

Participación del factor de transcripción SRY en la expresión del gen *Wnt4**

Jesús Benítez Granados,¹ Ramón Mauricio Coral Vázquez,^{2,3} Josué J Castro,¹ Juan Pablo Méndez,⁴ Patricia Canto¹

RESUMEN

Antecedentes: uno de los genes autosómicos que se cree interviene en la regulación de la gónada es el *Wnt4*, ya que en la secuencia del promotor de este gen se ha descrito una secuencia consenso que puede ser reconocida por el SRY (factor determinante testicular) para regular la expresión del gen *Wnt4*.

Objetivo: analizar la participación del factor de transcripción SRY en la expresión del promotor del gen *Wnt4*.

Material y método: se construyó pTARGET-SRY, que fue transfectada en el modelo celular HEK293 (*human embryonic kidney* 293); posteriormente se determinó la presencia de la proteína SRY y los valores de expresión del ARNm de *Wnt4* y *Gapdh* (control) mediante análisis de transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Resultados: no se observaron cambios significativos en la expresión del ARNm del gen *Wnt4*.

Conclusiones: ésta es la primera vez que se realizan estudios de regulación del gen *Wnt4* en el contexto de la diferenciación gonadal. Una posible explicación de estos resultados es que la proteína SRY no regula directamente el gen *Wnt4* o que éste puede ser blanco de otros genes, como el *Sox9* o el *Rspo1* (*R-spondin1*), y de esta manera intervenir en la diferenciación gonadal.

Palabras clave: diferenciación gonadal, SRY, *Wnt4*, expresión.

ABSTRACT

Background: *Wnt4* gene is an autosomal gene that codifies for a protein that plays a role in the gonadal development. The promoter sequence of this gene contains a consensus sequence that potentially may be recognized by the SRY protein (testicular determining factor), and therefore regulate *Wnt4* expression.

Objective: To analyze the involvement of the SRY transcription factor on the expression of the promoter of *Wnt4*.

Material and method: We performed the SRY-TARGET construction, which was transfected into HEK293 cells (Human Embryonic Kidney 293). The presence of the protein in the cells was verified by Western blot. Afterward we evaluated the expression level of the mRNA of *Wnt4* and *Gapdh* (control) by reverse transcription coupled to polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: We did not find a significant changes in the mRNA level of the *Wnt4* gene in the presence of the SRY protein.

Conclusions: To our knowledge, this is the first study focused on analysis of the expression regulation of *Wnt4* gene in the context of the gonadal development. Since no effect was observed on the expression of *Wnt4* gene in the presence of SRY protein, one possibility is that the consensus region of the gene is a target for other proteins such as *Sox9* or *R-spondin1*, which consequently may participate in the gonadal differentiation.

Key words: gonadal differentiation, SRY, *Wnt4*, expression.

* Este trabajo se llevó a cabo gracias al financiamiento otorgado por la Fundación Miguel Alemán, México.

¹ División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación.

² Subdirección de Enseñanza e Investigación.

Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, DF.

³ Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, IPN, México, DF.

⁴ Unidad de Investigación en Obesidad, Facultad de Medicina, UNAM. Clínica de Obesidad, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, DF.

Correspondencia: Dra. Patricia Canto. División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, San

Lorenzo 502, 2º piso, colonia del Valle, CP 03100, México, DF. Correo electrónico: ipcanto@yahoo.com.mx

Recibido: junio 2013.

Aceptado: agosto 2013.

Este artículo debe citarse como: Benítez-Granados J, Coral-Vázquez RM, Castro JJ, Méndez JP, Canto P. Participación del factor de transcripción SRY en la expresión del gen *Wnt4*. Rev Esp Méd Quir 2013;18:182-188.

La diferenciación sexual constituye un paradigma de la embriogénesis debido a que las mutaciones de los genes que participan en este proceso no son mortales y pueden manifestarse sólo como alteraciones en el fenotipo sexual. Diversas evidencias demuestran que el destino morfológico de la gónada indiferenciada depende de un delicado equilibrio entre genes que promueven o inhiben el desarrollo testicular.¹⁻³

En 1990, Sinclair y su grupo⁴ identificaron el gen que dirige la diferenciación de la gónada primitiva en el testículo y lo denominaron *Sry*. En varios estudios publicados se ha confirmado que *Sry* es el factor determinante testicular;⁴⁻¹⁰ sin embargo, a pesar de que esta evidencia es sólida, la observación de que algunas alteraciones de la diferenciación sexual no están ligadas al cromosoma Y ha llevado a proponer que otros genes autosómicos o ligados al cromosoma X intervienen en el desarrollo gonadal, constituyéndose, todos ellos, como componentes de una cascada génica responsable de los programas de morfogénesis y diferenciación gonadal masculina.^{2,3,11-13}

Uno de los genes autosómicos que se supone intervienen en la regulación de la gónada es el *Wnt4*.^{14,15} Este gen codifica para la proteína WNT4, que pertenece a la familia de proteínas WNT y actúa en forma local vía unión al receptor Frizzled.¹⁶

Las investigaciones realizadas en ratones XX demostraron que la ausencia del gen *Wnt4* conduce a su masculinización,^{17,18} y que la sobreexpresión de este gen en ratones XY da lugar a desorganización de la vasculatura testicular, disminución de la testosterona sérica y de la proteína reguladora de la esteroidogénesis, así como a un defecto en la diferenciación de células de Sertoli y células de Leydig.^{19,20} Asimismo, se describió un sujeto con disgenesia gonadal 46,XY (fenotipo femenino, estrías gonadales y complemento cromosómico 46,XY) con una duplicación del gen *Wnt4*, en quien se postula que esta doble dosis posiblemente impidió la diferenciación de la gónada a testículo.²¹ Con base en todo lo anterior, se ha propuesto que WNT4 es una proteína implicada en la determinación testicular de los mamíferos y que actúa “corriente abajo” al gen *Sry*/SRY, pero “corriente arriba” a los genes *Sox9*/SOX9 y *Dhh*/DHH (ambos implicados en la diferenciación testicular). Aunado a lo anterior, Sim

y colaboradores²² describieron la secuencia del promotor de *Wnt4*, en el que se observa una secuencia consenso que puede ser reconocida por SRY y de esa forma regula la expresión de *Wnt4*.

El objetivo de este estudio, tomando en consideración los antecedentes descritos, fue analizar la participación del factor de transcripción SRY en la expresión del promotor del gen *Wnt4*.

MATERIAL Y MÉTODO

Amplificación de SRY y construcciones moleculares

El ADN genómico se aisló de leucocitos de sangre de un control masculino con la técnica de sales.²³ A partir del ADN se amplificó la región codificante del gen *Sry* (GENE ID6736) con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con volumen final de 25 µL, el cual contenía: 0.1 µg de ADN genómico, 0.1 mM de dNTPs, 2.0 U de Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Brasil) y 250 nM de cada oligonucleótido específico derivado de la secuencia del gen *Sry*. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron: SRY5' sentido: 5'-GCGCGGATCCCC ATG-CAATCAGCTTATTCTTCGAT-3' SRY3' antisentido: 5'-GCGCGAATTCCTACAGCTTTGTCCAGTGGCT-GT-3'.

El oligonucleótido sentido tiene la secuencia que reconoce el sitio localizado en el sitio múltiple de clonación del vector de expresión pTARGET (Promega®), que corresponde a la enzima de restricción XhoI (NEB®); asimismo, el oligonucleótido antisentido tiene la secuencia que reconoce el sitio localizado en el sitio múltiple de clonación del vector de expresión pTARGET (Promega®), correspondiente a la enzima de restricción NotI (NEB®).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización de 95°C durante cinco minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación a 95°C por un minuto, 58°C en un minuto, 72°C durante un minuto y una extensión final a 72°C por cinco minutos. El producto único de la amplificación se separó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio; posteriormente, se purificó el fragmento con el estuche comercial QIAEX II (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). Con el fin de verificar la secuencia del gen *Sry*, se

llevó a cabo su secuenciación con un estuche comercial (BigDye™, terminator cycle sequencing ready reaction kit de PE Biosystems) siguiendo las instrucciones del proveedor y de acuerdo con las condiciones del mismo. Las reacciones se analizaron en un secuenciador automático ABI-PRISM 377®. Las secuencias se estudiaron por BLAST y se comprobó que su identidad e integridad fueron iguales a las del gen *Sry* descrito en el banco de genes (GENE ID6736).

Después de comprobar la secuencia del marco de lectura del gen *Sry*, se clonó el producto de la PCR en el vector de expresión pTARGET (Promega®) unidireccionalmente entre los sitios Xho I (río arriba) y Not I (río abajo), y se generó la construcción molecular pTARGET-SRY. Una vez clonado, se procedió a la transformación en células competentes *E. coli* DH5α con la técnica por choque térmico.

Posteriormente, para verificar la separación del gen *Sry* y el plásmido, los productos de cada reacción se analizaron nuevamente mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio al 0.002%. En todos los casos se incluyó un marcador de peso molecular para corroborar el peso del inserto y del plásmido, así como una muestra de ADN plasmídico sin enzimas de restricción (control). Después, mediante secuenciación automatizada, se realizó y se verificó la construcción molecular pTARGET-SRY.

Cultivo celular y transfección

Las células HEK293 (Human Embryonic Kidney 293® ATCC 1573) se cultivaron en medio modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1.5% de antibióticos en un incubador a 37°C y 5% de CO₂. Con 1 µg del constructo pTARGET-SRY se hizo la transfección en el modelo celular, con 100 µL DMEM y 4 µL de lipofectamina TM2000®. En el grupo de control se repitió el proceso sin la adición de construcción molecular, y otro con el vector vacío (pTARGET). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Aislamiento de ARN total y análisis de transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de *Wnt4*

Se realizaron las extracciones del ARN de las células HEK293 transfectadas con el reactivo Trizol (Invitro-

gen) 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas después del proceso. Se obtuvo el ADN complementario (DNAC) de *Wnt4* utilizando el estuche Superscript™ III First Strand Synthesis System con 3 g del ARN total y siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADNc generado se usó como molde para la amplificación por PCR de *Wnt4*. Los oligonucleótidos utilizados fueron: sentido 5'-GTC AGGATGCTCTGACAACA-3' y antisentido 5'-TCTTTACCTAGGCACAGCCT-3'. Como control endógeno se amplificó el ARN del gen *Gapdh* con los siguientes oligonucleótidos: sentido 5'-ATCCCACCATCATCTTCCAG-3' y antisentido 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización de 94°C durante cinco minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación a 94°C por 30 segundos, 57.5°C por 30 segundos y 72°C durante 30 segundos también, y una extensión final a 72°C por cinco minutos. Posterior a la amplificación con RT-PCR, los productos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%.

Sobre las bandas obtenidas para *Wnt4* y *Gapdh* en los geles de agarosa al 1% se hizo un análisis utilizando el paquete ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/features.html>). Con los valores resultantes se alcanzó una proporción para realizar una gráfica de la expresión de *Wnt4*. De la misma manera, se analizaron las bandas en el gel de agarosa al 1% correspondientes a SRY con el objetivo de verificar la presencia en las células transfectadas.

Western blot

Se llevó a cabo el ensayo de transcripción-traducción con el estuche comercial TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) y proteínas de las células HEK293 transfectadas con pTARGET-SRY NEPER® Thermo Scientific. Se prepararon alícuotas con 1 µg de proteínas nucleares mezcladas con 3 µL de un *buffer* (1.5 M Tris-HCl [pH 6.8], 8% SDS, 0.05% β-mercaptoetanol, 8% glicerol, 0.05% azul de bromofenol), después se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%. Se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie. El gel obtenido fue electrotransferido a una membrana PVDF (Amersham Pharmacia Biotech), la cual se incubó a 37°C durante tres horas; se bloqueó la membrana con PBS al 10% y se llevó a cabo la hibridación a 4°C durante 12 horas con

el anticuerpo primario SRY (Abcam®), con un factor de dilución de 1:1,000. Las membranas se lavaron durante 10 minutos con PBS-T (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ pH 7.0 y 1% Tween 20), se incubaron a 37°C por 1.5 horas con el anticuerpo secundario, con un factor de dilución de 1:15,000. Las membranas se lavaron en tres ocasiones con PBS-T y la inmunotransferencia se hizo con el sistema de detección de quimioluminiscencia análisis de Western blot ECL (Amersham Biosciences Buckinghamshire, Inglaterra, Reino Unido).

RESULTADOS

Se construyó SRY-pTARGET mediante la amplificación del gen *Sry* a partir de ADN genómico de un control masculino, utilizando oligonucleótidos derivados de la secuencia de dicho gen y flanqueados con secuencias consenso de enzimas de restricción específicos del vector de expresión (XhoI y NotI). En la Figura 1A se observa que el producto obtenido por amplificación por la técnica de PCR corresponde al tamaño esperado del gen *Sry* (570 pb). Posteriormente, se corroboró que la secuencia del marco de lectura del gen *Sry* conseguida mostraba 100% de homología con la descrita en el banco de genes (ID 6736). Figura 1B

Se estandarizaron las condiciones para el crecimiento y caracterización del cultivo celular de las células HEK293. Después de la clonación del factor de transcripción SRY y de la estandarización y caracterización del cultivo celular HEK293, se realizó la transfección con la construcción molecular pTARGET-SRY. Para ello, se extrajo el ARN para evaluar los valores del mensajero del mismo (ARNm) a diferentes tiempos (1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas). Todos los experimentos se hicieron con los controles correspondientes (*Gapdh* y *Sry*). No se observó diferencia en la expresión entre los controles y las células transfectadas en ninguno de los tiempos probados (Figura 2A, B y C).

Se verificó la presencia de la proteína SRY con la técnica de Western blot (Figura 3) utilizando los extractos nucleares y citoplasmáticos de células HEK293 no transfectadas (carril 1) y transfectadas (carril 2); asimismo, se usó la proteína SRY obtenida por ensayo de transcripción-traducción *in vitro* como control positivo

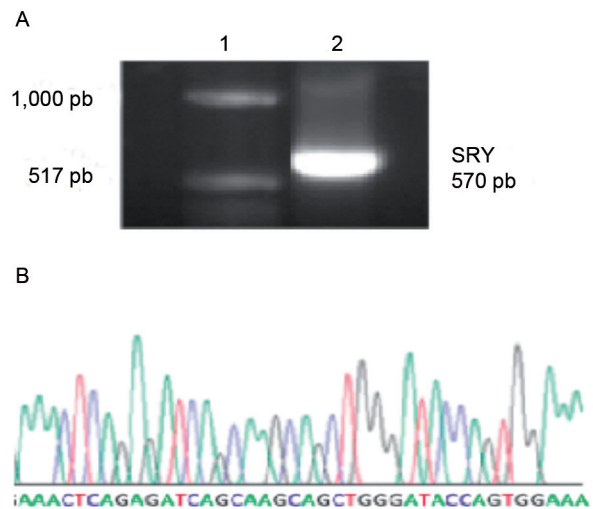


Figura 1. A. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del producto de PCR correspondiente a *Sry*, usando como templado el ADN plasmídico. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 1,000 pb. El carril 2 corresponde a SRY (570 pb). **B.** Electroferograma parcial de una región correspondiente a la secuenciación de *Sry*.

(SRY TnT, carril 3). La diferencia de intensidad entre la banda de SRY TnT y la banda SRY transfectada se debe a que en el caso de la primera, sólo hay proteína SRY, mientras en la segunda hay extractos nucleares totales, de los cuales sólo una parte es SRY.

DISCUSIÓN

El desarrollo de la gónada durante la embriogénesis es un evento único debido a la presencia de un precursor común, la gónada bipotencial. El sexo es determinado al momento de la fertilización por la presencia o ausencia del cromosoma Y, específicamente por el gen *Sry* localizado en el cromosoma Y, el cual inicia la cascada de episodios para el desarrollo testicular.^{1,4}

Se han mencionado diversos genes implicados en la diferenciación gonadal masculina, uno de ellos es el *Wnt4/WNT4*.^{17,19,20} El gen *Wnt4* originalmente se estudió durante la nefrogénesis en el riñón metanéfrico en un modelo murino nulo.²⁴ El análisis en modelo murino muestra que la eliminación de este gen conduce a la masculinización de embriones XX.¹⁷ La descripción inicial del ratón nulo para el *Wnt4* logró promover las

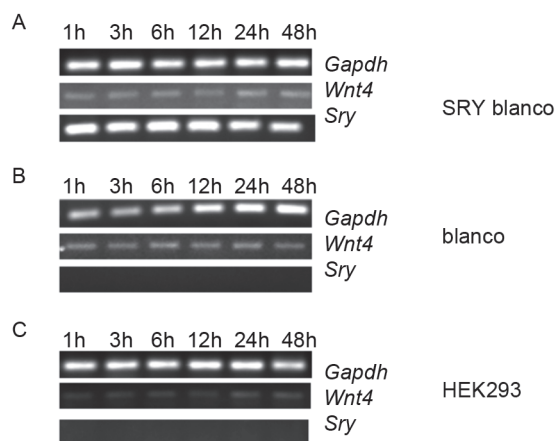


Figura 2. Expresión de *Wnt4*, *Gapdh* y *Sry* en células HEK293. Las bandas de color blanco representan la extracción del ARN en los tiempos correspondientes a 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas, así como la extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas a las 48 horas. En el panel A se muestran los resultados del vector con el inserto del cual se obtuvo el ARN para amplificar *Wnt4* y valorar su expresión; no se observan diferencias. En el panel B se presentan los controles positivos únicamente utilizando el vector sin el inserto. En el panel C se observa la expresión basal de *Wnt4* a partir de células HEK293. En todos los casos se utilizaron como controles GAPDH y SRY.

investigaciones referentes a la función de dicho gen en la formación de conductos Wolffianos, migración de células endoteliales, esteroidogénesis, desarrollo de ovocitos y diferenciación testicular.²⁵ Debido a que *Wnt4* se expresa en las primeras etapas del desarrollo gonadal del humano y a las implicaciones éticas de estudiar gónadas embrionarias, en la actualidad existen pocas investigaciones sobre el tema.

Con base en los antecedentes observados en los estudios en los que *Wnt4*/WNT4 interviene en la diferenciación gonadal, así como en su regulación espacio-tiempo específica, en la existencia de una secuencia consenso en la región promotora de este gen que pudiera ser reconocida por la proteína SRY y en que hasta el momento no se ha analizado la regulación de dicho gen, se llevaron a cabo los estudios de expresión del ARNm de *Wnt4* mediante transfección con el factor de transcripción SRY; sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión del ARNm de *Wnt4* durante el periodo analizado.

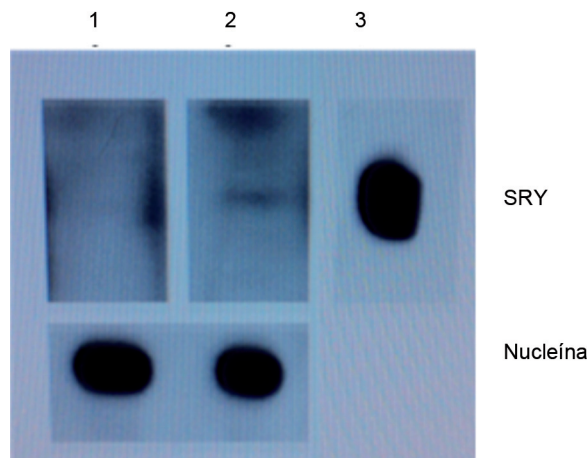


Figura 3. Western blot de SRY a partir de extractos proteicos de células HEK293. En el carril 1 se observa el SRY en extractos proteicos de células HEK293 no transfectadas. En el carril 2 se observa el SRY en extractos proteicos de células HEK293 transfectadas. En el carril 3 se presenta la proteína SRY obtenida por ensayo de transcripción-traducción *in vitro* como control positivo (SRY TnT). En la parte inferior del primer y segundo carril se muestran los resultados del control GAPDH.

Una explicación posible para estos resultados es que la proteína SRY no regula directamente al gen *Wnt4*, sino a otros genes que participan “cascada arriba” con él, como es *Sox9*/SOX9, el cual es un factor de transcripción implicado en la diferenciación testicular.^{25,26}

Otra explicación plausible es que el gen *Wnt4* no necesita una regulación directa de SRY para la diferenciación gonadal y puede ser blanco de otros genes que codifican para proteínas implicados en el desarrollo gonadal, como es R-spondin1 (*Rspo1*).

Chassot y colaboradores²⁵ llevaron a cabo estudios *in vivo* en ratones, en los que observaron que los fetos XY doble nulos para los genes *Wnt4*^{-/-} y *Rspo1*^{-/-} mostraban hipoplasia testicular como resultado de una reducción importante de los túbulos seminíferos, así como una reducción significativa de las cifras de SRY. Asimismo, la proliferación celular en la región celómica se modificó significativamente en los ratones XX y con mayor severidad en los ratones XY mutantes dobles nulos para los genes *Rspo1* y *Wnt4*, en comparación con los controles

de las gónadas. Los autores, por tanto, sugieren que sus resultados apoyan un papel sinérgico de *Rspo1* y *Wnt4* en la proliferación de células en la gónada bipotencial y que, en consecuencia, esta vía regula la proliferación de las células de Sertoli y, a su vez, el desarrollo testicular.

Aunque los mecanismos moleculares exactos que subyacen en este antagonismo en las gónadas aún no se han dilucidado, los experimentos *in vitro* sugieren que SRY puede reprimir la señalización de la proteína asociada con caderina (catenina),²⁷⁻²⁹ e *in vivo*, la señalización del factor 9 de crecimiento de fibroblastos (FGF9) reprime la expresión de *Wnt4* hacia el camino de la feminización, permitiendo así la expresión de *Sox9*;³⁰ de tal forma que en las gónadas de ratones XY, la señal de *Rspo1/Wnt4* es regulada a la baja cuando se produce la expresión de *Sry/Sox9* y las células de Sertoli se diferencian.

En conclusión, ésta es la primera vez que se realizan estudios de regulación acerca del gen *Wnt4* en el contexto de la diferenciación gonadal. De acuerdo con estos resultados, es posible suponer que la proteína SRY no regula directamente al gen *Wnt4* o que *Wnt4* puede ser blanco de otras proteínas como R-spondin1 (*Rspo1*).

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada a Jesús Benítez Granados durante la realización de su maestría en ciencias biológicas (biología experimental) en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

REFERENCIAS

- Swain A, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev* 1999;13:755-767.
- Quinn A, Koopman P. The molecular genetics of sex determination and sex reversal in mammals. *Semin Reprod Med* 2012;30:351-363.
- McClelland K, Bowles J, Koopman P. Male sex determination: insights into molecular mechanisms. *Asian J Androl* 2012;14:164-171.
- Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, et al. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990;346:240-244.
- López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, et al. SRY alone can induce normal male sexual differentiation. *Am J Med Genet* 1995;55:356-358.
- Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 1990;348:450-452.
- 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.
- Sánchez-Moreno I, Coral-Vázquez RM, Méndez JP, Canto P. Full-length SRY protein is essential for DNA binding. *Mol Hum Reprod* 2008;14:325-330.
- Sánchez-Moreno I, Canto P, Munguía P, Bermúdez de León M, Vilchis F, et al. DNA binding activity studies and computational approach of mutant SRY in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2009;299:212-218.
- Zhao L, Koopman P. SRY protein function in sex determination: thinking outside the box. *Chromosome Res* 2012;20:153-162.
- Veitia RA, Sálas-Cortés L, Ottolenghi Ch, Pailhoux E, et al. Testis determination in mammals: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol* 2001;179:3-16.
- Canto P, Soderlund D, Reyes E, Mendez JP. Mutations in the Desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4480-4483.
- Knower KC, Kelly S, Ludbrook LM, Bagheri-Fam S, et al. Failure of SOX9 regulation in 46,XY disorders of sex development with SRY, SOX9 and SF1 mutations. *PLoS One* 2011;6:e17751.
- Coveney D, Ross AJ, Slone JD, Capel B. A microarray analysis of the XX *Wnt4* mutant gonad targeted at the identification of genes involved in testis vascular differentiation. *Gene Expression Patterns* 2007;7:82-92.
- Vilain E. Anomalies of human sexual development: clinical aspects and genetic analysis. *Novartis Found Symp* 2002;244:43-53.
- Cadigan K, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286-3305.
- Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon A. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999;397:405-409.
- Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, et al. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development* 2003;130:3663-3670.
- Jordan BJ, Shen JH-C, Olaso R, Ingraham HA, Vilain E. *Wnt4* overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/b-catenin synergy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:10866-10871.
- Jeays-Ward K, Dandonneau M, Swain A. *Wnt-4* is required for proper male as well as female sexual development. *Dev Biol* 2004;276:431-440.
- Jordan B, Mohammed M, Ching S, Délot E, et al. Up-regulation of Wnt-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 2001;68:1102-1109.
- Sim E, Smith A, Szilagi E, Rae F, et al. *Wnt-4* regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, *WT1*. *Oncogene* 2002;21:2948-2960.

23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998;16:1215.
24. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 1994;372:679-683.
25. Chassot AA, Bradford ST, Auguste A, Gregoire EP, et al. WNT4 and RSPO1 together are required for cell proliferation in the early mouse gonad. *Development* 2012;139:4461-4472.
26. Mertin S, McDowall SG, Harley VR. The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1359-1364.
27. Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, et al. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet* 2008;17:2949-2955.
28. Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, et al. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006;38:1304-1309.
29. Bernard P, Sim H, Knowler K, Vilain E, Harley V. Human SRY inhibits beta-catenin-mediated transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:2889-2900.
30. Jameson SA, Lin YT, Capel B. Testis development requires the repression of Wnt4 by Fgf signaling. *Dev Biol* 2012;370:24-32.