



## **Nuovo approccio alle basi genetiche dello sviluppo puberale in pazienti con sindrome di Turner**

Valeria Paganelli, Alice Brambilla, Gloria Cantamessa, Chiara Gertosio,  
Anna Chiara Malvezzi, Daniela Olini, Benedetta Pietra, Maria Beatrice Ruozi,  
Rossana Toggia, Caterina Toma

*Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

---

### ***Nuovo approccio alle basi genetiche dello sviluppo puberale in pazienti con sindrome di Turner***

La sindrome di Turner (ST) è causata da difetti numerici o strutturali del cromosoma X. La bassa statura e i difetti ovarici sono presenti in quasi tutti i casi e l'infertilità è uno dei problemi principali per le donne con ST, anche se talvolta sono stati osservati casi di pubertà spontanea, principalmente in mosaici. Non ci sono ancora evidenze genetiche della probabilità di avere uno sviluppo puberale spontaneo in pazienti Turner e in questo studio presentiamo i nostri risultati sulle indagini genetiche (Copy Number Assay) e di citogenetica-molecolare (array-CGH e i-FISH) eseguite in una coorte di 40 pazienti ST con e senza menarca spontaneo, allo scopo di ottenere nuove informazioni sulle basi genetiche dell'inizio della pubertà. Abbiamo identificato alcune CNVs con un noto o possibile ruolo nella fertilità femminile e una duplicazione completa a carico del locus BMP15 in una donna 45,X con sviluppo puberale spontaneo. Attraverso diversi metodi molecolari e di citogenetica molecolare abbiamo potuto confermare che tutte le nostre pazienti Turner sono in effetti mosaici. Nonostante un mosaicismo <10% per la linea cellulare euploide, se accertato con tecniche citogenetiche di nuova generazione, possa escludere uno sviluppo puberale spontaneo, l'associazione con markers biochimici di riserva ovarica potrebbe verosimilmente aumentare il suo valore predittivo sulla potenziale fertilità futura di pazienti con ST già durante l'infanzia. L'identificazione della duplicazione di BMP15 in una paziente 45,X andata incontro a menarca spontaneo, ha confermato l'importanza che il dosaggio di tale gene ha nel fenotipo ovarico delle pazienti Turner.

### ***New approach to genetic bases of pubertal development in Turner syndrome patients***

Turner syndrome is caused by X chromosome numerical or structural defects. Short stature and ovarian defects affect almost all patients so that infertility is one of the main problems for women with Turner Syndrome (TS). However spontaneous puberty can be observed in TS, especially in mosaics. The evidence gained so far about the probability that patients with TS have to go through spontaneous pubertal development are limited and in this study we present the results of genetic (Copy Number Assay) and molecular-cytogenetic (array-CGH e i-FISH) investigations performed in a cohort of TS patients who developed or not spontaneous menarche. These analysis were performed in order to reach new understandings of the genetic bases of puberty onset. These analysis enabled us to identify both few CNVs with a known or possible role in female fertility and a complete duplication involving the BMP15 locus in a 45X patient who had spontaneous pubertal development.

Molecular and molecular-cytogenetic approaches confirmed that almost all TS patients are mosaics. Nevertheless a mosaicism <10% for the euploid cell line, if determined by new generation cytogenetic techniques, can exclude spontaneous menarche; this determination together with biochemical markers of ovarian reserve could increase its predictive values on the future ovarian function of TS patients starting from their infancy. The detection of BMP15 duplication in a 45,X patient with spontaneous pubertal development suggests that this gene dosage has a prominent role in the determination of ovarian phenotype in TS.

---

## Introduzione

La sindrome di Turner (ST) rappresenta una delle più frequenti anomalie cromosomiche: ha infatti una prevalenza di circa 1:2,500-1:3,000 neonate vive femmine [1]. L'espressione fenotipica associata alla sindrome è estremamente variabile sia in termini morfologici che funzionali, dal momento che è in gran parte legata alle anomalie del cariotipo ascrivibili a questa condizione patologica, che vanno dalla monosomia 45,X (50% dei casi) a varie forme di mosaicismo 45,X/46,XX con o senza difetti strutturali del cromosoma X nella linea cellulare euploide [1-2]. Tra le manifestazioni cliniche della ST, l'ipostaturalità e i difetti ovarici sono in assoluto le più frequenti, essendo presenti in quasi tutti i casi. La disfunzione ovarica nelle donne con ST è dovuta a una rapida perdita di oociti negli stadi iniziali della profase meiotica dopo la 18<sup>ma</sup> settimana di vita fetale, con conseguente disgenesia ovarica e streak ovaries e parziale o completa assenza di caratteri sessuali secondari. Perciò l'infertilità è uno dei principali problemi per le donne Turner [3]. Ciononostante si verifica pubertà spontanea nel 15-20% delle pazienti 45,X e nel 32% dei mosaici, in modo inversamente proporzionale alla severità del cariotipo [4].

## Scopo del lavoro

Sono state proposte molte ipotesi per spiegare le manifestazioni fenotipiche della ST: l'aploinsufficienza di geni X-linked che sfuggono all'inattivazione del cromosoma X (come il gene SHOX per la bassa statura), o errori di appaiamento dei cromosomi durante la meiosi [5]. Inoltre la scoperta di delezioni su Xp sottolinea il coinvolgimento della parte prossimale di Xp nella funzione ovarica ed è stato identificato un locus, ossia Xp22.1-p11.2, all'interno del quale mappano molti dei tratti ST, inclusa l'insufficienza ovarica [6]. All'interno di questo locus si trova BMP15 (MIM\*300247)(Xp11.2) che codifica per un fattore di crescita derivato dall'oocita e appartenente alla superfamiglia di TGF- $\beta$ , coinvolto nello sviluppo follicolare come un regolatore cruciale di molti processi delle cellule della granulosa e della velocità di ovulazione [7]. Evidenze del ruolo fondamentale di questo fattore nello sviluppo follicolare sono derivate da modelli animali (roditori e pecore) e umani [8]. Numerosi screening mutazionali eseguiti in tutto il mondo in differenti coorti di pazienti affette da Premature Ovarian Insufficiency (POI) con cariotipo 46,XX hanno mostrato una significativa associazione con mutazioni loss-of-function nel gene BMP15. Le prime analisi molecolari e funzionali di alcune delle mutazioni riportate di BMP15 hanno indicato la presenza di ostacoli nel processing e difetti di secrezione coerenti con un meccanismo di aploinsufficienza [9]. Inoltre stanno aumentando le evidenze che indicano BMP15 come il principale determinante ovarico sul cromosoma X, la cui aploinsufficienza potrebbe contribuire al fenotipo ovarico della sindrome di Turner.

In questo studio presentiamo le indagini genetiche e di citogenetica molecolare eseguite in una coorte di pazienti con ST con o senza menarca spontaneo, inclusi il caso di una paziente 45,X che ha avuto uno sviluppo puberale spontaneo completo e presenta riarrangiamenti citogenetici che coinvolgono il locus BMP15.

## **Materiali e metodi**

### ***Pazienti***

Le pazienti arruolate nello studio sono seguite presso l'ambulatorio di endocrinologia pediatrica dalla Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, del Dipartimento dell'Università di Pavia.

I criteri d'inclusione comprendevano diagnosi clinica di sindrome di Turner e condizione 45,X o mosaicism (45,X/46,XX) su un cariotipo standard.

Sono state incluse 40 pazienti con ST (età: media  $\pm$  deviazione standard: 25.68 $\pm$ 11.36 anni; mediana: 12-46 anni), 6 delle quali sono andate incontro a menarca spontaneo (MS); queste ultime presentavano valori di FSH e di LH entro il range di normalità al momento del menarca. Tutte le altre pazienti avevano livelli ormonali nel range della menopausa (FSH > 30 U/L) e sono state classificate come amenorrea primaria (AP).

L'età media delle pazienti con menarca spontaneo al momento dello studio era 18.83 $\pm$ 6.74 anni (mediana 16.50; range 15-32 anni). Il menarca spontaneo si è verificato a 11.91-14.37 anni (media  $\pm$  deviazione standard: 13.12 $\pm$ 0.98 anni; mediana: 13 anni). Solo una paziente con MS (MS1) è andata incontro ad amenorrea secondaria a 18.6 anni ed è stata sottoposta a terapia ormonale sostitutiva (TOS) da allora. L'unica altra caratteristica della sindrome di Turner mostrata da questa paziente (MS1) era la bassa statura.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico Istituzionale e tutti i partecipanti hanno concesso il loro consenso informato per iscritto. Le indagini genetiche sono state eseguite dal Dipartimento di Biologia e Genetica per le Scienze Mediche dell'Università degli Studi di Milano, con il coordinamento del laboratorio di Ricerca di Endocrinologia e Metabolismo e della Divisione delle Patologie Endocrine e Metaboliche dell'IRCSS Istituto Auxologico Italiano di Milano.

### ***Array CGH***

Per l'analisi di array CGH il DNA genomico è stato estratto da sangue intero dei probandi usando Dneasy Blood and Tissue Kit (Sigma-Aldrich, USA) secondo le istruzioni della ditta produttrice.

È stato usato come riferimento un pool di DNA da sangue periferico di 10 donatori sani (Promega, UK), di sesso non combaciante con i campioni. Lo scan genomico è stato eseguito usando lo Human Genome CGH Microarray Kit 244K (Agilent Technologies, USA) che è costituito da circa 236,000 sonde di oligonucleotidi 60mer che coprono l'intero genoma con una risoluzione spaziale media di circa 30 kb. Sono stati processati, seguendo il protocollo della ditta produttrice, 3  $\mu$ g di DNA estratti dal test e dal campione normale di riferimento. L'emissione del pigmento è stata rilevata per mezzo di uno scanner dual-laser. Le immagini sono state ricavate usando il software Agilent Feature Extraction 9.1, e analizzate usando il software DNA Analytics 4.0.

È stato assegnato un log ratio plot tra il DNA genomico del test e quello di riferimento in modo che le aberrazioni del numero di copie di DNA del test in un locus particolare fossero rilevabili come deviazioni dal valore modale di 0. Le aberrazioni sono state identificate con l'algoritmo ADM-2.

La condizione di mosaicism per il cromosoma X è stata accertata con valutazione qualitativa, attraverso una scala artificiale per il mosaicism, ossia il right shift orizzontale sul profilo del log ratio rispetto al valore atteso di 0. Considerando il Ratio (R): numero di copie del cromosoma X del DNA del test/ numero di copie del cromosoma X del DNA di riferimento =1, si osserva uno shift verso destra pari a +1 (R=2) in caso di mosaicism, o pari a +1.58 (R=3) in caso di isocromosoma Xq, che implica

la presenza di tre copie della stessa regione cromosomica anziché solo di due. La artificial mosaic scale è stata creata e ibridizzata all'array come è stato precedentemente descritto. Il che è stato fatto miscelando campioni di sangue di un maschio adulto diploide normale e quello di una donna adulta diploide normale. In questo modo è stato possibile creare artificialmente dei mosaicismi in cui la linea cellulare 46,XX rappresentava il 70, il 50, il 30 e il 10 % del totale; essi sono stati usati in aCGH e gli shifts del profilo del log ratio così ottenuti sono stati confrontati qualitativamente con i nostri risultati aCGH di tutte le pazienti ST, sovrapponendo ogni profilo array di cromosomi X delle pazienti ST con l'artificial scale, stimando così il livello di mosaicismo della paziente. Pertanto il limite che questa tecnica ha nel rilevare il mosaicismo è pari al 10%.

### ***Analisi FISH***

In accordo con l'UCSC Genome Browser [10] sono stati selezionati i cloni RPCI-11 BAC CTD-2004N6, che ricoprono l'intero gene BMP15 all'Xp11.22, e CTD-3172H4, situato all'Xp11.2-q12; essi sono stati forniti da Invitrogen Ltd, UK. Le sonde sono state marcate con Cy3 (Amersham, UK) e la loro posizione fisica è stata verificata sulle metafasi di alcuni controlli donne, estratte da linfociti di sangue periferico. Sono state eseguite analisi di FISH dual color su 300 nuclei e metafasi, estratti da linfociti di sangue periferico stimolati con PHA e coltivati per 72 ore, usando una delle sonde BAC in associazione con la sonda centromerica specifica commercialmente disponibile CEP 6 (locus D6Z1) (Vysis, Chicago, IL, USA) la cui ibridazione combinata ha permesso di distinguere le cellule in G1 da quelle in G2. Sono stati seguiti i protocolli FISH di Lichter et al. e Lichter e Cremer, con modifiche di scarsa rilevanza.

Per l'analisi FISH su cellule della mucosa buccale è stato chiesto alle pazienti di risciacquarsi la bocca due volte con dell'acqua. Le cellule di superficie sono state raschiate dalla mucosa buccale di entrambe le guance di ogni individuo usando un cytobrush; sono state poi rimosse da quest'ultimo agitandolo in etanolo al 70% a temperatura del ghiaccio. Dopo il trasporto in laboratorio, la sospensione di cellule è stata centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti e il supernatante è stato scartato. Il pellet è stato risospeso in etanolo fresco al 70% e filtrato. I preparati sono stati fissati in un fissativo (1.1 metanolo : acido acetico) per 10 minuti, quindi asciugati all'aria. Sono poi stati controllati con un microscopio a contrasto di fase per verificare la presenza di cellule di morfologia adeguata. Un'analisi di FISH Multi color è stata eseguita su 300 cellule usando CEPX, CEPY, CEP18- Aneuvysion kit (Abbott-Vysis, IL, USA) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. È stato seguito il protocollo FISH di Reddy e Mak, con modifiche di minore importanza.

### ***Quantitative Real-Time PCR***

I DNA genomici (gDNAs) sono stati estratti da sangue intero di 12 pazienti TS della coorte (6 MS e 6 AP), di una donna normale 46,XX e da un uomo normale 46,XY, come precedentemente descritto per l'analisi di array CGH. Il gDNA è stato estratto anche dall'epitelio buccale o vaginale dei casi MS1, MS2, MS3 e AP4 usando Oragene DNA Self-Collection Kit (DNA Genotek, Canada). I gDNA sono quindi stati usati come target template per il TaqMan Copy Number Assay (Applied Biosystem, USA), secondo le istruzioni della ditta produttrice. Nelle reazioni di quantificazione del numero di copie sono stati fatti reagire 20 ng di gDNA con:

- TaqMan Copy Number mix, contenente due primers specifici e una sonda MGB etichettata con marcatore colorato FAM per identificare la sequenza target del gDNA;
- TaqMan Copy Number Reference mix, contenente due primers e una sonda TAMRA etichettata con marcatore colorato VIC per identificare la sequenza target del gDNA;
- la Platinum qPCR SuperMix-UDG con ROX, contenente la DNA polimerasi Platinum Taq (Invitrogen, USA).

I mix dei target TaqMan Copy Number sono stati scelti per rintracciare:

- l'esone 1 (Hs01299108\_cn) e l'esone 2 (HS00957878\_cn) del gene BMP15;
- l'esone 10 (Hs05613398\_cn) del gene SMARCA1(MIM\*300012, situato su Xq26.1).

La sonda Rnasi P avente come bersaglio la componente H1 del gene per la Ribonucleasi P RNA (RPPH1, MIM\*608513) sul cromosoma 14, banda 14q11.2, è stata scelta come sonda di riferimento.

Le reazioni sono state eseguite su uno strumento 7900HT Real-Time PCR (Applied Biosystem, USA), SDS Software v2.3, che segue il metodo Absolute Quantitation. Sono state analizzate quattro repliche per ogni campione in modo da ottenere un affidabile copy number calls. Dopo l'amplificazione i files di dati contenenti i valori di repliche CT del campione per ogni colore sono stati esportati dal software dello strumento Real-Time PCR e sono stati importati in un software di analisi CopyCaller (Applied Biosystem, USA) per calcolare il valore del numero di copie mediante quantificazione relativa, usando il metodo comparativo CT ( $\Delta\Delta CT$ ). Tale metodo ha misurato la differenza di CT ( $\Delta CT$ ) tra il target e le sequenze di riferimento, dopodiché ha confrontato i valori  $\Delta CT$  di ogni campione con i  $\Delta CT$  del campione calibratore (la donna normale 46,XX), noti per avere due copie della sequenza target.

### ***Sequenziamento automatico***

L'intera sequenza codificante e le giunzioni introni-esoni del gene BMP15 (GenBank numbers AF082349.1 e AF082350.1) sono state analizzate o con cromatografia liquida denaturante ad alta performance (DHPLC) dei frammenti amplificati con PCR sul WAVE apparatus automatic instrument (Transgenomic, NE) o con sequenziamento automatico sul 3100 Avant Genetic Analyzer [11].

### ***Analisi statistica***

Il test della probabilità esatta di Fisher è stato usato per determinare se la prevalenza del cariotipo a mosaico fosse significativamente differente tra i gruppi di pazienti con MS o con AP. Sono stati considerati significativi valori di p minori o uguali al 5.

## **Risultati**

Sulla base dei risultati della citogenetica convenzionale, la frequenza dei mosaicismi nella nostra coorte era significativamente maggiore nel gruppo di pazienti con pubertà spontanea rispetto alle pazienti con amenorrea primaria ( $P < 0.01$ ), a conferma dei dati della letteratura [4].

Mediante l'esecuzione di analisi di array CGH ad alta risoluzione su 40 pazienti Turner è stato possibile identificare alcune Copy Number Variations (CNVs) in eterozigosi a carico di geni che si ritiene possano avere un ruolo nell'ambito della fertilità femminile. Tra queste sono incluse sia CNVs rare sia altre CNVs già descritte precedentemente in individui fenotipicamente normali, secondo il Database delle Varianti Genomiche (DGV) [12]. I due microarrangiamenti rari comprendono una duplicazione a livello di Xp11.22 che si estende per almeno 554 kb (chrX50417389-50971882, marzo 2006) e contiene interamente solo il gene BMP15, presente in MS1, e una delezione di almeno 216 kb al 9q33.1 (chr9:118011564-118227359, hg18) che interrompe la regione codificante del gene PAPP-A, presente in AP5. Le altre 14 CNVs precedentemente riportate nel DGV, 3 delle quali identificate nel gruppo delle MS e 11 nel gruppo delle AP, coinvolgono loci autosomici che sono possibili candidati per il controllo della funzione ovarica, (nello specifico il gene GPR128 al 3q12.2 (due amplificazioni), il gene NAIP al 5q13.2 (una delezione e due duplicazioni), il gene DUSP22 al 6p25.3 (tre delezioni e una amplificazione), il gene MSR1 all'8p22 (una delezione), i geni APOBEC3A/3B al 22q13.1 (tre delezioni)).

Per studiare la correlazione esistente tra il numero di copie del gene BMP15 e lo sviluppo puberale nelle pazienti ST, abbiamo deciso di concentrare la nostra attenzione su un sottogruppo di 12 pazienti, sei delle quali con menarca spontaneo (MS1-6) e sei con amenorrea primaria (AP1-6), queste ultime usate come controlli negativi. Tutte e 12 le pazienti sono state sottoposte a screening per la ricerca di mutazioni del gene BMP15 : in tutti i casi esso aveva sequenza wild-type. Sette di loro erano state identificate da analisi citogenetiche eseguite in precedenza come mosaici ST secondo la cariotipizzazione convenzionale e la condizione di mosaico è stata poi confermata dalla valutazione quantitativa mediante analisi di array CGH, mediante la mosaicism artificial scale, lo shift orizzontale a destra del profilo log ratio. Uno stato di mosaico è stato inoltre identificato con questo metodo in MS1 e MS2, entrambe precedentemente ritenute essere 45,X. In particolare in MS1 lo shift del profilo log ratio del cromosoma X è limitato alla regione tra le bande cromosomiche Xp22.1 e Xq26.2. Abbiamo inoltre verificato che tutte le pazienti MS mostrassero uno shift apprezzabile del profilo log ratio del cromosoma X, che invece è presente solo in 3 delle 34 pazienti PA.

Il tasso di mosaicismo è stato valutato con analisi dual-color iFISH, basata sulla presenza di uno o due segnali BMP15. Una condizione di mosaicismo è stata riscontrata in colture stimolate con PHA in tutte le pazienti MS e AP, anche se a un grado molto basso (<1%) in quelle con AP e cariotipo 45,X. Lo stesso approccio è stato applicato anche alla mucosa buccale di tre pazienti, in particolare in MS2, MS3 e AP4, usando sonde commerciali specifiche per  $\alpha$ -sat DNA centromerico del cromosoma X. Il tasso di mosaicismo trovato nel sangue periferico è stato confermato nelle cellule della mucosa buccale di MS2, mentre in MS3 e AP4 la linea euploide era in quantità circa doppia rispetto a quella monosomica. Inoltre eseguendo l'analisi FISH siamo stati in grado di chiarire le caratteristiche strutturali della duplicazione di BMP15 di MS1, dato che abbiamo osservato un segnale doppio in tutte le cellule analizzate; il che sottolinea la presenza di una tandem duplication. Un altro segnale minore è stato identificato in alcuni nuclei e in alcune metafasi (9%), riferibile alla presenza di una linea cellulare euploide, precedentemente sospettata con analisi di array CGH, che era caratterizzata da un cromosoma X ad anello in aggiunta a quello normale.

Il numero di copie di BMP15 è stato anche valutato con Real-Time PCR quantitativa su sangue periferico, che ha mostrato una sensibilità nel cut-off della rilevazione del mosaicismo attorno al 30%. Quattro delle sei pazienti con MS avevano due copie di BMP15, compresa MS1, ma sono state identificate due copie dei geni GYG2 e SMARCA1 solo in tre delle pazienti con livello di mosaicismo pari o superiore al 30%. Al contrario, MS1, MS2 e MS3, hanno mostrato il livello minimo di mosaicismo (<10%) e avevano solo una copia di GYG2 e SMARCA1.

Tutte e sei le pazienti con AP mostravano una sola copia di ciascuno dei tre geni analizzati, fatta eccezione per AP5 e AP6 che presentavano più di due copie di SMARCA1 a causa della duplicazione del braccio lungo del cromosoma X.

## Discussione

In questo lavoro abbiamo analizzato con diversi metodi molecolari una serie di 40 pazienti TS, sei delle quali con sviluppo puberale spontaneo, precedentemente cariotipizzate in modo convenzionale.

I nostri dati confermano la correlazione positiva tra il cariotipo a mosaico della ST e la probabilità di un inizio spontaneo di pubertà, come dimostrato dai nostri risultati su sangue periferico, su colture stimolate con PHA, e su cellule di mucosa buccale non coltivate. Mediante aCGH e analisi FISH, rispettivamente su sangue e su colture stimolate con PHA, abbiamo potuto identificare una linea cellulare euploide in tutte le pazienti con MS, incluse MS1 e MS2 che erano state precedentemente classifi-

cate come 45,X. Tale risultato combacia con i dosaggi ormonali al menarca in queste sei pazienti, che assomigliano a quelli delle pazienti ST precedentemente riportate come 45,X/46,XX [13]. Una linea cellulare euploide supplementare è stata identificata anche in tutte e sei le pazienti AP analizzate, anche se a un grado molto basso in quelle in precedenza riferite come 45,X (AP1, AP2 e AP3), a dimostrazione del fatto che presumibilmente tutte le pazienti Turner sono mosaici [14-15]. Quindi i nostri dati indicano che un mosaicismo inferiore al 10% per la linea cellulare euploide, come misurato da tecniche di citogenetica di nuova generazione su vari tessuti di diverse origini embrionali, può escludere un futuro sviluppo puberale spontaneo. Inoltre tale determinazione può affiancare la misurazione dei markers biochimici nella valutazione predittiva della futura condizione ovarica in una paziente bambina con ST. I casi di MS1 e AP4 sembrano essere due interessanti eccezioni a tale regola. L'array CGH ha identificato in MS1 una duplicazione di circa 554 kb all'Xp11.22 contenente l'intera sequenza del gene BMP15.

Sulla base delle esperienze raccolte dai modelli animali e umani, si ritiene che BMP15 sia il gene sul cromosoma X con ruolo maggiormente determinante per l'ovaio [16]. Infatti sono state descritte diverse anomalie di BMP15 con un effetto biologico noto, coerente con meccanismi di aploinsufficienza di BMP15 che può avere effetti deleteri durante le fasi iniziali delle meiosi [11].

Dato che sembra serva una duplice copia di BMP15 affinché la follicologenesi si svolga correttamente, riteniamo che la duplicazione di BMP15 sul cromosoma X conservato in SM1 possa aver preservato l'adeguato dosaggio genico per lo sviluppo ovarico di questa paziente; ciò ha quindi portato alla conservazione di un certo numero di follicoli funzionanti fino all'età della pubertà e ha compensato la presenza di una linea cellulare con r(X)(p22.1q26.2), ritenuta essere più instabile rispetto a una linea cellulare priva di riarrangiamenti cromosomici per il cromosoma X (ad es. MS2).

La nostra ipotesi sembra essere confermata sia dalla presenza di mosaicismi con anomalie strutturali grossolane del secondo cromosoma X in alcune pazienti con AP, sia dal basso tasso di mosaicismo con linea cellulare euploide nella maggior parte delle pazienti con AP. Infatti MS1, che è andata incontro ad amenorrea secondaria dopo 4 anni di cicli mestruali regolari, è portatrice dell'anomalia strutturale del secondo cromosoma X conservato nella linea euploide, consistente nella monosomia completa delle regioni Xpter-Xp22.1 e Xq26.2-Xqter. Perciò l'aploinsufficienza dei geni potenziali determinanti ovarici situati nelle regioni monosomiche può aver contribuito alla precoce insufficienza ovarica, analogamente a quanto accade per il gene SHOX, situato all'Xp22.3, la cui aploinsufficienza è responsabile dell'ipostaturalità della paziente.

Date queste premesse, nelle altre pazienti con menarca spontaneo è plausibile che un corretto dosaggio di BMP15 e di altri fattori candidati X-linked (come per esempio una quantità sufficiente di linee cellulari euploidi nell'ovaio) siano responsabili di un'appropriata follicologenesi. Inoltre l'ipotesi che vari loci all'Xp siano più rilevanti per il fenotipo ovarico rispetto a quelli all'Xq sembra essere rafforzata dai casi di AP5 e AP6: queste pazienti infatti hanno una copia sola di BMP15, mentre mostrano una trisomia di Xq a causa di un isocromosoma (Xq) nella linea cellulare euploide. Hagen et al. [17] hanno descritto pubertà spontanea in solo 1 delle 7 pazienti ST con cariotipo 45,X/46,X,i(Xq). Inoltre AP5 è portatrice di una delezione parziale in eterozigosi del gene PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein A) che potrebbe svolgere un ulteriore ruolo deleterio sul fenotipo ovarico. Infatti è già noto il coinvolgimento di PAPP-A nel modulare la funzione ovarica tramite il controllo della biodisponibilità dell'ovarian insulin-like growth factor [18] e recentemente è stato dimostrato che l'assenza di questa metalloproteinasi in forma funzionante compromette la steroidogenesi ovarica e la fertilità femminile nel topo [19]. L'approccio genome-wide usato in questo studio non ha rintracciato CNVs X-linked, fatta eccezione per quelle a carico di BMP15, e ciò probabilmente riflette la pressione selettiva che ha selezionato negativamente il cromosoma X contenente anomalie strutturali.

In conclusione nel nostro studio tutte le pazienti con ST sembrano avere mosaici, secondo quanto dimostrato con differenti approcci molecolari e di citogenetica molecolare. Nonostante un mosaicismo <10% per la linea euploide, se accertato con tecniche di citogenetica molecolare di nuova generazione, possa escludere la possibilità di sviluppo puberale spontaneo, l'associazione con markers biochimici della riserva funzionale ovarica può aumentare il suo valore predittivo sulla fertilità futura delle pazienti ST già a partire dall'infanzia. L'identificazione della prima duplicazione di BMP15 in una paziente 45,X con menarca spontaneo suggerisce che il dosaggio del gene BMP15 abbia un ruolo significativo nella determinazione del fenotipo ovarico delle pazienti con ST, portando quindi all'ulteriore evidenza dell'importanza di questo gene Xp-linked nella determinazione della riserva ovarica. Nel corso delle nostre indagini sono state inoltre riscontrate CNVs in geni autosomici correlabili alla funzione ovarica; i dati raccolti dunque possono contribuire all'approfondimento delle attuali conoscenze relative sia ai meccanismi che regolano fisiologicamente la funzione ovarica, sia alla patogenesi dell'insufficienza ovarica primaria, condizione patologica complessa e ancora poco nota.

## Ringraziamenti

Ringraziamo Chiara Castronovo, Daniela Rusconi e Palma Finelli del Dipartimento di Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano; Maria Paola Recalcati del Laboratorio di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare (Centro di Ricerche e Tecnologie Biomediche) dell'IRCSS Istituto Auxologico Italiano di Milano; Raffaella Rossetti del Laboratorio di Ricerca di Endocrinologia e Metabolismo e del Dipartimento di Malattie Endocrine e Metaboliche dell'IRCSS Istituto Auxologico Italiano di Milano; Chiara Cacciatore e Luca Persani del Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano.

---

## Bibliografia

1. Sybert VP, McCauley E. Turner's syndrome. *N Engl J Med* 2004;351:1227-1238.
2. Saenger P. Turner's syndrome. *N Engl J Med* 1996;335:1749-1754.
3. Reynaud K, Cortvrindt R, Verlinde F et al. Number of ovarian follicles in human fetuses with the 45,X karyotype. *Fertil Steril* 2004;81:1112-1119.
4. Pasquino AM, Passeri F, Pucarelli I et al. Spontaneous pubertal development in Turner's syndrome. Italian Study Group for Turner's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1810-1813.
5. Ogata T, Matsuo N. Turner syndrome and female sex chromosome aberrations: deduction of the principal factors involved in the development of clinical features. *Hum Genet* 1995;95:607-629.
6. Zinn AR, Tonk VS, Chen Z et al. Evidence for a Turner syndrome locus or loci at Xp11.2-p22.1. *Am J Hum Genet* 1998;63:1757-1766.
7. McNatty KP, Moore LG, Hudson NL et al. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 2004;128:379-386.
8. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 2004;75:106-111.
9. Wang B, Wen Q, Ni F et al. Analyses of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) mutation in Chinese women with premature ovarian failure. *Clin Endocrinol* 2010;72:135-136.
10. URL:<<http://genome.cse.ucsc.edu>, hg 19, Febbraio 2009>.
11. Rossetti R, Di Pasquale E, Marozzi A et al. BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum Mutat* 2009;30:804-810.
12. URL:<<http://projects.tcag.ca/variation/>>.
13. Fechner PY, Davenport ML, Qualy RL et al. Differences in follicle-stimulating hormone secretion between 45,X monosomy Turner syndrome and 45,X/46,XX mosaicism are evident at an early age. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4896-4902.



14. Held KR, Kerber S, Kaminsky E et al. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? *Hum Genet* 1992;88:288-294.
15. Ranke MB, Saenger P. Turner's syndrome. *Lancet* 2001;358:309-314.
16. Layman LC. Editorial: BMP15-the first true ovarian determinant gene on the X-chromosome? *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1673-1676.
17. Hagen CP, Main KM, Kjaergaard S et al. FSH, LH, inhibin B and estradiol levels in Turner syndrome depend on age and karyotype: longitudinal study of 70 Turner girls with or without spontaneous puberty. *Hum Reprod* 2010;25:3134-3141.
18. Ohnishi J, Ohnishi E, Shibuya H et al. Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochim Biophys Acta* 2005;1751:95-109.
19. Nyegaard M, Overgaard MT, Su YQ et al. Lack of functional pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) compromises mouse ovarian steroidogenesis and female fertility. *Biol Reprod* 2010;82:1129-1138.