautosomal region 1). PAR1 и PAR2 (на длинном плече Y-хромосомы) — единственные фрагменты Y-хромосомы, которые участвуют в мейотической рекомбинации с гомологичными последовательностями X-хромосомы во время фазы роста при сперматогенезе. Близость *SRY* к PAR1 создает предпосылку его транслокации в X-хромосому. Этим объясняется 80 % случаев развития мужчин с генотипом XX (Weil et al., 1994). У человека *SRY* имеет небольшой размер, не содержит интронов и кодирует белок, включающий в себя 204 аминокислоты. *SRY* является основным членом семейства транскрипционных факторов SOX (*SRY*-related HMG-box). Это семейство широко представлено у многих видов животных: у мыши и человека имеется по 20 его членов. В составе *SRY* (как и во всех генах транскрипционных факторов семейства SOX) имеется единственная консервативная последовательность — домен HMG-box (high mobility group), кодирующий белок размером 80 аминокислотных остатков. Специфические точковые мутации или делеции в HMG-боксе гена *Sry* приводят к инверсии пола (Harley et al., 1992). Белок, кодируемый HMG-боксом, специфически связывается с последовательностью (A/T)AACA(A/T/A) в составе ДНК, что вызывает изгибание ее молекулы на 60—85° (Harley, Goodfellow, 1994; Harley et al., 2003a).

Данное изменение конформации может приводить к сближению ДНК-последовательностей и тем самым вызывать взаимодействие регуляторов транскрипции как

между собой, так и с протеином SRY (Ferrari et al., 1992; Harley et al., 2003a). Также SRY может участвовать в remodelировании хроматина (Giese et al., 1994; Pontiggia et al., 1994). При переносе мышам XX трансгена *SRY* человека или козла происходит развитие гонады по мужскому типу (Lovell-Badge et al., 2002; Pannetier et al., 2006). Это доказывает ведущую роль в функции SRY высококонсервативного домена HMG, в то время как другие домены функционально неактивны либо консервативны в функциях, но не в последовательностях. В пользу последнего утверждения говорит и тот факт, что *in vitro* SRY человека может полноценно связываться с ДНК только в случае, когда его молекула имеет полную длину, т. е. включает в себя все имеющиеся в ней последовательности (Sanchez-Moreno et al., 2008). Особенно важен в данном процессе С-конец SRY, так как потеря именно этого конца приводит к уменьшению связывающей способности протеина с ДНК. В то же самое время потеря N-конца не изменяет связывающую способность SRY с ДНК.

Протеин SRY помимо связывания с ДНК взаимодействует и с другими белками, в результате чего он может перемещаться в клеточное ядро, а также распознавать гены-мишени и модулировать свою активность. Подобно другим факторам семейства SOX, протеину SRY, как правило, необходимо взаимодействовать с другими белковыми ко-факторами, образуя активный протеиновый комплекс, который обеспечивает более точное узнавание нужной мишени среди нескольких мишеней с похожими участками связывания (Kamachi et al., 1999, 2000; Wilson, Koopman, 2002; Smith, Koopman, 2004).

В частности, SRY взаимодействует с протеином WT1 (Wilms tumor 1), связываясь доменом HMG с доменом WT1, содержащим цинковый палец. Образовавшийся комплекс активирует транскрипцию промотора, содержащего SRY-связывающие участки, что в свою очередь способствует связыванию SRY с мишенями (мишенью) и регуляторному влиянию на их транскрипцию (Matsuzawa-Watanabe et al., 2003). Взаимодействие WT1—SRY оказывается важным для дифференцировки яичка человека из индифферентной гонады. При мутации *WT1* развивается синдром Денис—Драш, при котором среди прочих патологических проявлений имеют место мужской псевдогермафродитизм и недоразвитие гонад.

Получены интересные результаты по взаимодействию SRY с протеином KRAB-O (Kruppel-associated box domain only) (Oh et al., 2005; Peng et al., 2009). Названный белок сам является транскрипционным фактором, содержащим домен KRAB (цинковый палец), с помощью которого присоединяется к определенной последовательности в составе гена-мишени. Домен KRAB взаимодействует непосредственно с KAP1 (KRAB-associated protein 1), который рекрутирует HP1 (heterochromatin protein 1), гистон-деацетилазу и метилтрансферазу — факторы, модифицирующие гистоны и тем самым remodelирующие структуру хроматина. Таким образом, осуществляется регулирование транскрипционной активности гена-мишени. SRY прикрепляется к KRAB-O с помощью домена BRG (bridge), а далее использует KAP1 и ассоциированный с ним HP1 в качестве вспомогательной структуры (выступающей в качестве строительных лесов), с помощью которой домен HMG протеина SRY, связанного с KRAB-O, взаимодействует с определенными последовательностями гена-мишени. В результате SRY оказывает влияние на ген-мишень, вызывая remodelирование хроматина и регулируя его транскрипционную активность

(Oh et al., 2005; Peng et al., 2009). SRY в этой схеме взаимодействует с геном-мишенью при помощи посредника, коим является транскрипционно-регуляторный комплекс KRAB—KAP1—HP1. Интересно отметить, что последовательность аминокислот в домене BRG (домен связывания с KRAB-O) консервативна у человека и ряда млекопитающих, в связи с чем описанный механизм можно рассматривать как универсальный.

Выявлено более 100 генов *KRAB*, экспрессирующихся в эмбриональной гонаде мыши. Среди их транскриптов 19 относятся к группе KRAB-O и экспрессируются в соматических клетках гонады на стадии E 11.5. Проведены опыты *in vitro* с избирательным выключением функции KRAB-O при помощи shPHK (small hairpin PHK), в результате чего снижалась активность Sox9 (Polanco et al., 2009). Авторы объясняют данный эффект тем, что KRAB-O является посредником для Sry в активации Sox9. Однако *in vivo* частичная потеря функции KRAB-O может маскироваться вследствие некоторой избыточности экспрессии многочисленного кластера генов *KRAB-O*.

Протеин Sry также образует комплекс с белком SIP1 (SRY-interacting protein 1), который модулирует взаимодействия Sry с другими транскрипционными факторами (Poulat et al., 1997; Harley et al., 2003a; Thevenet et al., 2004) и с белком PARP1 [Poly(ADP-ribose) polymerase] (Li et al., 2006). Все исследования по данным белковым комплексам выполнены *in vitro* и демонстрируют модулирующее влияние перечисленных протеинов на возможности SRY связываться с мишенями. Имеются данные о том, что мутации в участках связывания SRY человека с KRAB-O и SIP1 вызывают у людей с генотипом XY инверсию пола, что косвенно подтверждает участие названных белков в функции SRY (Shahid et al., 2004). Однако *in vivo* эти механизмы не изучены, а потому требуют уточнения.

Молекула протеина SRY имеет участки, являющиеся мишенями для ацетилирования и фосфорилирования, а также участки связывания с белками, осуществляющими перенос SRY в клеточное ядро. Участки связывания с белками-переносчиками расположены в области N- и С-концов по краям домена HMG и проявляют консервативность у человека и мыши (Sudbeck, Scherer, 1997). Эти участки связывания получили название NLS (nuclear localization signals). В качестве белков-переносчиков выступают кальцийсвязывающий белок кальмодулин (Harley et al., 1996; Kelly et al., 2003; Sim et al., 2005) и белок ядерного импорта импортин-бета (Forwood et al., 2001; Harley et al., 2003b; Sim et al., 2005). Импортин-бета связывается с С-концом домена HMG, а кальмодулин — с N-концом (Sim et al., 2005, 2008). Существует механизм, регулирующий предпочтительное связывание SRY NLS с кальмодулином или импортин-бета. Это зависит от внутриклеточной концентрации Ca^{2+} : ее повышение переключает связывание SRY NLS на кальмодулин, а понижение — на импортин-бета (Kaur, Jans, 2011). Действие SRY как транскрипционного регулятора осуществляется в клеточном ядре, куда он активно переносится с помощью названных белков. Важно отметить, что мутации генов кальмодулина и импортин-бета приводят к реверсии мужского пола у человека, что доказывает необходимость их функции в детерминации пола: случаи реверсии пола могут быть объяснены уменьшением ядерного импорта SRY (Battiloro et al., 1997; Vietia et al., 1997; Li et al., 2001; Harley et al., 2003b; Smith, Koopman, 2004; Sim et al., 2005).

Механизм данного явления недавно был изучен *in vitro* на мышях XY при ингибировании кальмодулина с по-

мощью его антагониста CDZ (calmidazolium) (Sim et al., 2011). CDZ уменьшает связывающую способность кальмодулина, снижая его взаимодействие с белком Sry, в результате чего страдают транспорт, накопление в клеточном ядре, а в конечном итоге транскрипционная активность Sry. Последнее приводит к снижению уровня экспрессии гена *Sox9* (мишени Sry), а вследствие этого к нарушению формирования закладок извитых семенных канальцев и эктопической экспрессии маркеров яичника (Sim et al., 2011). Следовательно, кальмодулин участвует не только в ядерном импорте SRY, но и опосредованно в детерминации пола и дифференцировке гонад по мужскому типу.

Взаимодействие SRY с импортин-бета активируется вследствие ацетилирования соответствующего участка-мишени ферментом ацетилтрансфераза p300 (Thevenet et al., 2004; Sim et al., 2008), что в конечном итоге способствует транспорту SRY в клеточное ядро. Наоборот, специфическое деацетилирование гистон-деацетилазой-3 нарушает транспорт SRY в ядро и тем самым провоцирует его накопление в цитоплазме (Thevenet et al., 2004; Sim et al., 2008). В ядре SRY реализует функцию транскрипционного регулятора, связываясь своим доменом HMG с ДНК. Способность связываться с ДНК повышается в результате фосфорилирования молекулы SRY АТФ-зависимой протеинкиназой. Таким образом, фосфорилирование SRY увеличивает его ДНК-связывающую способность и соответственно его активность как транскрипционного фактора (Desclozeaux et al., 1998a).

К настоящему времени, кроме домена HMG в SRY различных млекопитающих, не обнаружено других консервативных последовательностей. Области SRY вне домена HMG столь быстро эволюционировали, что у разных видов животных невозможно установить какие-либо параллели в их структуре (Whitfield et al., 1993; Pamilo, O'Neill, 1997; Harley et al., 2003a).

Экспрессия гена SRY

Активность гена *Sry* отмечается в эпителиальных клетках индифферентной гонады XY (предшественники клеток Сертоли) непосредственно перед началом дифференцировки по мужскому типу (Koopman et al., 1990; Hacker et al., 1995; Salas-Cortes et al., 1999; Albrecht, Eicher, 2001; Bullejos, Koopman, 2001; Sekido et al., 2004; Wilhelm et al., 2005) и не зависит от присутствия гоноцитов. Микроокружение индифферентной гонады XY создает уникальные условия для реализации начала экспрессии *Sry*, приводящей в конечном итоге к дифференцировке клеток Сертоли. Эктопическая экспрессия *Sry* вне гонадного микроокружения не может вызвать развитие клеток Сертоли (Kidokoro et al., 2005). Это же косвенно подтверждается тем, что уровень метилирования гена *Sry* в эпителиальных клетках индифферентной гонады XY и в других тканях принципиально различается: в первом случае имеет место снижение метилирования, во втором — повышение (Nishino et al., 2004).

Активность *Sry* ограничена по месту и времени. У мыши она проявляется в очень узком временном интервале: экспрессия *Sry* начинается на стадии E 10.5 в соматических клетках полового валика гонады XY, достигает пика к стадии E 11.5 и затухает к стадии E 12.5 (Koopman et al., 1990; Hacker et al., 1995; Jeske et al., 1995; Bullejos, Koopman, 2001; Wilhelm et al., 2005). В каждой отдельной

клетке полового валика *Sry* экспрессируется в течение не более 8 ч (Wilhelm et al., 2005; Maatouk, Capel, 2008; Sekido, 2010). Несмотря на то что экспрессия *Sry* происходит непосредственно в предшественниках клеток Сертоли, для их дальнейшей дифференцировки и становления их фенотипа не требуется транскрипта *Sry*.

У мыши имеет место уникальный пространственно-временной паттерн экспрессии *Sry*. Она начинается в предшественниках клеток Сертоли в центральном отделе полового валика (E 10.5—11) и только через несколько часов (к стадии E 11.5) распространяется в головном и хвостовом направлениях по всей длине зачатка гонады. Таков же и паттерн угасания экспрессии *Sry* — от центра к периферии в передне-заднем направлении (Albrecht, Eicher, 2001; Bullejos, Koopman, 2001; Sekido et al., 2004; Wilhelm et al., 2005). Вследствие этого не все участки полового валика подвержены воздействию транскрипта *Sry* в одно и то же время. Данный факт говорит в пользу представления о том, что *Sry* функционирует в пределах критического временного окна в каждой отдельной клетке. Экспериментальное подтверждение наличия такого временного окна было дано в опытах с трансгенезом *Sry*, когда начало его экспрессии можно было варьировать по времени (Hiramatsu et al., 2009). Авторы установили, что 6-часовая задержка начала экспрессии *Sry* приводит к невозможности дальнейшего развития гонады по мужскому типу.

Кроме того, для того чтобы запустить программу развития клетки Сертоли из эпителиальной клетки индифферентной гонады, уровень экспрессии *Sry* в каждой отдельной клетке должен достигнуть определенного порога. В противном случае (если этот порог не будет достигнут или будет достигнут позже критического временного окна) развитие клетки пойдет по женскому пути, т. е. пути формирования фолликулярной клетки (Kashimada, Koopman, 2010). В дополнение к этому необходимо, чтобы и количество клеток, начавших дифференцировку как предшественники клеток Сертоли, достигло определенного порога (тогда доза *Sry* каждой клетки умножается на их общее количество). Только в этом случае формирование гонады пойдет по мужскому пути. В пользу данных представлений говорят и результаты опытов с химерными мышами. При развитии химерных мышей XX↔XY было показано, что гонада развивалась как семенная, если соматические клетки XY составляли не менее 35—40%. В случае, если их было менее 10%, развивался яичник, а если от 10 до 35% — овотестис (Burgoyne et al., 1988; Palmer, Burgoyne, 1991).

Хотя первоначально активность SRY была выявлена только в клетках полового валика, в дальнейшем у некоторых видов млекопитающих (в том числе человека) она также была обнаружена в ряде других тканей развивающегося зародыша (Clepet et al., 1993; Kashimada, Koopman, 2010). Кроме того, экспрессия SRY проявляется у взрослого человека в гипоталамусе и коре головного мозга (Mayer et al., 1998; Dewing et al., 2006), а у мыши в различных отделах головного мозга (Mayer et al., 2000). Там же были определены потенциальные мишени для Sry: ген P450 ароматазы (Loffler, Koopman, 2002), ген тирозингидроксилазы (TH) (Milsted et al., 2004; Dewing et al., 2006) и ген моноаминоксидазы А (MAO-A) (Wu et al., 2009). Выяснено предположение о том, что *Sry* играет некую роль в становлении половой детерминации мозга, хотя никаких конкретных механизмов действия Sry в развивающемся головном мозге в плане половой дифференцировки

до сих пор не выявлено (Wilson, Davis, 2007; Turner et al., 2011). Считается, что ген *SRY* эволюционировал из *SOX3*, который связан с X-хромосомой, является членом группы генов *SoxB1* и ответствен за развитие нервной системы (Turner et al., 2011). *SRY* экспрессируется в органах не только центральной, но и периферической нервной системы, где он участвует в модулировании функций катехоламинов. Предположительно *SRY* должен иметь соответствующие функциональные последовательности (Turner et al., 2011).

Момент активации гена *SRY* в индифферентной эмбриональной гонаде важен, так как эта активация происходит у всех видов животных непосредственно перед началом половой дифференцировки. Продолжительность экспрессии *SRY* не столь важна: необходимо, чтобы она была достаточной для включения экспрессии гена *SOX9* и запуска программы дифференцировки пола гонады, т. е. обязательно должна достигнуть нужного уровня в коротком временном окне. Что касается затухания экспрессии *SRY*, то длительность этого процесса не столь актуальна: она может прекращаться быстро (у мыши) или сохраняться в течение более продолжительного периода. Поэтому длительность экспрессии *SRY* в гонаде сильно варьирует у разных видов. Так, ее временной паттерн у человека существенно отличается от такового мыши: у человека экспрессия *SRY* начинается с 41-х сут эмбриогенеза, достигает пика на 44-е сут, потом происходит постепенное ее угасание в течение 18 нед. Однако экспрессия *SRY* обнаруживается не только после детерминации пола, но даже после рождения (Hanley et al., 2000).

Мишени SRY

В качестве главной прямой мишени для *SRY* рассматривается ген *SOX9*. Последний является ключевым геном в дифференцировке гонады, а вследствие этого и всей половой системы по мужскому типу. *SRY* действует как триггер экспрессии *SOX9*, связываясь с особой регуляторной зоной последнего (подробнее см. ниже).

Помимо *SOX9*, имеется несколько дополнительных мишеней для *SRY*. Так, было показано, что *in vitro* *SRY* человека и мыши связывается с бета-катенином и тормозит сигнальный путь опосредованных бета-катенином генов (Bernard et al., 2008; Tamashiro et al., 2008; Lau, Li, 2009). Прежде всего это гены, определяющие женский путь развития гонады: *WNT4* (wingless-type MMTV integration site family 4) и *RSPO1* (R-spondin 1). Транскрипт *RSPO1* стимулирует экспрессию *WNT4*. Бета-катенин представляет собой внутриклеточный мессенджер, занимающий в данном сигнальном пути промежуточное положение между *RSPO1* и *WNT4* (Liu et al., 2009). Он отвечает за передачу сигналов и вследствие этого — за активацию генов женского пути развития, являясь важным фактором дифференцировки гонады по женскому типу. *SRY* человека и мыши тормозят сигнальный путь *RSPO1/WNT4/бета-катенин* посредством связывания и инактивации бета-катенина. *SRY* взаимодействует *in vitro* с бета-катенином, в результате чего последний накапливается в клеточном ядре в виде специфических ядерных телец (Bernard et al., 2008). Связывающая активность зависит от присутствия в протеинах *SRY/Sry* домена, богатого глутамином. В HMG-боксе *SRY* человека содержание глутамина достаточно для непосредственного связывания с бета-катенином. У мыши его содержание в домене HMG недостаточно, поэтому в процессе свя-

зывания с бета-катенином помимо HMG задействован еще один домен (Lau, Li, 2009). Таким образом, *SRY* тормозит транскрипционную активность генов-мишеней *RSPO1/WNT4*, вовлеченных в развитие яичника, опосредованно направляя дифференцировку гонады по мужскому пути.

Другой дополнительной прямой мишенью для *Sry* является ген *Cbln4* (cerebellin 4 precursor), что было экспериментально установлено на мышах *in vivo* с помощью метода хроматин-иммунопреципитации (Bradford et al., 2009a). Транскрипт данного гена представляет собой трансмембранный белок, роль которого в дифференцировке мужской гонады не установлена.

Недавно была выявлена еще одна прямая мишень *SRY* — промотор гена нейротропина 3 *Ntf3* (neurotrophic factor 3) (Clement et al., 2011). Нейротропин 3 синтезируется в эмбриональных клетках Сертоли и действует как хемоаттрактант для клеток, мигрирующих из мезонефроса в формирующуюся мужскую гонаду. В составе промотора *Ntf3* имеется по крайней мере один участок связывания *SRY*. Эксперименты *in vitro* показали, что *Sry* и *Sox9* активируют промотор *Ntf3*, связываясь именно с этим участком. При мутации в области данного участка транскрипты *SRY* и *SOX9* не могут взаимодействовать с *Ntf3*. С помощью метода хроматин-иммунопреципитации *in vivo* было установлено, что промотор гена *Ntf3* является также прямой мишенью и для *SRY* крысы (Clement et al., 2011). В результате происходит активация транскрипции мРНК нейротропина 3, что в конечном итоге способствует миграции клеток мезонефроса в эмбриональную гонаду и дифференцировку последней по мужскому типу.

Помимо прямой регуляции транскрипционной активности различных генов протеин *SRY* участвует в сплайсинге мРНК вследствие чего является не только транскрипционным фактором, но также и посттранскрипционным регулятором (Ohe et al., 2002).

Регуляция экспрессии SRY

Несмотря на то что специфический пространственно-временной паттерн экспрессии *Sry* (прежде всего у мыши) исследован достаточно обстоятельно, регуляция этой экспрессии до сих пор изучена недостаточно. Как уже упоминалось, кроме домена HMG в составе *SRY* не выявлено консервативных последовательностей, поэтому универсальных регуляторных элементов не найдено. При сравнительном анализе у разных видов млекопитающих (человек, бык, свинья и коза) удалось обнаружить 4 достаточно консервативные последовательности в составе *SRY* ДНК в направлении 5' (Ross et al., 2008). Считать данную область регуляторным элементом пока нет оснований, так как функциональное значение этих последовательностей еще не определено.

В качестве активатора *SRY* рассматривается прежде всего протеин *WT1* — транскрипт супрессорного гена опухоли Вилмса (Wilms tumor 1). *WT1* выполняет много различных функций: он участвует в формировании закладок индифферентных гонад — половых валиков, активирует экспрессию *SF1* (steroidogenic factor 1) и ряда других генов, вовлеченных в развитие половой системы. Данный белок в результате альтернативного сплайсинга может иметь 24 изоформы. В детерминации пола важны две изоформы: с наличием или отсутствием аминокислотных триплетов KTS — (+KTS) и (–KTS). Так, у мышей XY с

мутацией одной аллели *Wtl* (+*KTS*) развивается картина синдрома Фрейзера с реверсией пола вследствие снижения уровня экспрессии *Sry* (Hammes et al., 2001; Wagner et al., 2003). В центральной зоне промотора *SRY* человека описана последовательность, представляющая собой участок связывания WT1 (Hossain, Saunders, 2001). В составе генов *SRY* всех изученных млекопитающих также имеются консервативные участки связывания, с которыми взаимодействует WT1 (Polanco, Koorman, 2007).

В эксперименте *in vivo* на мышах установлено, что *Wtl* (+*KTS*) активирует экспрессию *Sry*, действуя аутокринно в каждой клетке (Bradford et al., 2009b). Имеются данные о том, что *Wtl* (+*KTS*) оказывает влияние на *Sry* при участии протеина Sfl и что этот эффект осуществляется с помощью транскрипционного кофактора Cbx2 (chromobox homologue 2) и рецепторов Ir, Irr, Igflr инсулинового сигнального пути (Nef et al., 2003; Sekido, Lovell-Badge, 2009). Процесс детерминации пола очень чувствителен к дозе регулирующих его генов и уровням транскрипционных факторов. Так, установлено, что транскрипционный кофактор CITED2 (Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2) участвует в процессе нарастания дозы *SRY*. В эмбриональной гонаде мыши Cited2 сначала взаимодействует с *Wtl*, после чего их комплекс стимулирует транскрипцию *Sfl*. Ген *Sry* оказывается мишенью регуляторного пути Cited2/*Wtl*/*Sfl* (Buaas et al., 2009). В результате экспрессия *Sry* нарастает, стремясь достигнуть критического порога, необходимого для дозозависимого эффекта. Впрочем, есть сведения о том, что SF1 оказывает и прямое активирующее воздействие на промотор *SRY*. Эти результаты были получены *in vitro* на зародышах свиньи (Pilon et al., 2003). На клетках тератокарциномы человека *in vitro* также было показано прямое активирующее действие SF1 на ген *SRY* (De Santa Barbara et al., 1998b).

Wtl (+*KTS*) помимо регуляции транскрипции может действовать в качестве регулятора трансляции, стабилизируя *Sry* мРНК (Bor et al., 2006). Суммарный эффект снижения уровня *Sry* у мышей с мутациями по *Wtl* (+*KTS*) может быть связан как с уменьшением количества клеток, участвующих в трансляции *Sry*, так и со снижением уровня трансляции каждой отдельной клеткой (Polanco, Koorman, 2007).

В качестве активаторов *Sry* рассматриваются транскрипционный фактор GATA4 и корепрессор FOG2 (friend of GATA2) (Tevosian et al., 2002), а также фермент MAP3K4 (mitogen-activated protein 3 kinase 4) (Bogani et al., 2009). Отсутствие названных факторов вызывает реверсию пола у мышей XY, однако механизм их действия не вполне ясен, так как FOG2 чаще вовлечен не в активацию, а в репрессию промоторов различных генов в эмбриональной гонаде (Robert et al., 2002), а MAP3K4 вообще не является транскрипционным фактором. Что касается действия транскрипционного комплекса GATA4/FOG2, то его эффект в качестве фактора, обеспечивающего дифференцировку по мужскому типу, может быть связан не только с поддержанием экспрессии непосредственно *Sry*, но также и его главной мишени — *Sox9*, чему есть экспериментальное подтверждение (Manuylov et al., 2007) (подробнее см. ниже). Транскрипционный фактор GATA4 может кооперироваться с протеином WT1, усиливая его взаимодействие с промотором *SRY* у человека, мыши и свиньи (Miyamoto et al., 2008). В синергизме GATA4/WT1 ведущая роль принадлежит фактору WT1. Только у свиньи GATA4 способен оказывать самостоятельное прямое дей-

ствие на промотор *SRY* (без образования комплекса с WT1).

В процессе активации *SRY* участвует широко вовлеченный в генную экспрессию в эмбриогенезе транскрипционный фактор SP1 (specificity protein 1). Мутации, нарушающие связывание данного фактора с промотором гена *SRY*, вызывают реверсию мужского пола у человека (Desclozeaux et al., 1998b; Assumpcao et al., 2005). Сравнительно недавно у мыши был описан еще один потенциальный регулятор *Sry* — участок хромосомы 1 между 33 и 49сМ (Munger et al., 2009). Данный участок, по мнению авторов, контролирует экспрессию *Sry*, но какие именно гены имеют к этому отношение, не установлено.

Факторы, тормозящие экспрессию *Sry*, изучены достаточно слабо. Одним из таковых, вероятно, является протеин Sox9. Известно, что экспрессия гена *Sry* у мыши затухает после активации гена *Sox9*, который «подхватывает» функцию *Sry* (являясь его гомологом и заместителем в дальнейшей дифференцировке пола, — подробнее см. ниже). Экспериментально в органной культуре у мышей *Sox9* $-/-$ было показано, что экспрессия *Sry* не выключается, а устойчиво продолжается по крайней мере до стадии E 13.5 (Chaboisser et al., 2004; Barrionuevo et al., 2006; Sekido, Lovell-Badge, 2009). По мнению авторов, одной из функций Sox9 является торможение экспрессии *Sry* посредством прямого или непрямого действия вскоре после того, как сам ген *Sox9* был активирован транскриптом *Sry*.

В качестве репрессора *SRY* может выступать дозозависимый фактор DAX1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenital, X chromosome). Однако он действует опосредованно через SF1, подавляя транскрипционную активность последнего (Harley et al., 2003a).

Ген *SOX9* и его транскрипт

Аутосомный гомолог гена *SRY* — ген *SOX9*. У человека данный ген локализован в дистальном отделе длинного плеча хромосомы 17 и кодирует белок из 509 аминокислот. У мыши ген *Sox9* входит в состав хромосомы 11. *SOX9* относится к семейству генов *SOX* (*SRY*-related HMG box), группе SoxE, для которых характерна экспрессия в раннем эмбриогенезе. Последовательности генов *SOX* включают в себя домен HMG, который более чем на 60 % гомологичен HMG-боксу гена *SRY*. Помимо домена HMG белок *SOX9* содержит домен трансактивации в области С-конца (Vidal et al., 2001; Knowler et al., 2003). Наличие домена HMG делает *SOX9* классическим архитектурным транскрипционным фактором: он обладает способностью связываться с определенными последовательностями ДНК и изгибать ее молекулу. Несмотря на небольшие различия в длине белковых молекул *SOX9* у млекопитающих, а также рыб, амфибий и рептилий, во всех присутствуют одинаковые домены. Последнее говорит о высокой консервативности *SOX9* в эволюции (Knowler et al., 2003).

Роль гена *SOX9* в детерминации и дифференцировке пола была установлена при изучении новорожденных с синдромом кампомелической дисплазии. При названном синдроме имеют место тяжелые врожденные дефекты развития хрящевой и костной тканей с деформациями скелета, отсутствие обонятельных луковиц и нервов, гипоплазия почек, легких, пороки сердца и ряд других изменений. В 75 % случаев при данном синдроме наблюдается

реверсия мужского пола, связанная с нарушением дифференцировки клеток Сертоли (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994).

Для развития кампомелической дисплазии с реверсией пола XY у человека достаточно мутации одной аллели *SOX9* (Kobayashi et al., 2005). Напротив, при инактивации одной аллели *Sox9* у мыши XY реверсии пола не происходит, а при мутации *Sox9* $-/-$ зародыши погибают сразу после стадии E 11.5, т. е. до дифференцировки пола гонад. В связи с этим данную мутацию невозможно изучить в обычных условиях *in vivo*. При культивировании гонады XY *Sox9* $-/-$ *in vitro* (Chaboissier et al., 2004; Kobayashi et al., 2005) или при использовании *in vivo* системы *Cre/Lox* (Barrionuevo et al., 2006) всегда развивается полная реверсия пола. В эксперименте на мышах XX с трансгенезом *Sox9* показано, что даже при естественном отсутствии *Sry* гиперэкспрессия *Sox9* приводит к реверсии женского пола и развитию нормальных мужских гонад (Bishop et al., 2000; Vidal et al., 2001). Точно так же у мышей XY в отсутствие *Sry*, но при гиперэкспрессии *Sox9* формируются нормальные семенники (Qin, Bishop, 2005).

Протеин SOX9 первоначально локализован в цитоплазме эпителиальных клеток индифферентной гонады обоего пола. Задержка SOX9 в цитоплазме предположительно обусловлена его взаимодействием с тубулином микротрубочек цитоскелета (Malki et al., 2005a). В начале процесса детерминации пола (у мыши — со стадии E 11.5) *Sox9* транспортируется в ядро, где реализует функцию транскрипционного фактора (Morais da Silva et al., 1996; De Santa Barbara et al., 2000). Происходит это прежде всего в мужской гонаде, в дифференцировке которой SOX9 играет роль ключевого фактора. Молекулы SOX9, так же как SRY, имеют 2 участка связывания NLS. С-конец SOX9 взаимодействует с импортином-бета, а N-конец — с кальмодулином (Sim et al., 2005, 2008; Malki et al., 2010). Названные белки обеспечивают перенос SOX9 из цитоплазмы через ядерные поры в ядро. Соединение с импортином-бета и ядерный импорт усиливаются при фосфорилировании SOX9, которое запускается простагландином D2 (PGD2) и происходит с помощью АМФ-зависимой протеинкиназы А (Malki et al., 2005b, 2010). Опосредованно на этот процесс влияют ферменты синтеза PGD2 — L-PGDS (lipocalin prostaglandin D synthase) и H-PGDS (hematopoietic PGDS). Однако ген *L-PGDS* сам является мишенью SOX9, в связи с чем L-PGDS не может участвовать в инициации перемещения SOX9 в ядро. Первоначально в данном процессе участвует H-PGDS, которая начинает синтезироваться уже на стадии E 10.5 и отвечает за самую раннюю транслокацию SOX9 в ядро (Moniot et al., 2011). В дальнейшем главную роль начинает играть L-PGDS. Помимо импортина-бета и кальмодулина в ядерном транспорте SOX9 принимают участие белки SUMO (small ubiquitin-related modifier) и (или) белок убиквитин (Sim et al., 2008).

Ядерный транспорт SOX9 нарушается при воздействии эстрогенов, что было показано на эмбриональной гонаде кенгуру (Mork, Capel, 2010; Pask et al., 2010). Эстрогены блокируют транслокацию SOX9 из цитоплазмы в ядро, нарушая тем самым его транскрипционную активность и опосредованно подавляя экспрессию гена *SOX9* (см. ниже), в результате чего происходит реверсия пола гонады XY. Механизм действия эстрогенов точно не установлен. Наиболее вероятным авторы считают блокировку эстрогенами ядерного транспорта, осуществляемо-

го при помощи белков SUMO и убиквитина (Hattori et al., 2006; Pask et al., 2010).

В гонаде XX в начале ее половой дифференцировки происходит задержка SOX9 в цитоплазме клеток. Это обусловлено сохранением в гонаде женского пола структурной интеграции сети микротрубочек. Если использовать препарат нокозадол, вызывающий деполимеризацию микротрубочек и нарушающий целостность их сети, то это негативно влияет на задержку SOX9 в цитоплазме (Malki et al., 2005a). При дифференцировке гонады по мужскому типу происходит реорганизация микротрубочек цитоскелета, благоприятствующая транспорту SOX9 в ядро. Имеется и другой механизм сохранения SOX9 в цитоплазме клеток гонады женского пола — ядерный экспорт. Его обеспечивают белки CRM-1 (chromosome region maintenance 1 protein homolog) и XPO-1 (exportin 1). Белки ядерного экспорта связываются с последовательностями, богатыми лейцином, в составе SOX9 — участками связывания NES (nuclear export signals) (Gasca et al., 2002; Sim et al., 2008). NES находятся в составе домена HMG между участками NLS. Последовательности NES присутствуют не только в протеине SOX9, но и во всех членах группы *Sox E* (Malki et al., 2010). Взаимодействие между транспортным белком CRM-1 и NES можно блокировать с помощью леptomидина В, который непосредственно связывает CRM-1 (Kudo et al., 1998). При ингибировании ядерного экспорта протеина SOX9 происходит реверсия пола гонады XX из-за задержки и накопления SOX9 в ядре, что свойственно мужскому типу развития гонады (Gasca et al., 2002; Sim et al., 2008).

Экспрессия *SOX9* во время развития зародыша происходит не только в эмбриональных клетках Сертоли, но и в хондрогенной мезенхиме, клетках головного мозга, почек и сердца (Wright et al., 1995).

Мишени SOX9

Главными мишенями SOX9 в процессе дифференцировки пола мужской гонады являются ген *AMH* (anti-Mullerian hormone) и ген липокалин простагландин синтазы *L-PGDS* в эмбриональных клетках Сертоли (De Santa Barbara et al., 1998a; Wilhelm et al., 2007b; Moniot et al., 2009). Транскрипт AMH представляет собой гормон, действует дистантно и вызывает регрессию Мюллеровых протоков. Активируя ген *AMH*, SOX9 запускает программу дифференцировки по мужскому типу не только гонад, но и всей половой системы. В области промотора гена *AMH* человека имеется консервативная последовательность связывания, с которой и взаимодействует протеин SOX9, активируя промотор. Данный эффект усиливается при образовании мультимерного белкового комплекса в результате непосредственного взаимодействия между молекулами SOX9 и SF1 (De Santa Barbara et al., 1998a). Аналогичные результаты также были получены на мышах: экспрессия *Amh* усиливается в результате совместного действия *Sox9* и *Sf1*, при этом последний выступает в качестве модулятора *Sox9* (Arango et al., 1999; Wilhelm et al., 2007b). Недавно данные о синергическом действии SOX9 и SF1 получили подтверждение при эксперименте *in vitro*, в котором исследовалась активация *AMH* в недифференцированных клетках Сертоли человека (Lasala et al., 2011).

SOX9 также может активировать экспрессию *AMH* через посредство протеина WT1. Последний образует соединение с белком HSP70 (heat shock protein 70). С этим же

белком взаимодействует и SOX9 (Marshall, Harley, 2001). В результате образуется протеиновый комплекс SOX9—HSP70—WT1, который предположительно стабилизирует связывание WT1 с промотором АМН (Harley et al., 2003a). В качестве другой прямой мишени SOX9 рассматривается ген *L-PGDS*, ответственный за транскрипцию фермента, необходимого в синтезе простагландина D2 (Wilhelm et al., 2007b) (подробнее см. ниже).

Описано участие Sox9 в поддержании экспрессии гена *Sfl*, необходимого для стероидогенеза, в том числе и синтеза тестостерона фетальными клетками Лейдига (Shen, Ingraham, 2002). Sox9 не является триггером экспрессии *Sfl*. Более того, она начинается у мыши со стадии E 9, т. е. раньше, чем экспрессия самого Sox9 (Ikeda et al., 1994). Роль Sox9 сводится лишь к поддержанию достаточного уровня экспрессии *Sfl* (Shen, Ingraham, 2002). Sox9 также активирует экспрессию гена *Fgf9* (fibroblast growth factor 9), транскрипт которого усиливает пролиферацию эмбриональных клеток Сертоли и направляет развитие гонады по мужскому пути (Kim et al., 2006). Fgf9 выступает в роли антагониста сигнального пути Wnt4, который определяет женский тип развития.

Недавно было установлено, что в клетках Сертоли эмбриональной гонады мыши Sox9 совместно с Sfl активируют экспрессию гена *Cyp26b1*, транскрипт которого является ферментом катаболизма ретиноевой кислоты (Kashimada et al., 2011). Ретиноевая кислота считается фактором, направляющим развитие гонциотов по женскому пути, а фермент ее разрушения Cyp26b1 (один из цитохромов семейства P450) соответственно определяет мужской путь развития (подробнее см.: Кожухарь, 2011). Таким образом, Sox9 детерминирует дифференцировку по мужскому типу не только соматических клеток, но опосредованно и половых. Sox9 совместно с Sfl связываются с промотором гена *Vanin-1* (vascular non-inflammatory module-1) и активируют экспрессию последнего (Wilson et al., 2005). Транскрипт данного гена представляет собой фермент, катализирующий образование пантотеновой кислоты (витамин B5) и цистеамина, которые являются антиоксидантами. Авторы рассматривают Vanin-1 как фактор защиты эмбриональных мужских половых клеток от оксидативного стресса.

Sox9 активирует экспрессию гена глутатионтрансферазы *Gstm6* (glutathione S-transferase, mu 6), транскрипт которого также представляет собой фермент, участвующий в детоксикации и защите клеток от окислительного стресса. У мыши ген *Gstm6* экспрессируется в предшественниках клеток Сертоли после стадии E 11.5, достигая высокого уровня к стадии E 12.5 и сохраняя таковой до E 16.5 (Beverdam et al., 2009). Описанный паттерн имеет место только в гонаде мужского пола и зависит от воздействия Sox9 — при инактивации гена *Sox9* происходит резкое снижение уровня экспрессии *Gstm6*. По мнению авторов, транскрипт данного гена играет роль в защите ДНК клеток половой линии в составе формирующихся извиленных семенных канальцев от возможных повреждений (Beverdam et al., 2009).

Кроме генов, вовлеченных в процессы дифференцировки пола, мишенями SOX9 являются ген коллагена II типа в хондроцитах, гены агрекана и ряда других протеинов межклеточного матрикса (Bell et al., 1997; Lefebvre et al., 1997; Sekiya et al., 1997), ген *Bapx1* (homolog of *Drosophila* bagpipe), препятствующий гипертрофии хондроцитов (Yamashita et al., 2009), а также ген *Cbln4*, уже упоминавшийся как мишень Sry (Bradford et al., 2009a), ген

BEST1 (bestrophin 1), экспрессирующийся в пигментном эпителии сетчатки глаза (Masuda, Esumi, 2010), и ряд генов в клетках энтодермального происхождения в различных органах пищеварительной системы (см. обзор: Gracz, Magness, 2011).

Экспрессия SOX9 и ее регуляция

Ген *Sox9* у мыши начинает экспрессироваться в эпителиальных клетках индифферентной гонады обоих полов со стадии E 10.5. Это совпадает по времени с началом экспрессии в тех же клетках гонады XY гена *Sry*. Интересно отметить, что коэкспрессия названных генов имеет место только в клетках полового валика эмбриона мужского пола у млекопитающих. Экспрессия *Sry* достигает пика к стадии E 11.5, после чего идет на спад и прекращается к стадии E 12.5. В это же время экспрессия *Sox9* к стадии E 11.5 в мужской гонаде резко возрастает, а в гонаде XX прекращается (Kent et al., 1996; Morais da Silva et al., 1996). В отличие от *Sry* экспрессия *Sox9* в гонаде XY не затухает к стадии E 12.5, а сохраняет высокий уровень, оставаясь таковой и в дальнейшем. Пространственные паттерны экспрессии *Sox9* и *Sry* в гонаде мужского пола совпадают: экспрессия начинается в центральной части эмбриональной гонады XY и далее распространяется в передне-заднем направлении по ходу зачатка (Kanai et al., 2005). Интересно отметить, что *Sox9* экспрессируется только в клетках первичных половых тяжей (предшественники клеток Сертоли), в то время как в клетках поверхностного целомического эпителия индифферентной гонады этого не происходит. Данный факт объясняется экспрессией в клетках поверхностного эпителия ряда генов, транскрипты которых являются репрессорами *Sox9* (Wilhelm et al., 2007b; Sekido, Lovell-Badge, 2009).

Хотя достаточно давно установлено, что SRY активирует экспрессию SOX9, долгое время было непонятно, как осуществляется это влияние: является ли SOX9 прямой или непрямым мишенью SRY (Koopman, 1999; Canning, Lovell-Badge, 2002; Knowler et al., 2003; Polanco, Koopman, 2007)? На сегодняшний день этот вопрос решен — в составе SOX9 обнаружено наличие особой регуляторной зоны, с которой непосредственно взаимодействуют транскрипты ряда генов, в том числе протеин SRY.

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* с помощью трансгенеза и хроматин-иммунопреципитации в составе *Sox9* была выявлена регуляторная зона, составляющая по крайней мере 1 Mb (Sekido, Lovell-Badge, 2008, 2009). В пределах данной зоны был идентифицирован регуляторный активирующий элемент, ответственный за активацию специфической экспрессии *Sox9* в генетически мужской гонаде. Этот элемент составляет 3.2 Kb и получил название TES (testis-specific enhancer). В составе TES обнаружен центр 1.4 Kb, названный TESCO (TES core) и обладающий высокой консервативностью у мыши, крысы, собаки и человека (Sekido, Lovell-Badge, 2009). TESCO является главным элементом активации экспрессии *Sox9*. Описаны группы факторов, которые оказывают как активирующее, так и тормозящее воздействие на TESCO. Данные факторы по-разному действуют в гонадах XY и XX. При сравнительном анализе геномов различных классов животных установлено, что TESCO содержит высококонсервативную последовательность, получившую название ECR (evolutionarily conserved region) и составляющую 180 bp. ECR обнаружена помимо человека и мыши

у таких млекопитающих, как сумчатые и однопроходные, а также у птиц, рептилий и амфибий (Bagheri-Fam et al., 2010).

Первым и наиболее ранним (еще до начала дифференцировки пола на стадии E 10.5) регулятором активности *Sox9* является *Sf1*. Так, у зародышей *Sf1*^{-/-} начальная экспрессия *Sox9* в индифферентной гонаде отсутствует. Было показано, что *Sf1* активирует *Sox9* как *in vitro*, так и *in vivo*. С помощью метода хроматиновой иммунопреципитации на мышах установлено, что *Sf1* связывается именно с элементом TESCO (Sekido, Lovell-Badge, 2008).

Другим важнейшим фактором активации *Sox9* является *Sry*. Ген *Sry* экспрессируется у мыши, как уже упоминалось, в очень узком временном промежутке (E 10.5—12.5). Однако именно это кратковременное воздействие его транскрипта является ключевым для активации *Sox9*, а следовательно, и начала дифференцировки клеток Сертоли, что было подтверждено экспериментально в опытах с трансгеном *Sry* (Hiramatsu et al., 2009). Возможность *Sry* индуцировать развитие гонады по мужскому пути проявляется в очень узком временном окне — от стадии E 11.0 до E 11.25, что соответствует по продолжительности всего 6 ч. Если устранить воздействие *Sry* именно в указанный критический период времени, то экспрессия *Sox9* не активируется, уровни транскрипта *Sox9* остаются низкими, вследствие чего не происходит дифференцировки клеток Сертоли, и развитие гонады идет по женскому типу. Если экспрессия *Sry* была активирована позже стадии E 11.3, то и в этом случае усиления экспрессии *Sox9* не происходит, и гонада развивается как яичник. Авторы полагают, что описанное временное окно лимитировано активацией именно в этот короткий промежуток времени сигнального пути *Fgf9* и подавлением сигнального пути *Wnt4* (Hiramatsu et al., 2009). С помощью хроматин-иммунопреципитации в опытах *in vivo* было установлено, что *Sry* связывается непосредственно с элементом TESCO.

Таким образом, *Sox9* является прямой мишенью для *Sry* (Sekido, Lovell-Badge, 2008; Sekido, 2010). Опыты, проведенные *in vitro*, показали, что *Sry* может связываться с TESCO только в присутствии *Sf1*. *Sry* и *Sf1* вступают во взаимодействие на молекулярном уровне, способствуя друг другу в связывании с элементом TESCO. Это было также подтверждено в экспериментах с трансгенами на мышах *in vivo*: у мышей XX с трансгеном *Sry* возможно вызвать экспрессию *Sox9* только в присутствии *Sf1* (Kido-koro et al., 2005; Sekido, 2010). Кроме того, установлено, что для полного подавления активности *Sox9* в гонаде XY должны быть инактивированы два участка в составе TESCO: *Sry*-связывающий и *Sf1*-связывающий. В этом случае активация экспрессии *Sox9* становится невозможной (Sekido, Lovell-Badge, 2008; Sekido, 2010).

В эксперименте *in vitro* аналогичные результаты были получены на клетках человека. В качестве модели предшественников клеток Сертоли использовали линию клеток эмбриональной карциномы NT2/D1 (Knowler et al., 2007). Было установлено, что SRY и SF1 выступают в качестве кофакторов, взаимодействуя с зоной hTES (human TES — гомолог TESCO у человека) и тем самым активируя экспрессию SOX9 (Knowler et al., 2011).

Уровень экспрессии *Sox9* нарастает после описанных воздействий со стороны *Sry* и *Sf1* и к стадии E 12.5 достигает высокого показателя (Kent et al., 1996; Morais da Silva et al., 1996), оставаясь таковым в течение всего внутриутробного периода и далее в постнатальной жизни. Однако как раз к стадии E 12.5 у мыши прекращается экспрессия

Sry. Как же без нее будет поддерживаться экспрессия *Sox9* в дальнейшем? Оказывается, функцию *Sry* берет на себя протеин *Sox9*. Последний связывается с соответствующим участком TESCO (участок связывания *Sry*), и вместе с *Sf1* они активируют TESCO и тем самым поддерживают экспрессию *Sox9* на высоком уровне (Sekido, Lovell-Badge, 2008; Jakob, Lovell-Badge, 2011). Таким образом, формируется положительная обратная связь: ген *Sox9* стимулирует своим транскриптом собственную экспрессию. Это объясняется тем, что *Sry* и *Sox9* — гомеобоксные гены, имеющие совпадающий домен HMG-box, который, по-видимому, играет в данном процессе ведущую роль. Аналогичный механизм ауторегуляции недавно обнаружен и у человека (Knowler et al., 2011). В эксперименте *in vitro* было показано, что протеин SOX9 активирует зону hTES гена SOX9. Этот эффект усиливается в присутствии протеина SF1 — имеет место синергизм SOX9 и SF1, подобный таковому у мыши.

Помимо описанного выше механизма положительной обратной связи существует еще несколько групп факторов, поддерживающих экспрессию *Sox9* в эмбриональных предшественниках клеток Сертоли и тем самым способствующих их дифференцировке. В поддержании экспрессии *Sox9* на высоком уровне помимо его собственного транскрипта участвуют факторы: протеины *Sf1* и *Wt1*, фактор роста *Fgf9* и его рецептор *Fgfr2*, простагландин D2, транскрипты генов *Sox8* и *Sox10* и транскрипционный комплекс *Gata4/Fog2* (Gao et al., 2006; Manuylov et al., 2007; DiNapoli, Capel, 2008; Kashimada, Koopman, 2010; Jakob, Lovell-Badge, 2011). Во-первых, это уже упоминавшийся *Sf1*. Он взаимодействует с *Sox9* по принципу положительной обратной связи: *Sf1* стимулирует экспрессию *Sox9*, а протеин *Sox9* в свою очередь поддерживает высокий уровень экспрессии гена *Sf1* (Shen, Ingraham, 2002).

Во-вторых, для поддержания экспрессии *Sox9* необходим протеин *Wt1* (Gao et al., 2006). Мутации *Wt1*^{-/-} приводят к нарушениям развития полового валика на ранних стадиях еще до детерминации пола и начала экспрессии *Sox9*. В связи с этим для изучения влияния *Wt1* на экспрессию *Sox9* на более поздних стадиях (после детерминации пола) была создана линия XY мышей *Wt1*^{-/-flox}; *Amh-Cre* (Gao et al., 2006). В результате получены данные о том, что *Wt1* поддерживает экспрессию *Sox9* после затухания *Sry* и таким образом оказывает влияние на дальнейшее развитие гонады по мужскому типу. При отсутствии *Wt1* экспрессия *Sox9* прекращается к стадии E 14.5.

В-третьих, это *Fgf9* и его рецептор *Fgfr2*. У пациентов XY с делецией зоны, содержащей *FGFR2* (10q26), имеет место реверсия пола в результате нарушения экспрессии SOX9 (Wilkie et al., 1993). Для поддержания экспрессии последнего необходимы FGF9 и его рецептор FGFR2, что было доказано не только клиническими наблюдениями, но и в ряде экспериментов. Так, у мышей XY *Fgf9*^{-/-} экспрессия *Sry* не нарушена, вследствие чего инициируется экспрессия *Sox9*. Однако после стадии E 12.5 (когда экспрессия *Sry* прекращается) в отсутствие *Fgf9* экспрессия *Sox9* затухает, и в дальнейшем развивается реверсия пола (Colvin et al., 2001; Kim et al., 2006). Такой же эффект вызывает и мутация по гену *Fgfr2* (Kim et al., 2007).

В опытах *in vitro* на мышах (Hiramatsu et al., 2010) было установлено, что *Fgf9* необходим для поддержания нормальной экспрессии *Sox9* прежде всего в предшественниках клеток Сертоли. *Fgf9* в нормальных условиях экспрессируется в центральном отделе индифферентной гонады, и оттуда его транскрипт диффундирует на пери-

ферию зачатка. Периферические фрагменты эмбриональной гонады XY культивировали отдельно от центральных фрагментов. В результате в периферических фрагментах не происходило дифференцировки клеток Сертоли и не формировались половые тяжи — закладки извитых семенных канальцев. Данный эффект связан с недостатком или отсутствием *Sox9* — главного фактора дифференцировки клеток Сертоли. По мнению авторов, его можно объяснить тем, что в периферических фрагментах гонады не происходило экспрессии *Sox9* из-за невозможности поступления в данные фрагменты *Fgf9*. Это доказывает необходимость последнего для поддержания экспрессии *Sox9* (Hiramatsu et al., 2010). Интересно отметить, что сам *Sox9* оказывает активирующее влияние на экспрессию *Fgf9*, т. е. их взаимодействие формирует положительную обратную связь (Kim et al., 2006). *Sox9* стимулирует выработку эмбриональными клетками Сертоли *Fgf9* (через посредство *Fgf2*). Повышение уровня *Fgf9* в свою очередь активирует экспрессию *Sox9*, замыкая петлю положительной обратной связи (DeFalco, Capel, 2009; Hiramatsu et al., 2009).

В-четвертых, это простагландин D2 (PGD2). С помощью антител к протеинам *Sry* и *Sox9* на мышах было показано, что в развивающейся гонаде XY присутствуют клетки, экспрессирующие *Sox9* без предварительной экспрессии *Sry* (Wilhelm et al., 2005), т. е. последний не мог аутокринно активировать в них экспрессию *Sox9*. Почему же она происходит? Авторы объясняют ее инициацию паракринным действием PGD2. Последний секретируется соседними клетками — предшественниками клеток Сертоли. Действуя паракринно на окружающие клетки, PGD2 рекрутирует их для вступления на путь развития клеток Сертоли, активируя в них экспрессию *Sox9*. В случае химического ингибирования рецепторов PGD2 экспрессия *Sox9* прекращается (Wilhelm et al., 2005). Подобный эффект был продемонстрирован в опытах с химерными мышами XX—XY: клетки XY (предшественники клеток Сертоли) с помощью паракринного действия PGD2 активировали в соседних клетках XX экспрессию *Sox9* и тем самым побуждали их дифференцироваться по мужскому типу (Wilhelm et al., 2005).

Введение PGD2 в гонаду XX при эксперименте *in vitro* вызывало активацию экспрессии *Sox9*, что приводило к дифференцировке клеток Сертоли и частичной маскулинизации (Malki et al., 2005b, 2007; Moniot et al., 2009). PGD2 участвует в фосфорилировании транскрипта *Sox9* и тем самым способствует транспортировке последнего в клеточное ядро, что является необходимым шагом в дальнейшей дифференцировке клеток Сертоли (Malki et al., 2005b). В то же самое время прямой мишенью *Sox9* является ген *L-Pgds*, кодирующий фермент синтеза PGD2 — липокалин, простагландин синтазы (L-PGDS). *Sox9* активирует экспрессию *L-Pgds*, что приводит к усилению синтеза PGD2, а последний стимулирует экспрессию *Sox9*. Таким образом, и в данном случае имеет место взаимодействие по типу положительной обратной связи (Wilhelm et al., 2007a).

В-пятых, в поддержании экспрессии *Sox9* принимают участие протеины *Sox8* и *Sox10*, которые очень близки по структуре к *Sox9* и принадлежат к одному и тому же подсемейству *SoxE*. Оба гена (*Sox8* и *Sox10*) также начинают экспрессироваться в предшественниках клеток Сертоли вскоре после активации *Sox9*. Вероятно, этот процесс запускается, когда содержание транскрипта *Sox9* достигает критического порога. *Sox8* и *Sox10*, так же как и *Sox9*,

контролируют дифференцировку эмбриональных клеток Сертоли и поддерживают их популяцию. Оба названных протеина образуют некий дополнительный (а возможно, избыточный) резерв фактора, сходного с *Sox9*. Они подобно *Sox9* стимулируют и поддерживают экспрессию гена *Sox9* по механизму аутокринной положительной обратной связи (Barrionuevo, Scherer, 2010; Polanco et al., 2010).

Наконец, в-шестых, в качестве фактора, поддерживающего экспрессию *Sox9*, рассматривается транскрипционный комплекс *Gata4/Fog2*. Влияние данного комплекса на экспрессию *Sox9* было изучено в эксперименте на мышах с использованием трансгенов *Wil-Sox9* (Manuylov et al., 2007). Мыши XX с гиперэкспрессией трансгенного *Sox9* фенотипически развивались как стерильные особи мужского пола. В случае мутации *Fog2*^{-/-} эти же животные развивались как фертильные женские особи вследствие устранения эффекта *Sox9*. Авторы рассматривают *Fog2* как определяющий фактор в транскрипционном комплексе *Gata4/Fog2*, который поддерживает нормальную экспрессию *Sox9*, необходимую для развития гонады по мужскому типу.

Существует также ряд факторов, подавляющих экспрессию *SOX9*. В первую очередь таковым является бета-катенин. В процессе дифференцировки пола в эмбриональной гонаде происходит конкурентная борьба двух сигнальных путей — мужского *SOX9/FGF9/FGFR2* и женского *RSPO1/WNT4/бета-катенин* (Kim et al., 2006, 2007). В гонаде XY ген *SRY* включает экспрессию *SOX9*, а следовательно, сигнальный путь *SOX9/FGF9/FGFR2*. Параллельно *SRY* инактивирует бета-катенин. В отсутствие гена *SRY* в гонаде XX начинает преобладать сигнальный путь *RSPO1/WNT4/бета-катенин*. Последний, являясь мессенджером для генов женского пути развития и достигая определенного критического уровня, может подавлять экспрессию *SOX9* в гонаде (Jakob, Lovell-Badge, 2011). Молекулярный механизм данного эффекта не вполне понятен. Предположительно бета-катенин репрессирует ген *SOX9* через взаимодействие с его транскриптом и инактивацию последнего (Akiyama et al., 2004; Bernard, Harley, 2007). При этом подавляется положительная обратная связь *SOX9—SOX9* (см. выше). Возможны и прямое связывание бета-катенина с промотором гена *SOX9*, что приводит к снижению уровня экспрессии последнего (Maatouk et al., 2008).

При гиперэкспрессии дозозависимого гена *DAX1* (dosage-sensitive sex-reversal-adrenal hypoplasia congenital on the X chromosome) его транскрипт выступает в роли фактора, тормозящего *SOX9* (Bouma et al., 2005). В этом случае *DAX1*, являясь модулятором активности SF1, может нарушать взаимодействие SF1 с *TESCO* (Jakob, Lovell-Badge, 2011). Во взрослом яичнике *in vitro* и *in vivo* описано репрессорное действие на ген *SOX9* транскрипционного фактора *FOXL2* (forkhead box L2) совместно с рецептором эстрогенов *ESR1* (Uhlenhaut et al., 2009). В эксперименте на мышах авторами было показано, что *Foxl2* и *Esr1* взаимодействуют на молекулярном уровне и связываются с последовательностью *TESCO*, подавляя посредством ее торможения экспрессию *Sox9*.

Заключение, или несколько слов об эволюции

SOX9 связан с дифференцировкой гонад и установлением полового диморфизма у представителей различных классов животных. Он является важным фактором в на-

званных процессах у птиц, имеющих отличную от млекопитающих кодировку пола (хромосомы ZZ — мужской пол, хромосомы ZW — женский пол) (Kent et al., 1996; Morais da Silva et al., 1996), и у рептилий, имеющих температурозависимую регуляцию детерминации пола (Western et al., 1999; Valleley et al., 2001; Agrawal et al., 2009). Функция SOX9 обладает очень высокой степенью консервативности не только среди млекопитающих и других позвоночных, но, возможно, и среди беспозвоночных (DeFalco et al., 2003). Эволюционно консервативная регуляторная последовательность ECR выявлена в генах SOX9 не только млекопитающих, но и птиц, рептилий и амфибий (Bagheri-Fam et al., 2010). В связи с этим SOX9 представляется универсальным (с некоторыми оговорками) ключевым фактором дифференцировки мужского пола у многих классов животных. В то же самое время ген SRY обнаружен даже не у всех млекопитающих, его функция сводится лишь к роли спускового крючка, включающего экспрессию SOX9, который в дальнейшем выполняет основную работу по дифференцировке клеток Сертоли и запуску программы развития мужского пола. Более того, SOX9 рассматривается некоторыми авторами как единственный ген-мишень для SRY, необходимый для активации упомянутой программы (Kashimada, Koopman, 2010).

Принято считать, что половые хромосомы эволюционировали от пары предковых идентичных аутосом. В пользу данной теории свидетельствуют результаты картирования генов (Graves, 2005, 2006). Пара аутосом начала изменяться в результате независимых циклов добавления, дегградации и рекомбинации. Косвенным подтверждением этого служит наличие в составе половых хромосом псевдоаутосомных областей PAR1 и PAR2: их можно рассматривать как результат последнего добавления. Одна из копий гена SOX3 (в составе X-хромосомы) сохранилась, а вторая приобрела новую функцию — детерминации пола. Этот ген стал новым геном SRY, а несущая его хромосома — Y-хромосомой (Graves, 2002, 2006; Sutton et al., 2011). В дальнейшей эволюции Y-хромосомы преобладала не рекомбинация, а рестрикция последовательностей, вследствие чего шла потеря генов. Y-хромосома человека сократилась примерно до 60 Мб и включает в себя 50 генов. Для сравнения X-хромосома составляет около 165 Мб и имеет более 1000 генов (Wallis et al., 2008). Общая тенденция, свойственная судьбе Y-хромосомы, характерна и для гена SRY: накопление мутаций, большой разброс в последовательностях даже у близкородственных видов (консервативен только домен HMG), различия во временном паттерне экспрессии у разных видов и сравнительно низкий ее уровень (у мыши).

Все это говорит о ненадежности SRY в качестве триггера процесса дифференцировки пола в эволюционном аспекте. Даже среди млекопитающих описаны виды, не имеющие гена SRY. Так, некоторые виды грызунов из родов *Ellobius* и *Tokudaia* в ходе эволюции потеряли не только ген SRY, но и Y-хромосому (Just et al., 1995, 2002, 2007; Sutou et al., 2001). Набор половых хромосом у этих видов XO и XX. Так что у них имеет место совсем иная, отличная от остальных млекопитающих, система активации процессов детерминации и дифференцировки пола. Более того, у полевки *Ellobius lutescens* (горная слепушонка) при отсутствии Y-хромосомы, а значит, и гена SRY ген *Sox9* хотя и присутствует в геноме, но не является фактором, детерминирующим мужской пол (Baumstark et al., 2001). Таким образом, и SOX9 также не может выступать в роли абсолютно универсального (даже у млеко-

питающих) ключевого фактора детерминации мужского пола гонад. Тем удивительнее, что у других видов из родов *Ellobius* и *Tokudaia* присутствует хромосома Y, имеют место экспрессия Sry и последующая активация Sox9.

Суммируя сказанное, можно констатировать, что, несмотря на различия в инициации процесса дифференцировки пола, строение зрелой мужской гонады проявляет высокую степень консервативности у всех позвоночных. Это позволяет предположить, что и пути ее достижения консервативны. Действительно, если сравнить механизмы развития гонад у наиболее хорошо изученных млекопитающих, птиц и рептилий, то при различии триггеров обнаруживается схожесть главных генов, участвующих в этом процессе, и паттернов их экспрессии (Morrish, Sinclair, 2002; Smith, Sinclair, 2004; Yao, Capel, 2005; Shoemaker et al., 2007; Agrawal et al., 2009). В подавляющем большинстве случаев на вершине каскада оказывается ген SOX9, включающий программу дифференцировки клеток Сертоли, которые определяют дальнейшие пути развития гонады.

Список литературы

- Кожухарь В. Г. 2011. Судьба гоноцитов млекопитающих: оогенез или сперматогенез. Цитология. 53 (10) : 778—787.
- Agrawal R., Wessely O., Anand A., Singh L., Aggarwal R. K. 2009. Male-specific expression of Sox9 during gonad development of crocodile and mouse is mediated by alternative splicing of its proline-glutamine-alanine rich domain. FEBS J. 276 : 4184—4196.
- Akiyama H., Lyons J. P., Mori-Akiyama Y., Yang X., Zhang R., Zhang Z., Deng J. M., Taketo M. M., Nakamura T., Behringer R. R., McCreath P. D., de Crombrughe B. 2004. Interaction between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. Genes Develop. 18 : 1072—1087.
- Albrecht K. H., Eicher E. M. 2001. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. Develop. Biol. 240 : 92—107.
- 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.
- Assumpcao J. G., Ferraz L. F., Benedetti C. E., Maciel-Guerra A. T., Guerra Jr. G., Marques-de-Faria A. P., Baptista M. T., de Mello M. P. 2005. A naturally occurring deletion in the SRY promoter region affecting the Sp1 binding site is associated with sex reversal. J. Endocrinol. Invest. 28 : 651—656.
- Bagheri-Fam S., Sinclair A. H., Koopman P., Harley V. R. 2010. Conserved regulatory modules in the Sox9 testis-specific enhancer predict roles for SOX, TCF/LEF, Forkhead, DMRT, and GATA proteins in vertebrate sex determination. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 42 : 472—477.
- Barriounevo F., Bagheri-Fam S., Klattig J., Kist R., Taketo M. M., Englert C., Scherer G. 2006. Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. Biol. Reprod. 74 : 195—201.
- Barriounevo F., Scherer G. 2010. SOX E genes: SOX9 and SOX8 in mammalian testis development. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 42 : 433—436.
- Battiloro E., Angeletti B., Tozzi M. C., Bruni L., Tondini S., Vignetti P., Verna R., D'Ambrosio E. 1997. A novel double nucleotide substitution in the HMG box of the SRY gene associated with Swyer syndrome. Hum. Genet. 100 : 585—587.
- Baumstark A., Akhverdyan M., Schulze A., Reisert I., Vogel W., Just W. 2001. Exclusion of SOX9 as the testis determining factor in *Ellobius lutescens*: evidence for another testis determining gene besides SRY and SOX9. Mol. Genet. Metab. 72 : 61—66.
- Bell D. M., Leung K. K., Wheatley S. C., Ng L. J., Zhou S., Ling K. W., Sham M. H., Koopman P., Tam P. P., Cheah K. S.

1997. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nature Genet.* 16 : 174—178.
- Bernard P., Harley V. 2007. Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39 : 31—43.
- Bernard P., Sim H., Knowler K. C., Vilain E., Harley V. R. 2008. Human SRY inhibits β -catenin-mediated transcription. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40 : 2889—2900.
- Beverdam A., Koopman P. 2006. Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 15 : 417—431.
- Beverdam A., Svingen T., Bagheri-Fam S., Bernard P., McClive P., Robson M., Khojasteh M. B., Salehi M., Sinclair A. H., Harley V. R., Koopman P. 2009. Sox9-dependent expression of Gstm6 in Sertoli cells during testis development in mice. *Reproduction.* 137 : 481—486.
- 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. *Nature Genet.* 26 : 490—494.
- Bogani D., Siggers P., Brixey R., Warr N., Beddow S., Edwards J., Williams D., Wilhelm D., Koopman P., Flavell R. A., Chi H., Ostrer H., Wells S., Cheeseman M., Greenfield A. 2009. Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MAP3K4) reveals a requirement for MAPK signalling in mouse sex determination. *PLoS Biol.* 7 : e1000196.
- Bor Y. C., Swartz J., Morrison A., Rekosh D., Lodomery M., Hammarskjold M. L. 2006. The Wilms' tumor 1 (WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron. *Genes Develop.* 20 : 1597—1608.
- Bouma G. J., Albrecht K. H., Washburn L. L., Recknagel A. K., Churchill G. A., Eicher E. M. 2005. Gonadal sex reversal in mutant Dax1 XY mice: a failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells. *Development.* 132 : 3045—3054.
- Bradford S. T., Hiramatsu R., Maddugoda M. P., Bernard P., Chaboissier M. C., Sinclair A., Schedl A., Harley V., Kanai Y., Koopman P., Wilhelm D. 2009a. The cerebellin 4 precursor gene is a direct target of SRY and SOX9 in mice. *Biol. Reprod.* 80 : 1178—1188.
- Bradford S. T., Wilhelm D., Bandiera R., Vidal V., Schedl A., Koopman P. 2009b. A cell-autonomous role for WT1 in regulating Sry in vivo. *Hum. Mol. Genet.* 18 : 3429—3438.
- Buaas F. W., Val P., Swain A. 2009. The transcription co-factor CITED2 functions during sex determination and early gonad development. *Hum. Mol. Genet.* 18 : 2989—3001.
- Bullejos M., Koopman P. 2001. Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Develop. Dyn.* 221 : 201—205.
- Burgoyne P. S., Buehr M., McLaren A. 1988. XY follicle cells in ovaries of XX—XY female mouse chimaeras. *Development.* 104 : 683—688.
- Canning C. A., Lovell-Badge R. 2002. Sry and sex determination: how lazy can it be? *Trends Genet.* 18 : 111—113.
- Chaboissier M. C., Kobayashi A., Vidal V. I., Lutzken-dorf S., van de Kant H. J., 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.
- Clement T. M., Bhandari R. K., Sadler-Riggelman I., Skinner M. K. 2011. SRY directly regulates the Neurotrophin 3 promoter during male sex determination and testis development in rats. *Biol. Reprod.* 85 : 277—284.
- Clepet C., Schafer A. J., Sinclair A. H., Palmer M. S., Lovell-Badge R., Goodfellow P. N. 1993. The human SRY transcript. *Hum. Mol. Genet.* 2 : 2007—2012.
- Colvin J. S., Green R. P., Schmahl J., Capel B., Orntz D. M. 2001. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell.* 104 : 875—889.
- DeFalco T., Capel B. 2009. Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu. Rev. Cell. Develop. Biol.* 25 : 447—482.
- DeFalco T. J., Verney G., Jenkins A. B., McCaffery J. M., Russell S., Van Doren M. 2003. Sex-specific apoptosis regulates sexual dimorphism in the Drosophila embryonic gonad. *Develop. Cell.* 5 : 205—216.
- De Santa Barbara P., Bonneaud N., Boizet B., Desclozeaux M., Moniot B., Sudbeck P., Scherer G., Poulat F., Berta P. 1998a. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* 18 : 6653—6665.
- De Santa Barbara P., Mejean C., Moniot B., Malcles M., Berta P., Boizet-Bonhoure B. 1998b. Steroidogenic factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of human SRY gene expression. *Biol. Reprod.* 64 : 775—783.
- De Santa Barbara P., Moniot B., Poulat F., Berta P. 2000. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Develop. Dyn.* 217 : 293—298.
- Desclozeaux M., Poulat F., Barbara P. D., Capony J. P., Turrowski P., Jay P., Mejean C., Moniot B., Boizet B., Berta P. 1998a. Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *J. Biol. Chem.* 273 : 7988—7995.
- Desclozeaux M., Poulat F., de Santa Barbara P., Soullier S., Jay P., Berta P., Boizet-Bonhoure B. 1998b. Characterization of two Sp1 binding sites of the human sex determining SRY promoter. *Biochim. biophys. acta.* 1397 : 247—252.
- Dewing P., Chiang C. W., Sinchak K., Sim H., Fernagut P. -O., Kelly S., Chesselet M. -F., Micevych P. E., Albrecht K. H., Harley V. R., Vilain E. 2006. Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY. *Curr. Biol.* 16 : 415—420.
- DiNapoli L., Capel B. 2008. SRY and the standoff in sex determination. *Mol. Endocrinol.* 22 : 1—9.
- Ferrari S., Harley V. R., Pontiggia A., Goodfellow P. N., Lovell-Badge R., Bianchi M. E. 1992. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J.* 11 : 4497—4506.
- Forwood J. K., Harley V., Jans D. A. 2001. The C-terminal nuclear localization signal of the sex-determining region Y (SRY) high mobility group domain mediates nuclear import through importin beta. *J. Biol. Chem.* 276 : 46 575—46 582.
- Foster J. W., Dominguez-Steglich M. A., Guioli S., Kwok C., Weller P. A., Stevanovic M., Weissenbach J., Mansour S., Young I. D., Goodfellow P. N., Brook J. D., Schafer A. J. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature.* 372 : 525—530.
- Gao F., Maiti S., Alam N., Zhang Z., Deng J. M., Behringer R. R., Lecureuil C., Guillou F., Huff V. 2006. The Wilms tumor gene, Wt1, is required for Sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *PNAS.* 103 : 11 987—11 992.
- Gasca S., Canizares J., de Santa Barbara P., Mejean C., Poulat F., Berta P., Boizet-Bonhoure B. 2002. A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *PNAS.* 99 : 11 199—11 204.
- Giese K., Pagel J., Grosschedl R. 1994. Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human SRY sex-determining factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 3368—3372.
- Gracz A. D., Magness S. T. 2011. Sry-box (Sox) transcription factors in gastrointestinal physiology and disease. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300 : G503—G515.
- Graves J. A. 2002. Evolution of the testis-determining gene—the rise and fall of SRY. *Novartis Found. Symp.* 244 : 86—97.
- Graves J. A. 2005. Genomics. Recycling the Y chromosome. *Science.* 307 : 50—51.
- Graves J. A. 2006. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell.* 124 : 901—914.
- Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Munsterberg A., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature.* 346 : 245—250.

- Gubbay J., Vivian N., Economou A., Jackson D., Goodfellow P., Lovell-Badge R. 1992. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89 : 7953—7957.
- Hacker A., Capel B., Goodfellow P., Lovell-Badge R. 1995. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development.* 121 : 1603—1614.
- Hammes A., Guo J. K., Lutsch G., Leheste J. R., Landrock D., Ziegler U., Gubler M. C., Schedl A. 2001. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell.* 106 : 319—329.
- 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. *Mech. Develop.* 91 : 403—407.
- Harley V. R., Clarkson M. J., Argentaro A. 2003a. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocrine Rev.* 24 : 466—487.
- Harley V. R., Goodfellow P. N. 1994. The biochemical role of SRY in sex determination. *Mol. Reprod. Develop.* 39 : 184—193.
- Harley V. R., Jackson D. I., Hextall P. J., Hawkins J. R., Berkovitz G. D., Sockanathan S., Lovell-Badge R., Goodfellow P. N. 1992. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science.* 255 : 453—456.
- Harley V. R., Layfield S., Mitchell C. L., Forwood J. K., John A. P., Briggs L. J., McDowall S. G., Jans D. A. 2003b. Defective importin β recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100 : 7045—7050.
- Harley V. R., Lovell-Badge R., Goodfellow P. N., Hextall P. J. 1996. The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain. *FEBS Lett.* 391 : 24—28.
- Hattori T., Eberspaecher H., Lu J., Zhang R., Nishida T., Kahyo T., Yasuda H., de Crombrugge B. 2006. Interaction between PIAS proteins and SOX9 result in an increase in the cellular concentrations of SOX9. *J. Biol. Chem.* 281 : 14 417—14 428.
- Hiramatsu R., Harikae K., Tsunekawa N., Kurohmaru M., Matsuo I., Kanai Y. 2010. FGF signaling directs a center-to-pole expansion of tubulogenesis in mouse testis differentiation. *Development.* 137 : 303—312.
- Hiramatsu R., Matoba S., Kanai-Azuma M., Tsunekawa N., Katoh-Fukui Y., Kurohmaru M., Morohashi K., Wilhelm D., Koopman P., Kanai Y. 2009. A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development.* 136 : 129—138.
- Hossain A., Saunders G. F. 2001. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J. Biol. Chem.* 276 : 16 817—16 823.
- Ikeda Y., Shen W. H., Ingraham H. A., Parker K. L. 1994. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* 8 : 654—662.
- Jakob S., Lovell-Badge R. 2011. Sex determination and the control of Sox9 expression in mammals. *FEBS J.* 278 : 1002—1009.
- Jeske Y. W., Bowles J., Greenfield A., Koopman P. 1995. Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nat. Genet.* 10 : 480—482.
- Just W., Baumstark A., Hameister H., Schreiner B., Reisert I., Hakhverdyan M., Vogel W. 2002. The sex determination in *Ellobius lutescens* remains bizarre. *Cytogenet. Genome Res.* 96 : 146—153.
- Just W., Baumstark A., Suss A., Graphodatsky A., Rens W., Schafer N., Bakloushinskaya I., Hameister H., Vogel W. 2007. *Ellobius lutescens*: sex determination and sex chromosome. *Sex. Develop.* 1 : 211—221.
- Just W., Rau W., Vogel W., Akhverdian M., Fredga K., Graves J., Lyapunova E. 1995. Absence of Sry in species of the vole *Ellobius*. *Nature Genet.* 11 : 117—118.
- Kamachi Y., Cheah K. S., Kondoh H. 1999. Mechanism of regulatory target selection by the SOX high-mobility-group domain proteins as revealed by comparison of SOX1/2/3 and SOX9. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 107—120.
- Kamachi Y., Uchikawa M., Kondoh H. 2000. Pairing SOX off with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* 16 : 182—187.
- Kanai Y., Hiramatsu R., Matoba S., Kidokoro T. 2005. From SRY to SOX9: mammalian testis differentiation. *J. Biochem.* 138 : 13—19.
- Kashimada K., Koopman P. 2010. Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development.* 137 : 3921—3930.
- Kashimada K., Svingen T., Feng C. -W., Pelosi E., Bagheri-Fam S., Harley V. R., Schlessinger D., Bowles J., Koopman P. 2011. Antagonistic regulation of Cyp26b1 by transcription factors SOX9/SF1 and FOXL2 during gonadal development in mice. *FASEB J.* 25 : 3561—3569.
- Kaur G., Jans D. A. 2011. Dual nuclear import mechanisms of sex determining factor SRY: intracellular Ca²⁺ as a switch. *FASEB J.* 25 : 665—675.
- Kelly S., Yotis J., Macris M., Harley V. 2003. Recombinant expression, purification and characterization of the HMG domain of human SRY. *Protein Pept. Lett.* 10 : 281—286.
- Kent J., Wheatley S. C., Andrews J. E., Sinclair A. H., Koopman P. 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development.* 122 : 2813—2822.
- Kidokoro T., Matoba S., Hiramatsu R., Fujisawa M., Kanai-Azuma M., Taya C., Kurohmaru M., Kawakami H., Hayashi Y., Kanai Y., Yonekawa H. 2005. Influence on spatiotemporal patterns of male-specific Sox9 activation by ectopic Sry expression during early phases of testis differentiation in mice. *Develop. Biol.* 278 : 511—525.
- Kim Y., Bingham N., Sekido R., Parker K. L., Lovell-Badge R., Capel B. 2007. Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 16 558—16 563.
- Kim Y., Kobayashi A., Sekido R., DiNapoli 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 : e187.
- Knower K. C., Kelly S., Harley V. R. 2003. Turning on the male — SRY, SOX9 and sex determination in mammals. *Cytogenet. Genome Res.* 101 : 185—198.
- 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 : e17751.
- Knower K. C., Sim H., McClive P. J., Bowles J., Koopman P., Sinclair A. H., Harley V. R. 2007. Characterization of urogenital ridge gene expression in the human embryonal carcinoma cell line NT2/D1. *Sex. Develop.* 1 : 114—126.
- Kobayashi A., Chang H., Chaboissier M. C., Scheld A., Behringer R. R. 2005. Sox9 in testis determination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1061 : 9—17.
- Koopman P. 1999. Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 55 : 839—856.
- 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.
- Koopman P., Munsterberg A., Capel B., Vivian N., Lovell-Badge R. 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature.* 348 : 450—452.
- Kudo N., Wolff B., Sekimoto T., Schreiner E. P., Yoneda Y., Yanagida M., Horinouchi S., Yoshida M. 1998. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp. Cell Res.* 242 : 540—547.
- Lasala C., Scheingart H. F., Arouche N., Bedecarras P., Grinspon R. P., Picard J. -Y., Josso N., di Clemente N., Rey R. A. 2011. SOX9 and SF1 are involved in cyclic AMP-mediated upregulation of anti-Mullerian gene expression in the testicular prepubertal Sertoli cell line SMAT1. *Amer. J. Physiol. Endocrin. Metab.* 301 : E539—E547.

- Lau Y. F., Li Y. 2009. The human and mouse sex-determining SRY genes repress the Rspo1/beta-catenin signaling. *J. Genet. Genomics*. 36 : 193—202.
- Lefebvre V., Huang W., Harley V. R., Goodfellow P. N., De Crombrughe B. 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro-alpha-1(II) collagen gene. *Mol. Cell. Biol.* 17 : 2336—2346.
- Li B., Zhang W., Chan G., Jancso-Radek A., Liu S., Weiss M. 2001. Human sex reversal due to impaired nuclear localization of SRY — a clinical correlation. *J. Biol. Chem.* 276 : 46 480—46 484.
- Li Y., Oh H. J., Lau Y. F. 2006. The poly(ADP-ribose)polymerase 1 interacts with Sry and modulates its biological functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 257-258 : 35—46.
- Liu C. -F., Bingham N., Parker K., Yao H. H. -C. 2009. Sex-specific roles of beta-catenin in mouse gonadal development. *Hum. Mol. Genet.* 18 : 405—417.
- Loffler K. A., Koopman P. 2002. Charting the course of ovarian development in vertebrates. *Int. J. Develop. Biol.* 46 : 503—510.
- Lovell-Badge R., Canning C., Sekido R. 2002. Sex-determining genes in mice: building pathways. *Novartis Found. Symp.* 244 : 4—18.
- Lovell-Badge R., Robertson E. 1990. XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. *Development*. 109 : 635—646.
- Maatouk D. M., Capel B. 2008. Sexual development of the soma in the mouse. *Curr. Top. Develop. Biol.* 83 : 151—183.
- Maatouk D. M., DiNapoli L., Alvers A., Parker K. L., Takeito M. M., Capel B. 2008. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum. Mol. Genet.* 17 : 2949—2955.
- Malki S., Berta P., Poulat F., Boizet-Bonhoure B. 2005a. Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp. Cell Res.* 309 : 468—475.
- Malki S., Bibiau F., Notarnicola C., Roques S., Berta P., Poulat F., Boizet-Bonhoure B. 2007. Expression and biological role of the prostaglandin D synthase/SOX9 pathway in human ovarian cancer cells. *Cancer Lett.* 255 : 182—193.
- Malki S., Boizet-Bonhoure B., Poulat F. 2010. Shuttling of SOX proteins. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42 : 411—416.
- Malki S., Nef S., Notarnicola C., Thevenet L., Gasca S., Mejean C., Berta P., Poulat F., Boizet-Bonhoure B. 2005b. Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J.* 24 : 1798—1809.
- Manuylov N. L., Fujiwara Y., Adameyko I. I., Poulat F., Tevosian S. G. 2007. The regulation of Sox9 gene expression by the GATA/FOG2 transcriptional complex in dominant XX sex reversal mouse models. *Develop. Biol.* 307 : 356—367.
- Marshall O. J., Harley V. R. 2001. Identification of an interaction between SOX9 and HSP70. *FEBS Lett.* 496 : 75—80.
- Masuda T., Esumi N. 2010. SOX9, through interaction with microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and OTX2, regulates BEST1 expression in the retinal pigment epithelium. *J. Biol. Chem.* 285 : 26 933—26 944.
- Matsuzawa-Watanabe Y., Inoue J., Semba K. 2003. Transcriptional activity of testis-determining factor SRY is modulated by the Wilms' tumor 1 gene product, WT1. *Oncogene*. 22 : 7900—7904.
- Mayer A., Lahr G., Swaab D. F., Pilgrim C., Reisert I. 1998. The Y-chromosomal genes SRY and ZFY are transcribed in adult human brain. *Neurogenetics*. 1 : 281—288.
- Mayer A., Mosler G., Just W., Pilgrim C., Reisert I. 2000. Developmental profile of Sry transcripts in mouse brain. *Neurogenetics*. 3 : 25—30.
- McElreavey K., Vilain E., Abbas N., Costa J. -M., Souleyreau N., Kucheria K., Boucekkine C., Thibaud E., Brauner R., Flamant F., Fellous M. 1992. XY sex reversal associated with a deletion 5' to the SRY «HMG box» in the testis-determining region. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89 : 11 016—11 020.
- Milsted A., Serova L., Sabban E. L., Dunphy G., Turner M. E., Ely D. L. 2004. Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by Sry. *Neurosci. Lett.* 369 : 203—207.
- Miyamoto Y., Taniguchi H., Hamel F., Silversides D. W., Viger R. S. 2008. A GATA/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol. Biol.* 9 : 44.
- Moniot B., Declosmenil F., Barrionuevo F., Scherer G., Aritake K., Malki S., Marzi L., Cohen-Solal A., Georg I., Klattig J., Englert C., Kim Y., Capel B., Eguchi N., Urade Y., Boizet-Bonhoure B., Poulat F. 2009. The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development*. 136 : 1813—1821.
- Moniot B., Farhat A., Aritake K., Declosmenil F., Nef S., Eguchi N., Urade Y., Poulat F., Boizet-Bonhoure B. 2011. Hematopoietic prostaglandin D synthase (H-Pgds) is expressed in the early embryonic gonad and participates to the initial nuclear translocation of the SOX9 protein. *Develop. Dyn.* 240 : 2335—2343.
- Morais da Silva S., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A., Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 14 : 62—68.
- Mork L., Capel B. 2010. Oestrogen shuts the door on SOX9. *BMC Biol.* 8 : 110.
- Morrish B. C., Sinclair A. H. 2002. Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction*. 124 : 447—457.
- Munger S. C., Aylor D. L., Syed H. A., Magwene P. M., Thredgill D. W., Capel B. 2009. Elucidation of the transcription network governing mammalian sex determination by exploiting strain-specific susceptibility to sex reversal. *Genes Develop.* 23 : 2521—2536.
- Nef S., Verma-Kurvari S., Merenmies J., Vassalli J. D., Efstratiadis A., Accili D., Parada L. F. 2003. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature*. 426 : 291—295.
- Nishino K., Hattori N., Tanaka S., Shiota K. 2004. DNA methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonadal development. *J. Biol. Chem.* 279 : 22 306—22 313.
- Oh H. J., Li Y., Lau Y. F. 2005. Sry associates with the heterochromatin protein 1 complex by interacting with a KRAB domain protein. *Biol. Reprod.* 72 : 407—415.
- Ohe K., Lalli E., Sassone-Corsi P. 2002. A direct role of SRY and SOX proteins in pre-mRNA splicing. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 1146—1151.
- Palmer S. J., Burgoyne P. S. 1991. *In situ* analysis of fetal, prepuberal and adult XX→XY chimeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development*. 112 : 265—268.
- Pamilo P., O'Neill R. J. W. 1997. Evolution of the Sry genes. *Mol. Biol. Evol.* 14 : 49—55.
- Pannetier M., Tilly G., Kocer A., Hudrisier M., Renault L., Chesnais N., Costa J., Le Provost F., Vaiman D., Vilotte J., Pailhoux E. 2006. Goat SRY induces testis development in XX transgenic mice. *FEBS Lett.* 580 : 3715—3720.
- Pask A. J., Calatayud N. E., Shaw G., Wood W. M., Renfree M. B. 2010. Oestrogen blocks the nuclear entry of SOX9 in the developing gonad of a marsupial mammal. *BMC Biol.* 8 : 113.
- Peng H., Ivanov A. V., Oh H. J., Lau Y. H., Rauscher F. J., 3rd. 2009. Epigenetic gene silencing by the SRY protein is mediated by a KRAB-O protein that recruits the KAP1 co-repressor machinery. *J. Biol. Chem.* 284 : 35 670—35 680.
- Pilon N., Daneau I., Paradis V., Hamel F., Lussier J. G., Viger R. S., Silversides D. W. 2003. Porcine SRY promoter is a target for steroidogenic factor 1. *Biol. Reprod.* 68 : 1098—1106.
- Polanco J. C., Koopman P. 2007. Sry and the hesitant beginnings of male development. *Develop. Biol.* 302 : 13—24.
- Polanco J. C., Wilhelm D., Davidson T. -L., Knight D., Koopman P. 2010. Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum. Mol. Genet.* 19 : 506—516.
- Polanco J. C., Wilhelm D., Mizusaki H., Jackson A., Browne C., Davidson T., Harley V., Sinclair A., Koopman P. 2009. Functional analysis of the SRY-KRAB interaction in mouse sex determination. *Biol. Cell.* 101 : 55—67.
- Pontiggia A., Rimini R., Harley V. R., Goodfellow P. N., Lovell-Badge R., Bianchi M. E. 1994. Sex-reversing mutations affect

the architecture of SRY—DNA complexes. *EMBO J.* 13 : 6115—6124.

Poulat F., de Santa Barbara P., Desclozeaux M., Soullier S., Moniot B., Bonneaud N., Boizet B., Berta P. 1997. The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J. Biol. Chem.* 272 : 7167—7172.

Qin Y., Bishop C. E. 2005. Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Hum. Mol. Genet.* 14 : 1221—1229.

Robert N. M., Tremblay J. J., Viger R. S. 2002. Friend of GATA (FOG)-1 and FOG-2 differentially repress the GATA-dependent activity of multiple gonadal promoters. *Endocrinology.* 143 : 3963—3973.

Ross D. G., Bowles J., Koopman P., Lehnert S. 2008. New insights into SRY regulation through identification of 5' conserved sequences. *BMC Mol. Biol.* 9 : 85.

Salas-Cortes L., Jaubert F., Barbaux S., Nessmann C., Bono M. R., Fellous M., McElreavey K., Roseblatt M. 1999. The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *Int. J. Develop. Biol.* 43 : 135—140.

Sanchez-Moreno I., Coral-Vazquez R., Mendez J. P., Canto P. 2008. Full-length SRY protein is essential for DNA binding. *Mol. Hum. Reprod.* 14 : 325—330.

Sekido R. 2010. SRY: a transcriptional activator of mammalian testis determination. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42 : 417—420.

Sekido R., Bar I., Narvaez V., Penny G., Lovell-Badge R. 2004. SOX9 is upregulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Develop. Biol.* 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.

Sekido R., Lovell-Badge R. 2009. Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge? *Trends Genet.* 25 : 19—29.

Sekiya I., Koopman P., Watanabe H., Ezura Y., Yamada Y., Noda M. 1997. SOX9 enhances aggrecan gene expression via the promoter region containing a single HMG box sequence in a chondrogenic cell line, TC6. *J. Bone Miner. Res.* 12 : 222.

Shahid M., Dhillon 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. *Mol. Hum. Reprod.* 10 : 521—526.

Shen J., Ingraham H. 2002. Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol. Endocrinol.* 16 : 529—540.

Shoemaker C., Ramsey M., Queen J., Crews D. 2007. Expression of Sox9, Mis, and Dmrt1 in the gonad of a species with temperature-dependent sex determination. *Develop. Dyn.* 236 : 1055—1063.

Sim H., Argentaro A., Czech D. P., Bagheri-Fam S., Sinclair A. H., Koopman P., Boizet-Bonhoure B., Poulat F., Harley V. R. 2011. Inhibition of SRY-calmodulin complex formation induces ectopic expression of ovarian cell markers in developing XY gonads. *Endocrinology.* 152 : 2883—2893.

Sim H., Argentaro A., Harley V. R. 2008. Boys, girls and shuttling of SRY and SOX9. *Trends Endocrinol.* 19 : 213—222.

Sim H., Rimmer K., Kelly S., Ludbrook L. M., Clayton A. H., Harley V. R. 2005. Defective calmodulin-mediated nuclear transport of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in XY sex reversal. *Mol. Endocrinol.* 19 : 1884—1892.

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., Sinclair A. H. 2004. Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays.* 26 : 120—132.

Smith J. M., Koopman P. A. 2004. The ins and outs of transcriptional control: nucleocytoplasmic shuttling in development and disease. *Trends Genet.* 20 : 4—8.

Sudbeck P., Scherer G. 1997. Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J. Biol. Chem.* 272 : 27 848—27 852.

Sutou S., Mitsui Y., Tsuchiya K. 2001. Sex determination without the Y chromosome in two Japanese rodents *Tokudaia osimensis osimensis* and *Tokudaia osimensis* spp. *Mamm. Genome.* 12 : 17—21.

Sutton E., Hughes J., White S., Sekido R., Tan J., Arboleda V., Rogers N., Knowler K., Rowley L., Eyre H., Rizzoti K., McAninch D., Goncalves J., Slee J., Tubitt E., Bruno D., Bengtsson 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. *J. Clin. Invest.* 121 : 328—341.

Tamashiro D. A., Alarcon V. B., Marikawa Y. 2008. Ectopic expression of mouse Sry interferes with Wnt/beta-catenin signaling in mouse embryonal carcinoma cell lines. *Biochim. biophys. acta.* 1780 : 1395—1402.

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.

Thevenet L., Mejean C., Moniot B., Bonneaud N., Galeotti N., Aldrian-Herrada G., Poulat F., Berta P., Benkirane M., Boizet-Bonhoure B. 2004. Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation. *EMBO J.* 23 : 3336—3345.

Turner M. E., Ely D., Prokop J., Milsted A. 2011. Sry, more than testis determination? *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301 : R561—R571.

Uhlenhaut N., Jakob S., Anlag K. E., Sekido T. R., Kress J., Treier A. -C., Klugmann C., Klasen C., Holter N., 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.

Valleley E. M. A., Cartwright E. J., Croft N. J., Markham A. F., Coletta P. L. 2001. Characterization and expression of Sox9 in the Leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *J. Exp. Zool.* 291 : 85—91.

Vidal V., Chaboissier M., de Rooij D., Schedl A. 2001. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet.* 28 : 216—217.

Vietia R., Ion A., Barbaux S., Jobling M. A., Souleyreau N., Ennis K., Ostrer H., Tosi M., Meo T., Chibani J., Fellous M., McElreavey K. 1997. Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype. *Hum. Genet.* 99 : 648—652.

Wagner K. -D., Wagner N., Schedl A. 2003. The complex life of WT1. *J. Cell Sci.* 116 : 1653—1658.

Wagner T., Wirth J., Meyer J., Zabel B., Held M., Zimmer J., Pasantes J., Bricarelli F. D., Keutel J., Hustert E., Wolf U., Tommerup N., Schempp W., Scherer G. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell.* 79 : 1111—1120.

Wallis M. C., Waters P. D., Graves J. A. 2008. Sex determination in mammals—before and after the evolution of SRY. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 : 3182—3195.

Weil D., Wang I., Dietrich A., Poustka A., Weissenbach J., Petit C. 1994. Highly homologous loci of the X and Y chromosomes are hot-spots for ectopic recombinations leading to XX maleness. *Nat. Genet.* 7 : 414—419.

Western P. S., Harry J. L., Graves J. A., Sinclair A. H. 1999. Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Develop. Dyn.* 216 : 411—419.

Whitfield L. S., Lovell-Badge R., Goodfellow P. N. 1993. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature.* 364 : 713—715.

Wilhelm D., Hiramatsu R., Mizusaki H., Widjaja L., Combes A. N., Kanai Y., Koopman P. 2007a. SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription *in vivo* to ensure testis development. *J. Biol. Chem.* 282 : 10 553—10 560.

Wilhelm D., Martinson F., Bradford S., Wilson M. J., Combes A. N., Beverdam A., Bowles J., Mizusaki H., Koopman P. 2005. Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Develop. Biol.* 287 : 111—124.

Wilhelm D., Palmer S., Koopman P. 2007b. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.* 87 : 1—28.

Wilkie A. O., Campbell F. M., Daubeney P., Grant D. B., Daniels R. J., Mullarkey M., Affara N. A., Fitchett M., Huson S. M. 1993. Complete and partial XY sex reversal associated with terminal deletion of 10q: report of 2 cases and literature review. *Amer. J. Med. Genet.* 46 : 597—600.

Wilson C. A., Davis D. C. 2007. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction.* 133 : 331—359.

Wilson M. J., Jeyasuria P., Parker K. L., Koopman P. 2005. The transcription factors steroidogenic factor-1 and SOX9 regulate expression of *Vanin-1* during mouse testis development. *J. Biol. Chem.* 280 : 5917—5923.

Wilson M., Koopman P. 2002. Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 12 : 441—446.

Wright E., Hargrave M. R., Christiansen J., Cooper L., Kun J., Evans T., Gangadharan U., Greenfield A., Koopman P. 1995. The *Sry*-related gene *Sox-9* is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* 9 : 15—20.

Wu J. B., Chen K., Li Y., Lau Y. F., Shin J. C. 2009. Regulation of monoamine oxidase A by the SRY gene on the Y chromosome. *FASEB J.* 23 : 4029—4038.

Yamashita S., Andoh M., Ueno-Kudoh H., Sato T., Miyaki S., Asahara H. 2009. Sox9 directly promotes *Bapx1* gene expression to repress *Runx2* in chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 315 : 2231—2240.

Yao H. H., Capel B. 2005. Temperature, genes, and sex: a comparative view of sex determination in *Trachemys scripta* and *Mus musculus*. *J. Biochem.* 138 : 5—12.

Поступила 16 XII 2011

SRY AND SOX9: THE MAIN GENETIC FACTORS OF MAMMALIAN SEX DETERMINATION

V. G. Kozhukhar

State Academy of Pediatrics, St. Petersburg;
e-mail: V.Kozhukhar@yandex.ru

More than 20 years have passed since the discovery of the gene *SRY* (*Sry* in mice genome) which turn on the process of mammalian sex determination. Factor SRY is the key trigger of this process by means of initiation the autosomal gene *SOX9* expression. SOX9 transcript is the master regulator of Sertoli cell differentiation and the male type of gonad development. In this review the features of *SRY* and *SOX9* expression, intracellular transport and the targets of SRY and SOX9 transcripts, the male and female signal pathways interaction and the mechanisms of initial gonadal sex differentiation are discussed. The evolutionary aspects of the role of SRY and SOX9 are also compared which implies the differentiation of the testes in males is conserved in vertebrates and SOX9 shows highly conserved as the master factor in this process.

Key words: sex determination, SRY, SOX9, HMG-domain, NLS, gene expression, Sertoli cells, Y-chromosome evolution.