

Molekularne mechanizmy determinacji płci u ptaków

ANDRZEJ SECHMAN

Katedra Fizjologii Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt AR, Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Sechman A.

Molecular mechanisms of sex determination in birds

Summary

Female birds contain the ZW heterozygote, whereas male birds carry the ZZ homozygote. Depending on their genetic sex bipotential gonads develop into ovary or testes. In the case of birds, unlike mammals, P450arom and sex hormones are involved in the process of bipotential gonad development. The Sry gene triggering sex determination which is present in mammals has so far not been isolated in birds, and it is unclear whether the sex determining gene resides in W chromosomes and whether the gene dosage mechanism is involved in sex determination. Nevertheless, the cascade sex determination mechanism in birds is associated with the expression of several autosomal genes, i.e. Wt1, Sf1, Sox9, Dax1, Amh, which have already been identified in mammals. Recent investigations suggest that Dmrt1 (on Z chromosome) and Wpkci/ASW (on W chromosome) are strong candidates for sex-determining genes expressed in male or female bird's gonads, respectively.

Keywords: birds, sex determination

Z procesem formowania płci związane są dwa pojęcia: determinacja płci i różnicowanie płciowe. Pierwsze z tych pojęć dotyczy mechanizmów, które kierują różnicowaniem płciowym gonad, natomiast drugie – procesów biorących udział w rozwoju jąder lub jajników ze stadium gonady niezróżnicowanej (tzw. gonady bipotencjalnej). U wszystkich kręgowców rozwój płciowy składa się z trzech następujących po sobie procesów: określenia płci chromosomalnej w momencie zapłodnienia (tzw. płć genetyczna), rozwoju niezróżnicowanych gonad w kierunku jąder lub jajników (tzw. płć gonadalna) i różnicowania wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych zgodnie z płcią gonadalną (tzw. płć fenotypowa) (42). U ptaków, podobnie jak u ssaków, proces determinacji i różnicowania płciowego gonad obejmuje szereg przemian molekularnych, które, następując jedna po drugiej, tworzą swoistą kaskadę zdarzeń. Zastosowanie technik molekularnych przyczyniło się w ostatnich latach do zidentyfikowania wielu genów uczestniczących w procesach determinacji i różnicowania gonad. Większość z tych badań dotyczy molekularnych uwarunkowań determinacji płci u kury domowej.

Genom kury domowej składa się z 38 par autosomów i jednej pary chromosomów płciowych (41). W przeciwieństwie do ssaków, u ptaków samica jest heterogametyczna i posiada układ chromosomów płciowych ZW, natomiast samiec jest homogametyczny – ZZ. Układ chromosomów ZW prowadzi do rozwoju lewego jajnika (prawy jajnik degeneruje), zaś obecność dwóch chromosomów Z prowadzi do rozwoju symetrycznych jąder. Poprzez analogię do chromosomu Y u ssaków, sugeruje się, że i u ptaków chromosom W

mógłby mieć podobne znaczenie w determinacji płci. Na przykład u osobników aneuploidalnych o kariotypie XO (zespół Turnera u człowieka) gonady są szczątkowe (niedorozwinięte) lub ich brak. Pacjenci z trisomią XXY (zespół Klinefeltera) posiadają normalne genitalia, jednakże kanaliki nasieniotwórcze są słabo uformowane. U ptaków aneuploidy ZO nie zostały zidentyfikowane. Triploidy ZZW po wykluciu są seksowane jako samice, jednakże później, w czasie dojrzewania płciowego następuje u nich maskulinizacja i stają się interseksami. Osobniki o genotypie triploidalnym ZZZ są fenotypowo samcami (12, 29, 30, 43). Obserwacje te sugerują, że chromosom W do pewnego stopnia mógłby mieć wpływ feminizujący u ptaków. Do tej pory jednakże u ptaków w chromosomie W nie udało się zmapować genu homologicznego do genu Sry, który podobnie jak u ssaków mógłby być właściwym genem odpowiedzialnym za determinację pierwotnej, bipotencjalnej gonady. Powodem tego może być fakt, że chromosomy płciowe ssaków i ptaków nie są homologiczne, gdyż powstały one w toku ewolucji z różnych par autosomów (9, 11, 22). U ptaków nie jest jasne, czy mechanizm determinujący płć uzależniony jest od specyficznego genu na chromosomie W, czy też od dawki genu (lub genów) z chromosomu Z (podwójnej – determinującej różnicowanie jąder lub pojedynczej – prowadzącej do rozwoju lewego jajnika) (10, 12, 20). Ostatni z mechanizmów oparty jest na obserwacjach wielu badaczy, którzy u osobników męskich ZZ wykazali brak kompensacyjnej inaktywacji niektórych genów obecnych w chromosomie Z (4, 10, 18, 19).

Pomimo tych różnic ogólny schemat obrazujący proces determinacji płci u ssaków i ptaków jest podobny

(6, 21, 34, 42). Najpierw formowany jest grzebień płciowy, który przekształca się w tzw. gonadę bipotencjalną. W procesie różnicowania gonada bipotencjalna pod wpływem swoistej, genetycznie uwarunkowanej kaskady zdarzeń przekształca się w jądro (u ssaków u osobników XY, a u ptaków – ZZ) lub jajnik (u ssaków u osobników XX, natomiast u ptaków u osobników ZW). U ptaków w 1. dniu embriogenezy pierwotne komórki płciowe (PGC) znajdują się w endodermie, skąd w 2. dniu embriogenezy (po około 33 godz. inkubacji) przechodzą do krwiobiegu i do 3. dnia embriogenezy osiedlają się na śródnerzach, tworząc tzw. grzebienie płciowe. Grzebienie te przekształcają się w gonadę bipotencjalną, której okres różnicowania do jądra lub jajnika przypada od 4. do 8. dnia embriogenezy. W okresie tym płeć gonady nie jest rozpoznawalna pod względem morfologicznym. Powstają wtedy wokół pierwotnych komórek płciowych tzw. pierwotne sznury płciowe, które stopniowo u osobników ZZ przekształcają się w kanaliki nasieniotwórcze, natomiast u osobników ZW tworzą się rdzeń jajnika. Od 9. dnia embriogenezy w jądrach następuje podział komórek prapłciowych – powstają spermatogonia, natomiast u embrionów ZW w lewym jajniku tworzą się tzw. wtórne sznury płciowe, z których powstaje kora jajnika (komórki prapłciowe dzielą się, tworząc oogonia) (13, 21).

Analizując udział różnych czynników w procesie różnicowania gonad ptaków, w niniejszym opracowaniu podjęto próbę odpowiedzi na następujące pytania:

- w jakim stopniu różnicowanie gonad uzależnione jest od genów kodujących enzymy procesu steroidogenezy,
- czy u ptaków występują homologiczne do ssaczy geny determinujące proces różnicowania gonady bipotencjalnej,
- czy istnieją specyficzne ptasie geny odpowiedzialne za proces różnicowania tejże gonady.

Geny kodujące enzymy procesu steroidogenezy a determinacja płci

U ptaków wykazano, że traktowanie embrionów w początkowej fazie inkubacji hormonami steroidowymi może wpływać na początkową organogenezę gonad. Podawanie dietylostilbestrolu męskim zarodkom (ZZ) w 4. dniu embriogenezy (tj. w fazie gonady niezróżnicowanej) powoduje przejściową feminizację lewej gonady i powstanie tzw. *ovotestis*. Z kolei iniekcja testosteronu genetycznym samicom (ZW) w 4. dniu embriogenezy, tj. przed rozpoczęciem procesu różnicowania gonad, nie powoduje maskulinizacji gonad, następuje jedynie częściowa regresja przewodów Müllera (15). Dane te sugerują, że u ptaków determinacja płci jest przynajmniej częściowo labilna oraz odwracalna w odpowiedzi na hormonalne lub chirurgiczne manipulacje.

Głównymi dwoma hormonami steroidowymi, aktywnymi w procesie determinacji płci są: testosteron (T) u samców i estradiol (E_2) u samic. Obecność tych hormonów wykazano immunocytochemicznie w komórkach interstycjalnych niezróżnicowanych gonad obu płci

już w 3,5. dniu embriogenezy, jednakże w 6,5. dniu embriogenezy ilość produkowanych androgenów i estrogenów w gonadach wykazuje różnice płciowe (44, 45). Dlatego też w badaniach dotyczących mechanizmów różnicowania gonad u ptaków zwrócono szczególną uwagę na poziom ekspresji genów kodujących enzymy procesu steroidogenezy: głównie 17α -hydroksylazy (P450c17) i aromatazy (P450arom). P450c17 jest enzymem odpowiedzialnym za przekształcenie pregnenolonu do 17α -hydroksyprogesteronu, a następnie do androstendionu, natomiast P450arom jest podstawowym enzymem konwertującym androgeny do estrogenów (głównie do estradiolu). Pojawienie się ekspresji genu P450arom w początkowej fazie embriogenezy stanowi klucz do zrozumienia mechanizmu determinacji płci u ptaków, gdyż ekspresja tego genu jest prawdopodobnie regulowana przez geny inicjujące rozwój i odpowiedzialne za determinację jajnika. Grupa prof. Shimady z Uniwersytetu Nagoya (Japonia) metodą hybrydyzacji *in situ* oraz metodą RT-PCR wykazała, że ekspresja mRNA genu P450c17 pojawia się zarówno w gonadach męskich (ZZ), jak i żeńskich (ZW) już w 5. dniu embriogenezy (a więc w fazie gonady bipotencjalnej). Brak jest wyraźnej różnicy w dystrybucji mRNA genu P450c17 w gonadzie męskiej i żeńskiej. Z kolei ekspresja mRNA P450arom pojawia się w gonadzie żeńskiej w 6. dniu rozwoju embrionalnego, a następnie wzrasta w kolejnych dniach inkubacji. Nie stwierdzono ekspresji mRNA tego genu w gonadach embrionów ZZ (24, 32-34, 47).

W 1992 Elbrecht i Smith (7) podjęli próbę zastosowania niesteroidowego inhibitora aromatazy (Fadrozolu) do zahamowania syntezy aromatazy P450 i określenia roli tego genu w rozwoju gonad u samic (ZW). Badacze ci wykazali, że podawanie inhibitora aromatazy w 3. dniu embriogenezy prowadzi do maskulinizacji lewej gonady i powstania *ovotestis*; prawa gonada rozwija się w kierunku jądra. Eksperyment ten został powtórzony w przez Abinawanto i wsp. (1, 3), którzy również obserwowali rewersję (odwrócenie) płci u osobników ZW. Dojrzałe płciowo, 10-miesięczne osobniki ZW traktowane inhibitorem aromatazy w 3. dniu embriogenezy charakteryzowały się wyraźnymi cechami fenotypowymi samców (duży, rozwinięty grzebień i dzwonek, charakterystyczne kogucie upierzenie i masa ciała), a także wykazywały behavior płciowy koguta (2). Pomimo że ptaki te są bezpłodne, w ich gonadach stwierdzono obecność dojrzałych plemników Z oraz, co jest znacznie bardziej interesujące, obecność spermatyd i plemników z chromosomem płciowym W (7). Nishikimi i wsp. (24) wykazali, że inhibitor aromatazy iniekowany do zapłodnionych jaj w 3. dniu inkubacji nie wpłynął na poziom ekspresji genu P450c17 w obu gonadach, natomiast znacząco obniżył ekspresję genu P450arom w gonadzie żeńskiej oraz zwiększył ekspresję mRNA hormonu anty-müllerowskiego (Amh). Wyniki te wskazują na odwrotną zależność między ekspresją genów Amh i P450arom w różnicującej się płciowo gonadzie oraz dowodzą, że geny odpowiedzialne

za determinację płci wpływają na geny steroidogenezy stymulując lub hamując ich ekspresję (24). Reasumując można stwierdzić, że u ptaków: determinacja płci jest labilna i odwracalna w odpowiedzi na hormonalne manipulacje; produkcja estrogenów jest niezbędna do różnicowania jajnika; ekspresja genu P450arom zachodzi jedynie w gonadzie osobników ZW; P450arom jest kluczowym enzymem procesu steroidogenezy determinującym rozwój gonady bipotencjalnej do jajnika; gen P450arom wydaje się celem dla genu lub genów odpowiedzialnych za determinację płci żeńskiej.

Udział genów homologicznych do genów ssaków w rozwoju i różnicowaniu gonady bipotencjalnej

U ssaków kluczową rolę w indukowaniu niezróżnicowanej gonady w kierunku jądra odgrywa gen SRY (Sex-determining region of Y chromosome). Gen ten u człowieka został zmapowany w krótkim ramieniu chromosomu Y przez Sinclaira i wsp. (35). U myszy homologiczny gen *Sry* podlega ekspresji w niezróżnicowanej gonadzie tuż przed i w trakcie różnicowania się jej w jądro. Koopman i wsp. (17) przeprowadzili eksperyment, w którym iniekowali DNA genu *Sry* (14 kb) do mysich jaj XX. W ten sposób wytworzyli samcze myszy transgeniczne, które były nosicielami mysiego genu *Sry*, chociaż ich kariotyp był żeński (XX). Osobniki te były jednakże nieplodne. Izolacja genu *SRY* stała się przełomowym momentem w badaniach dotyczących determinacji płci u ssaków (42).

U ptaków do tej pory nie udało się wyizolować genu homologicznego do genu *Sry*. Niemniej jednak od momentu odkrycia genu *Sry* również u ptaków prowadzone były badania, których celem było znalezienie genów uczestniczących w procesie determinacji gonad. Do tej pory u kury domowej, której dotyczy większość badań, stwierdzono obecność niektórych genów autosomalnych homologicznych do genów ssaków. W okresie formowania gonady bipotencjalnej wykazano ekspresję następujących genów homologicznych:

– *Sfl/Ad4BP* (steroidogenic factor-1/Adrenal 4 binding protein). U kury domowej ekspresja tego genu występuje już w 3,5. dniu embriogenezy. Do 7. dnia embriogenezy następuje stopniowy wzrost ekspresji *Sfl* w gonadach embrionów ZW. W rejonie promotora genu P450arom i *Amh* występują miejsca wiążące dla produktu genu *Sfl* (36, 37, 46);

– *Wt1* (Wilm's tumour-suppressing gene 1). U ludzi mutacje genu *WT1* powodują powstanie zespołu Denysa-Drasha objawiającego się dysgenезją gonad. Region promotorowy genu *SRY* posiada miejsca wiązania białka *WT1*. U ptaków ekspresję genu *Wt1* stwierdzono metodą RT-PCR w gonadach bipotencjalnych w 4. dniu embriogenezy. Poziom tej ekspresji nie różnił się istotnie w gonadach embrionów ZZ i ZW. Wykazano, że *Wt1* współdziała z genem *Sfl* kontrolując poziom ekspresji genu *Amh* (37).

W okresie różnicowania gonady bipotencjalnej, tj. od 4. do 8. dnia embriogenezy u kury domowej ziden-

tyfikowano następujące geny homologiczne do genów ssaków:

– *Sox9* (SRY-related HMG box gene 9) – u ssaków koduje białko w 60% homologiczne do rejonu HMG (high mobility group) genu *SRY*, a jego ekspresja pojawia się we wczesnych etapach embriogenezy w tkance mezenchymatycznej, w miejscach jej przekształcania się w chrząstkę oraz w prekursorowej linii komórek Sertoliego w grzebieniach płciowych. U kury domowej ekspresja genu *Sox9* pojawia się w 6. dniu inkubacji w gonadach embrionów ZZ, w gonadach embrionów żeńskich poziom ekspresji jest bardzo słaby. W przeciwieństwie do ssaków, u ptaków ekspresja genu *Amh* wyprzedza ekspresję genu *Sox9* (16, 20, 26, 46);

– *Dax1* (dosage sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia cogenita critical region on the X, gene 1) – u ludzi *DAX1* zmapowano w chromosomie X. Duplikacja tego genu powoduje rozwój płci żeńskiej u pacjentek 46,XY z czynną funkcjonalnie kopią *SRY* (następuje całkowita rewersja płci). U kurcząt gen ten zmapowano w chromosomie 1, a jego ekspresja zachodzi przez cały okres różnicowania płciowego w takim samym stopniu u obu płci (27, 38, 46);

– *Amh* (anti Müllerian hormone) – należy do rodziny transformujących czynników wzrostu (TGF- β). Odpowiedzialny jest za regresję przewodów Müllera oraz hamowanie ekspresji genu P450arom. W przeciwieństwie do ptaków, u ssaków *Amh* nie jest zaliczany do genów bezpośrednio uczestniczących we wczesnej fazie formowania gonady. U kury domowej ekspresja tego genu w gonadach męskich pojawia się w 5. dniu embriogenezy, a następnie szybko się zwiększa. W gonadzie ZW poziom ekspresji jest bardzo niski (5, 24, 26, 46).

Reasumując, badania te wskazują, że u ptaków w procesie różnicowania gonad włączonych jest szereg genów autosomalnych, których obecność stwierdzono uprzednio u ssaków. W fazie formowania gonady bipotencjalnej rozpoczyna się ekspresja genów *Sfl* i *Wt1*, natomiast w fazie różnicowania gonady bipotencjalnej pojawia się ekspresja *Sox9*, *Dax1* i *Amh*.

Specyficzne ptasie geny włączone w proces determinacji i różnicowania płciowego

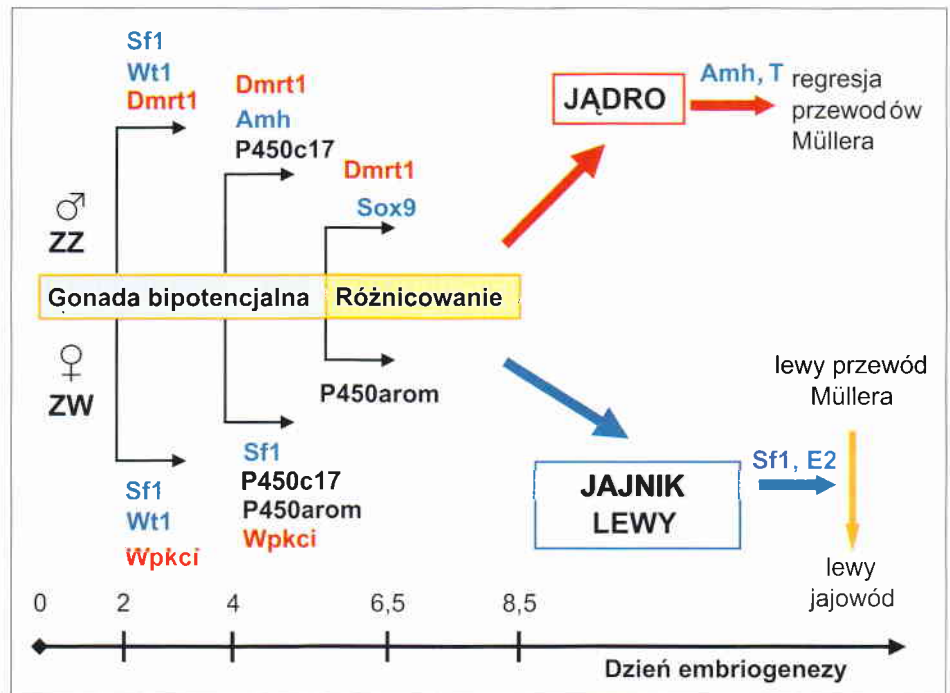
Gen *Dmrt1* na chromosomie Z. W 1998 Raymond i wsp. (27) wyizolowali z biblioteki genów ludzkiego jądra gen *DMRT1* (doublesex- and mab-3-related transcription factor 1). Gen ten posiada domenę DM kodującą regulatorowe białka zaangażowane w kontrolę procesu determinacji płci u bezkręgowców w genach: *dsx* u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) i *mab-3* u nicienia (*Caenorhabditis elegans*). Gen *DMRT1* zmapowano w ludzkim chromosomie 9 i wykazano, że dwie kopie genu *DMRT1* są niezbędne do rozwoju jąder.

W 1999 Nanda i wsp. (23) jako pierwsi wykazali obecność homologicznego genu *Dmrt1* u kury domowej i zmapowali jego miejsce w chromosomie Z. Ostatnie badania porównawcze wykazały, że pomiędzy chro-

mosomem Z u kury i chromosomem 9 u człowieka występuje znaczne podobieństwo genetyczne (22, 40). U kury domowej ekspresja genu *Dmrt1* pojawia się w grzebieniach płciowych i przewodach Müllera w 3.-4. dniu embriogenezy, poprzedza ekspresję genu *Amh*, a jej poziom u embrionów ZZ jest istotnie wyższy niż u ZW. Wykazano, że ekspresja genu *Dmrt1* w gonadach embrionów męskich (ZZ) stopniowo rośnie w kolejnych daniach inkubacji (28). Ostatnio ekspresję genu *Dmrt1* stwierdzono również w chromosomie Z u ptaków bezgrzebieniowych (*Ratitae*), u których chromosomy płciowe Z i W są homomorficzne. U emu ekspresję *Dmrt1* wykazano w grzebieniach płciowych embrionów ZZ w początkowej fazie embriogenezy, korespondującej z procesem różnicowania gonady bipotencjalnej (31). Lokalizacja genu *Dmrt1* w chromosomie Z sugeruje, że gen ten należy do podstawowych czynników włączonych w proces determinacji płci u ptaków. Przemawiają za tym wyniki opublikowanej ostatnio pracy Smitha i wsp. (39), w której wykazano, że zahamowanie ekspresji genu *P450arom* poprzez podanie inhibitora aromatazy w 3. dniu embriogenezy, wywołuje wzrost ekspresji genu *Dmrt1* z pojedynczego chromosomu Z obecnego u embrionów żeńskich (ZW). Formowanie jąder u osobników ZW po podaniu inhibitora aromatazy dowodzi, że dwie kopie genu *Dmrt1* nie są konieczne do procesu różnicowania jąder.

Geny na chromosomie W. W ostatnich latach podejmowano próby identyfikacji genów na chromosomie W uczestniczących w procesie determinacji gonad u ptaków. Ellegren (8), a następnie Fridolfsson i wsp. (11) zlokalizowali w krótkim ramieniu chromosomu W geny *CHD1W* i *ATP5A1W*. Gen *CHD1W* koduje białko wiążące chromohelikazę DNA, zaś *ATP5A1W* koduje białko podjednostki α syntazy ATP. Ponieważ odpowiedniki tych genów zmapowano również w chromosomie Z ich rola w determinacji płci u ptaków jest mało prawdopodobna.

Innym genem, który może uczestniczyć w procesie różnicowania gonady bipotencjalnej w kierunku jajnika jest zidentyfikowany w chromosomie W gen *Wpkci*, który oznaczany jest również jako gen *ASW*. Gen *Wpkci* (protein kinase C inhibitor on W chromosome) został zmapowany przez Horiego i wsp. (14) jako tandemowo usytuowana sekwencja w końcowym obszarze krótkiego ramienia chromosomu W. Gen ten pod nazwą *ASW* (Avian Sex-specific W-linked) został zidentyfikowany w tym samym roku również przez O'Neill i wsp. (25). Wykazano, że ekspresja genu *Wpkci* występuje w gonadach bipotencjalnych embri-



Ryc. 1. Schemat ekspresji genów uczestniczących w procesie determinacji płci u kury domowej (opis skrótów w tekście)

nów ZW należących do 12 różnych rzędów ptaków grzebieniowych (*Carinatae*). Dlatego też u ptaków tych *Wpkci* uważany jest obecnie za główny gen odpowiedzialny za proces różnicowania gonady bipotencjalnej w kierunku jajnika. Przemawiają za tym również następujące fakty: gen *Wpkci* zlokalizowany jest w chromosomie W występującym u samic, u kury domowej ekspresja *Wpkci* pojawia się w grzebieniu płciowym embrionów ZW już w 3. dniu embriogenezy, tj. jeszcze przed rozpoczęciem procesu różnicowania gonad, a powstałe w procesie translacji białko *Wpkci* występuje głównie w jądrze komórkowym dowodząc, że *Wpkci* należy do aktywnych czynników transkrypcyjnych (12).

Udział poszczególnych, omawianych w niniejszym opracowaniu, genów w procesie determinacji płci u kury domowej przedstawiono na ryc. 1. Podsumowując można stwierdzić, że u ptaków płeć chromosomalna zeterminowana jest obecnością chromosomów płciowych: samce mają dwa chromosomy Z, a samice jeden chromosom Z, a drugi W. W procesie determinacji płci u ptaków włączone są geny procesu steroidogenezy, a głównym genem różnicującym jest gen aromatazy *P450*. W procesie różnicowania gonady bipotencjalnej bierze udział szereg genów autosomalnych, których obecność wykazano uprzednio u ssaków. Specyficznymi genami uczestniczącymi w procesie różnicowania gonady bipotencjalnej ptaków są geny: *Dmrt1* (występujący na chromosomie Z), którego ekspresja warunkuje rozwój jąder oraz gen *Wpkci* (na chromosomie W) uczestniczący w formowaniu lewego jajnika. Ponieważ ekspresja genów *Dmrt1* i *Wpkci* pojawia się w początkowym okresie rozwoju gonady bipotencjalnej, wielu badaczy sugeruje, że geny te są głównymi kandydatami do roli genetycznych czynników biorących udział w procesie determinacji płci u ptaków. Potwierdzenie tej hipotezy

oraz wyjaśnienie zależności między poszczególnymi genami biorącymi udział w molekularnym mechanizmie determinacji płci wymagać będzie jednak dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. *Abinawanto, Shimada K., Yoshida K., Saito N.*: Effects of aromatase inhibitor on sex differentiation and levels of P450_{17 α} and P450_{arom} messenger ribonucleic acid of gonads in chicken embryos. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1996, 102, 241-246.
2. *Abinawanto, Shimada K., Saito N.*: Sex-reversal effects of non-steroidal aromatase inhibitor on aromatase (P450_{arom}) mRNA expression in adult chicken gonads. *Jpn. Poult. Sci.* 1997, 34, 158-168.
3. *Abinawanto, Zhang C., Saito N., Matsuda Y., Shimada K.*: Identification of sperm-bearing female-specific chromosome in the sex-reversed chicken. *J. Exp. Zool.* 1998, 280, 65-72.
4. *Baverstock P. R., Adams M., Polkinghorne R. W., Gelder M.*: A sex-linked enzyme in birds-Z-chromosome conservation but no dosage compensation. *Nature* 1982, 296, 763-766.
5. *Carre-Eusebe D., Di Clemente N., Rey R., Pieau C., Vigier B., Josso N., Picard J.-Y.*: Cloning and expression of the chick anti-Müllerian hormone gene. *Biol. Chem.* 1996, 271, 4798-4804.
6. *Clinton M.*: Sex determination and gonadal development: a bird's eye view. *J. Exp. Zool.* 1998, 281, 457-465.
7. *Elbrecht A., Smith R. C.*: Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 1992, 255, 464-469.
8. *Ellegren H.*: First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc. R. Soc. Lond. B* 1996, 263, 1635-1641.
9. *Ellegren H.*: Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends Genet.* 2000, 15, 188-192.
10. *Ellegren H.*: Dosage compensation: do birds do it as well? *Trends Genet.* 2002, 18, 25-28.
11. *Fridolfsson A. K., Cheng H., Copeland N. G., Jenkins N. A., Liu H. C., Raudsepp T., Woodage T., Chowdhary B., Halverson J., Ellegren H.*: Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 8147-8152.
12. *Graves J. A.*: Sex and death in birds: a model of dosage compensation that predicts lethality of sex chromosome aneuploids. *Cytogenet. Genome Res.* 2003, 101, 278-282.
13. *Hamburger V., Hamilton H. L.*: A series of normal stages in the development of chick embryo. *J. Morphol.* 1951, 88, 49-92.
14. *Hori T., Asakawa S., Itoh Y., Shimizu N., Mizuno S.*: Wpkci, encoding an altered form of PKCI, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: implication of its role in female sex determination. *Mol. Biol. Cell* 2000, 11, 3645-3660.
15. *Huston J. M., MacLaughlin D. T., Ikawa H., Budzik G. P., Donahoe P. K.*: Regression of the Müllerian ducts during sexual differentiation in the chick embryo. [w:] *Reproductive Physiology IV. International Review of Physiology*, vol. 27, red. Greep R. O., Univ. Park Press, Baltimore 1983, 177-235.
16. *Kent J., Wheatley S. C., Andrews J. E., Sinclair A. H., Koopman P.*: A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 1996, 122, 2813-2822.
17. *Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R.*: Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991, 351, 117-121.
18. *Kuroda Y., Arai N., Arita M., Teranishi M., Hori T., Harata M., Mizuno S.*: Absence of Z-chromosome inactivation for five genes in male chickens. *Chromosome Res.* 2001, 9, 457-468.
19. *Kuroiwa A., Yokomine T., Sasaki H., Tsudzuki M., Tanaka K., Namikawa T., Matsuda Y.*: Biallelic expression of Z-linked genes in male chickens. *Cytogenet. Genome Res.* 2002, 99, 310-314.
20. *Mizuno S., Kunita R., Nakabayashi O., Kuroda Y., Arai N., Harata M., Ogawa A., Itoh Y., Teranishi M., Hori T.*: Z and W chromosomes of chickens: studies on their gene functions in sex determination and sex differentiation. *Cytogenet. Genome Res.* 2002, 99, 236-244.
21. *Morrish B. C., Sinclair A. H.*: Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 2002, 124, 447-457.
22. *Nanda I., Haaf T., Scharlt M., Schmid M., Burt D. W.*: Comparative mapping of Z-orthologous genes in vertebrates: implications for the evolution of avian sex chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 2002, 99, 178-184.
23. *Nanda I., Shan Z., Scharlt M., Burt D. W., Koehler M., Nothwang H., Grutzinger F., Paton I. R., Windsor D., Dunn I., Engel W., Staeheli P., Mizuno S., Haaf T., Schmid M.*: 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat. Genet.* 1999, 21, 258-259.
24. *Nishikimi H., Kansaku N., Saito N., Usami M., Ohno Y., Shimada K.*: Sex differentiation and mRNA expression of P450_{c17}, P450_{arom} and AMH in gonads of the chicken. *Mol. Reprod. Dev.* 2000, 55, 20-30.
25. *O'Neill M., Binder M., Smith C., Andrews J., Reed K., Smith M., Millar C., Lambert D., Sinclair A.*: ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Dev. Genes Evol.* 2000, 210, 243-249.
26. *Oreal E., Pieau C., Mattei M. G., Josso N., Picard J. Y., Carre-Eusebe D., Magre S.*: Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev. Dyn.* 1998, 212, 522-532.
27. *Raymond C. S., Shamu C. E., Shen M. M., Seifert K. J., Hirsch B., Hodkin J., Zarkower D.*: Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 1998, 391, 691-695.
28. *Raymond C. S., Kettlewell J. R., Hirsch B., Bardwell V. J., Zarkower D.*: Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev. Biol.* 1999, 215, 208-220.
29. *Schmid M., Enderie M. E., Schneidder D., Schempp W.*: Chromosome banding and DNA replication patterns in bird karyotypes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 1989, 52, 139-146.
30. *Sheldon B. L., Thorne M. H.*: Sex determination in birds from the perspective of studies on triploid intersexes. VI Int. Symp. On Avian Endocrinol., March 31-April 5, 1996 Chateau Lake Louise, Alberta, Canada. Abstract 10.01.
31. *Shetty S., Kirby P., Zarkower D., Graves J. A.*: DMRT1 in a ratite bird: evidence for a role in sex determination and discovery of a putative regulatory element. *Cytogenet. Genome Res.* 2002, 99, 245-251.
32. *Shimada K.*: Comparative molecular mechanisms of sex determination and differentiation. 10th Int. Symp. Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism, Kraków June 5-6, 2001, s. 361-362.
33. *Shimada K.*: Gene expression of steroidogenic enzymes in chicken embryonic gonads. *J. Exp. Zool.* 1998, 281, 450-458.
34. *Shimada K.*: Sex determination and sex differentiation. *Avian Poult. Biol. Rev.* 2002, 13, 1-14.
35. *Sinclair A. H., Berta P., Palmer M. S., Hawkins J. R., Griffiths B. L., Smith M. J., Frislauf A. M., Lovell-Badge R., Goodfellow P. N.*: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990, 346, 240-244.
36. *Smith C. A., Smith M. J., Sinclair A. H.*: Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1999, 113, 187-196.
37. *Smith C. A., Smith M. J., Sinclair A. H.*: Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 1999, 234, 395-402.
38. *Smith C. A., Clifford V., Western P. S., Wilcox S. A., Bell K. S., Sinclair A. H.*: Cloning and expression of a DAX1 homologue in the chicken embryo. *J. Mol. Endocrinol.* 2000, 24, 23-32.
39. *Smith C. A., Katz M., Sinclair A. H.*: DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol. Reprod.* 2003, 68, 560-570.
40. *Sundström H., Webster M. T., Ellegren H.*: Is a rate of insertion and deletion mutation male biased?: Molecular evolutionary analysis of avian and primate sex chromosome sequences. *Genetics* 2003, 164, 259-268.
41. *Suzuki T., Kurosaki T., Shimada K., Kansaku N., Li S., Zudworny D., Hashimoto A., Koide M., Koike M., Takata M., Kuroiwa A., Minami S., Namikawa T., Matsuda Y.*: Cytogenetical mapping of thirty-one functional genes on chicken chromosomes by the direct banding FISH. *Cytogenetics Cell Genet.* 1999, 87, 32-40.
42. *Szatkowska J., Zych S., Kulig H.*: Determinacja płci u ssaków. *Medycyna Wet.* 59, 10, 847-852.
43. *Thorne M.H., Collins R. K., Sheldon B. L., Bobr L. W.*: Morphology of the gonads and reproductive ducts of triploid chickens. *Proc. 18th World Poult. Sci. Congr.* Nagoya, Japan 1988, s. 525-526.
44. *Woods J. E., Erton L. H.*: The synthesis of estrogen in the gonads of chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1978, 35, 360-370.
45. *Woods J. E., Podczaski E. S.*: Androgen synthesis in the gonads of chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1974, 24, 413-423.
46. *Yamamoto I., Tsukada A., Saito N., Shimada K.*: Profiles of mRNA expression of genes related to sex differentiation of the gonads in the chicken embryo. *Poult. Sci.* 2003, 82, 1462-1467.
47. *Yoshida K., Shimada K., Saito N.*: Expression of P450_{c17} a hydroxylase and P450_{arom} aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1996, 102, 233-240.