



Facoltà di Medicina e Chirurgia

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA DELLO SVILUPPO
SESSUALE

XIX CICLO

Coordinatore: Prof. Gian Paolo Salvioli

**ANALISI GENETICA NELLA SINDROME DI
ULLRICH-TURNER**

Tesi di Dottorato

Dottoranda:

Dr.ssa

Nicoletti Annalisa

Relatore:

Chiar.mo Prof.

Alessandro Cicognani

Correlatore:

Chiar.ma Prof.

Laura Mazzanti

A Ugo e Mary

Indice

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | PREMESSA | 1 |
| 2 | INTRODUZIONE | 2 |
| 2.1 | Inquadramento | 2 |
| 2.2 | Ruolo della genetica | 4 |
| 2.2.1 | Geni/Regioni del cromosoma Y..... | 8 |
| 2.2.2 | LOCUS GONADOBLASTOMA/TSPY..... | 12 |
| 2.2.3 | Markers del cromosoma Y | 16 |
| 2.2.4 | SHOX | 18 |
| 2.2.5 | GHR | 20 |
| 3 | MATERIALI E METODI | 23 |
| 3.1 | Pazienti | 23 |
| 3.2 | Estrazione di DNA genomico..... | 24 |
| 3.3 | PCR | 24 |
| 3.4 | Purificazione e sequenziamento | 26 |
| 3.5 | Metodica per lo screening del polimorfismo: delezione dell'ex 3 del GHR | 26 |
| 3.6 | MLPA..... | 30 |
| 3.7 | Analisi statistica | 34 |
| 4 | RISULTATI..... | 35 |
| 4.1 | Analisi del gene SRY e della regione DYZ3 | 35 |
| 4.2 | MLPA..... | 38 |
| 4.3 | GHR..... | 42 |
| 5 | DISCUSSIONE | 44 |
| 6 | PROSPETTIVE | 52 |
| 7 | BIBLIOGRAFIA | 55 |

1 PREMESSA

Questa tesi ha come argomento l'analisi genetico-molecolare in 162 pazienti con Sindrome di Ullrich-Turner, seguite presso il centro di Endocrinologia Pediatrica del policlinico universitario S.Orsola-Malpighi di Bologna. E' stato condotto uno *screening* tramite PCR del gene SRY e della regione DYZ3, con lo scopo d'individuare la presenza di regioni del cromosoma Y, ed è stato individuato un 5% di casi positivi non evidenziati con l'analisi del cariotipo standard. Nell'ambito di questa casistica sono state selezionate le pazienti che avevano conseguito la statura finale ed erano state sottoposte a terapia con GH; su 13 di queste pazienti, che presentavano anomalie strutturali del braccio corto del cromosoma X (Xp) è stata condotta un'analisi quantitativa, tramite MLPA, del gene SHOX e di marcatori dei cromosomi X e Y, con lo scopo di determinarne il dosaggio; su tutte le altre è stato eseguito lo *screening* della delezione dell'esone 3 del gene GHR, con lo scopo di valutare un' associazione con la statura finale. Il gene SHOX è risultato monosomico in tutti i casi tranne uno; mentre la genotipizzazione dell'esone 3 del GHR ha reso possibile l'elaborazione statistica per due genotipi sui tre possibili in relazione alla statura finale. Dai risultati ottenuti e dagli studi bibliografici, sono emersi importanti suggerimenti per il miglioramento della strategia diagnostica e per l'elaborazione di un piano di ricerca applicata, che siano in grado di offrire le informazioni utili al perfezionamento della diagnosi, del management, e della qualità di vita delle nostre pazienti.

2 INTRODUZIONE

2.1 *Inquadramento*

La Sindrome di Ullrich-Turner (UTS) è tra le più comuni (1 su 2500) anomalie cromosomiche, caratterizzata dalla totale (45,X nel 55%) o parziale assenza di un cromosoma X (46,X,del(X); 46,X,i(Xq); 46,X,r(Xr) più frequentemente). Il fenomeno del mosaicismo, in cui sono presenti più linee cellulari con differente cariotipo, caratterizza all'incirca il 30% dei casi. Solitamente la linea cellulare predominante presenta un cromosoma X anormale, mentre una minore porzione di cellule presenta la perdita dell'intero cromosoma X (es. 46,X,i(Xq)/45,X). In circa il 15%, al contrario, la linea 45,X predomina su una linea normale 46,XX, ed infine nel 5%-10% dei casi è presente un intero o frammenti del cromosoma Y (45,X/46,XY) [1] [2].

Il fenotipo presenta una notevole variabilità, in cui sono quasi sempre presenti linfoedema congenito, bassa statura e disgenesia gonadica. La Tabella 1 riassume le caratteristiche fenotipiche nella UTS con relative percentuali.

| Caratteristiche fenotipiche nella S. Turner | | | | |
|--|--------------|------------|----------------------------------|----------------|
| | | Ref | | Ref |
| Bassa statura | 98% | [2] | Ipertensione | 30% [2] |
| Insufficienza ovarica | 92% | [2] | Intolleranza al glucosio | 45% [2] |
| Sordità neurosensoriale | 55% | [2] | Collo corto e largo | 33% [2] |
| Difetti cardiaci congeniti | 23% | [3] | Anomalie scheletriche | 10% [2] |
| Valvola aortica bicuspidale | 12.5% | [3] | Anomalie renali | 25% [2] |
| Coartazione dell'aorta | 6.9% | [3] | Autoimmunità tiroidea | 50% [2] |
| Stenoinsufficienza aortica | 3.2% | [3] | Anormalità enzimi epatici | 35% [2] |
| | | | Obesità | 36% [2] |

Tab. 1 Maggiori caratteristiche fenotipiche della UTS.

Il ritardo mentale non è una caratteristica della UTS, solo nel 10% dei casi può presentarsi, dal punto di vista psicointellettivo, difficoltà nello sviluppo delle capacità motorie e di apprendimento, ed il rischio appare maggiore quando è presente un marker soprannumerario o un Xr nel cariotipo.

La diagnosi può essere prenatale in seguito alla determinazione del cariotipo fetale di solito da amniocentesi di routine, può avvenire negli ultimi mesi di gravidanza o alla nascita conseguente a segni ecografici (traslucenza della plica nucale) e per edema alle mani e piedi. Solitamente avviene durante l'infanzia a causa del ritardo staturale. Meno frequente è la diagnosi per amenorrea primaria o secondaria durante l'adolescenza o per infertilità nell'età adulta. In tutti l'analisi del cariotipo è risolutiva per la diagnosi [1]

2.2 Ruolo della genetica

La causa dell'alterazione cromosomica tipica della UTS è la non disgiunzione. Questo fenomeno avviene quando nell'ultima fase di divisione della cellula i cromosomi omologhi (X in questo caso), appaiati lungo il fuso, che dovrebbero migrare ciascuno verso il rispettivo polo cellulare, non si separano e migrano due verso lo stesso polo originando una cellula senza cromosomi X e una con due. La non disgiunzione può essere meiotica (80%) o mitotica responsabile del mosaicismo.

Ci sono evidenze che il fenomeno della ricombinazione tra omologhi durante la meiosi sia in relazione al fenomeno della non-disgiunzione [4]; nell'uomo siti di ricombinazione situati vicino ai centromeri o ai telomeri, sono associati ad errori durante la disgiunzione. Quello che viene ipotizzato è che il controllo genetico alla base della ricombinazione sia il candidato principale coinvolto negli errori di non disgiunzione. Dal momento che il numero degli scambi tra cromatidi fratelli, durante la meiosi, è caratterizzato da una variabilità interindividuale e intraindividuale, si prospetta l'esistenza di una predisposizione genetica all'aneuploidia, in virtù della presenza di determinati alleli dei geni che controllano questo meccanismo. Da studi condotti nel topo si ritiene che questi geni siano pochi, e che agiscano in modo sesso-specifico. Questa differenza sembra dovuta a differenze di tipo somatico dell'ambiente testicolare e ovarico, e non sembra dipendere dalla costituzione dei cromosomi sessuali. L'influenza ambientale sembra incidere maggiormente sugli oociti. Riassumendo sia fattori genetici che ambientali influiscono sul numero e la distribuzione degli scambi durante la meiosi, il controllo genetico di questo fenomeno è probabilmente diverso nei due sessi; e l'identificazione dei geni e dei fattori ambientali coinvolti dovrà tener conto di queste differenze. Per il momento non ci sono geni candidati che possano già essere oggetto di studio nel campo della ricerca

biomedica, per questo gli studi clinico-genetici nella UTS si concentrano sull'identificazione dei geni responsabili delle caratteristiche fenotipiche di questa sindrome.

Quali regioni cromosomiche e geni siano implicati nel determinare le caratteristiche fisiche della UTS resta ancora incerto. L'ipotesi è che il fenotipo nella UTS sia dovuto all'assenza di due cromosomi X normali prima dell'inattivazione di uno dei due, o all'aploinsufficienza dei geni delle regioni pseudoautosomiche dei cromosomi X e Y, oppure all'aneuploidia per sé. Sia il braccio corto che il braccio lungo contengono geni importanti per la funzionalità ovarica, e l'aneuploidia da sola può portare alla riduzione nel numero e nella sopravvivenza degli oociti. La mancanza di materiale cromosomico in corrispondenza della regione interstiziale e terminale del braccio lungo del cromosoma X (Xq) può risultare nella bassa statura e nell'insufficienza ovarica primaria o secondaria. Delezioni distali a Xq21 sembrano non avere effetto sulla statura. In generale la perdita del braccio corto del cromosoma X (Xp) risulta nel fenotipo turneriano completo. Delezioni distali a Xp sono compatibili con una normale funzione ovarica. La mancanza di questa regione determina bassa statura e le tipiche anomalie scheletriche, in parte dovute all'aploinsufficienza del gene SHOX, che è situato nella regione pseudoautosomica 1 in Xp22.32 e Yp11.3, ma anche l'aneuploidia per sé contribuisce al deficit di crescita. La mancanza del fattore di determinazione testicolare (SRY), situato in Yp11.3 ma fuori dalla PAR1, per esempio nel caso di un cariotipo 46,X,del(Yp), porta al fenotipo completo, anche senza una popolazione cellulare del tipo 45,X. Ci sono alcune correlazioni tra cariotipo e fenotipo; i soggetti con cariotipo 45,X hanno maggiore probabilità di avere linfedema congenito, bassa statura, disgenesia gonadica ed anomalie congenite; pazienti con cariotipo 45,X/46,XX oppure 45,X/47,XXX possono avere un menarca spontaneo ed essere fertili; generalmente donne con cariotipo 45,X/46,XX sono più alte di donne con cariotipo 45,X; la presenza di un isocromosoma Xq suggerisce un aumentato rischio di ipotiroidismo e malattie infiammatorie

dell'intestino; la presenza di un cromosoma X ad anello (Xr) può dare un aumentato rischio di lieve ritardo mentale e caratteristiche fenotipiche atipiche; infine la presenza di un intero o regioni del cromosoma Y conferisce un aumentato rischio di gonadoblastoma.

Tuttavia sulla base del cariotipo non è possibile fare una realistica previsione del fenotipo, donne con cariotipo 45,X hanno concepito, donne con cariotipo 45,X/46,XX con una preponderanza della linea 46,XX possono avere tutte le caratteristiche della Sindrome [1]. Un altro aspetto non trascurabile nella valutazione del ruolo di specifici geni o regioni cromosomiche nel determinare il fenotipo della UTS è l'*imprinting*, ovvero l'espressione differenziale di un gene a seconda dell'origine paterna o materna dei cromosomi [2].

In caso di cromosomi autosomici i geni soggetti ad imprinting hanno sempre la controparte attiva, ma nel caso dei cromosomi sessuali questo si verifica solo nei soggetti 46,XX; nei soggetti 46,XY il cromosoma X è sempre di origine materna, nei soggetti 45,X può essere sia paterno che materno. Questo implica che alcuni geni *X-linked* soggetti ad *imprinting*, probabilmente correlati al dimorfismo sessuale, possono subire un'alterazione dell'espressione in soggetti 45,X. A questo si aggiunge il fenomeno dell'inattivazione del cromosoma X, che in soggetti 46,XX porta al silenziamento dei geni (non tutti) della regione non autosomica di uno dei due cromosomi X, in modo tale da mantenere lo stesso dosaggio dei soggetti 46,XY; in soggetti 45,X se la perdita del cromosoma X è avvenuta dopo l'inattivazione, e se proprio il cromosoma X attivo viene perso, il dosaggio dei geni implicati in questo fenomeno potrebbe essere pari a zero. Da questo si capisce come in soggetti con UTS 45,X o mosaici, la semplice valutazione della presenza di geni/regioni cromosomiche non sia sufficiente per una correlazione con la loro espressione, elemento che costituisce la base per una correlazione con il fenotipo.

Nell'approccio diagnostico-molecolare nella UTS è quindi essenziale tener presente questo tipo di quadro genetico, e considerare la possibilità della valutazione di singoli geni con estrema cautela, poiché i risultati di questo

tipo di valutazione non sono che piccoli pezzi di un complicato puzzle. Finita questa doverosa premessa, l'iter diagnostico dal punto di vista genetico normalmente comprende: la determinazione del cariotipo con tecnica standard (bandeggio C e G analisi di circa 50 metafasi) ed eventuali approfondimenti di tipo citogenetico (cariotipo ad alta risoluzione e FISH), e non sarà oggetto di questa tesi; e la valutazione molecolare di sequenze del cromosoma Y. La maggior parte dei laboratori che eseguono diagnosi molecolare di routine della UTS si limitano a questi due aspetti. Il primo costituisce la base della diagnosi stessa, il secondo costituisce un utile indicatore di rischio di gonadoblastoma (dal 7 al 30% rispetto la popolazione generale in caso di positività a regioni del cromosoma Y) ed è stato ovviamente integrato nel percorso diagnostico.

Oltre a questo la valutazione genetico-molecolare nella UTS è un settore di grande attività di ricerca applicata per la possibilità che studi genetici possano offrire nuovi spiragli per terapie farmacologiche, prevenzione di alcuni fattori prognostici negativi, e per il miglioramento della qualità di vita. Le caratteristiche maggiormente indagate dal punto di vista genetico sono: la bassa statura; l'insufficienza ovarica; il gonadoblastoma. Oltre che essere tre elementi fondamentali per l'aspettativa e la qualità della vita, sono anche quelli in cui esistono maggiori indicazioni per un approfondimento genetico-molecolare.

L'argomento di questa tesi è quindi l'analisi genetica nella UTS, saranno presentati i risultati dello *screening* del gene SRY e della regione centromerica DYZ3 in una vasta casistica di soggetti con UTS; la valutazione del dosaggio del gene SHOX in una sottopopolazione di questa casistica che ha raggiunto la statura finale; e la valutazione di tipo farmaco-genetica in questa stessa sottopopolazione di un noto polimorfismo del gene per il recettore del GH (ormone della crescita) in relazione alla terapia con GH.

Per meglio comprendere il ruolo di questi fattori segue una breve introduzione per ciascuno di essi, che include anche uno studio

bibliografico sull'oncogene TSPY, candidato per il gonadoblastoma, sulla cui base è stato deciso di non inserirlo nello studio molecolare.

2.2.1 Geni/Regioni del cromosoma Y

SRY

Il gene SRY (*sex determining region on Y*) (Yp11.3) è stato scoperto attraverso l'analisi di piccoli frammenti di cromosoma Y che erano traslocati sul cromosoma X in soggetti 46,XX maschi [4], successivi studi hanno poi confermato che il gene SRY codifica per il TDF coinvolto nella determinazione testicolare. La dimostrazione che topi XX transgenici per SRY si sviluppano come maschi, infine, ha indicato che il gene SRY è sufficiente per la formazione del testicolo e il conseguente fenotipo maschile [5]. Nell'uomo l' SRY è espresso in concomitanza alla formazione del testicolo, localizza nel nucleo delle cellule del Sertoli, in accordo con un suo ruolo come fattore di trascrizione.

La proteina SRY è codificata dall'unico esone che costituisce il gene, contiene 204 aa e può essere divisa in tre regioni: il dominio HMGbox (79 aa centrali), che è altamente conservato ed è in grado di riconoscere il solco minore del DNA [6] (Fig. 1); i domini N-terminale e C-terminale che non hanno una funzione nota, ma per cui si ipotizza un'attività regolatoria sul dominio centrale.

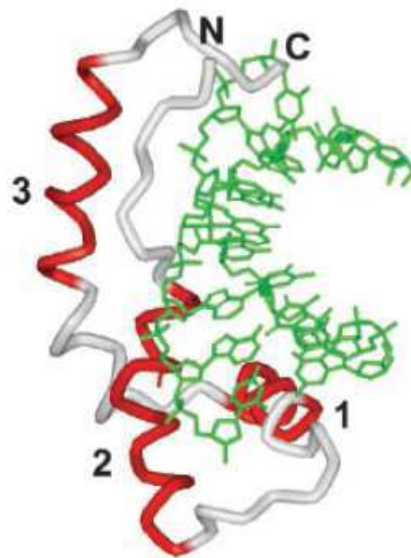


Fig. 1 Struttura 3D del complesso HMG/DNA; in rosso le 3 α -eliche, in verde il DNA.

Mutazioni del gene SRY sono associate ai 46,XY DSD (disordini dello sviluppo sessuale), tra cui la disgenesia gonadica completa (Sindrome di Swyer) e parziale e, molto raramente, il DSD ovotesticolare e la UTS. Fra queste la maggior parte è di tipo puntiforme, causa una sostituzione aminoacidica ed è localizzata all'interno dell'HMG box. Molto più rare le mutazioni in 5' e 3' dell'HMGbox, nel promotore e nel 3'UTR del gene. Il fatto che solo nel 15% delle 46,XY DSD venga trovata una mutazione del gene SRY, e che esistano casi di mutazioni familiari in cui il padre risulta totalmente asintomatico, rende evidente che la determinazione testicolare è un processo molto complesso, in cui l'azione di SRY è parte di una rete di interazioni che possono anche compensare, con fattori o meccanismi alternativi, la sua mancanza. In questo contesto sono meglio comprensibili i casi di soggetti con cariotipo a mosaico 45,X/46,XY che possono avere un fenotipo sia maschile con testicoli disgenetici, che femminile con strie gonadiche, che turneriano. Certamente la proporzione delle diverse linee cellulari influisce, e andrebbe sempre determinata anche su tessuto gonadico, ma è noto che in molti casi basta una minoranza di una linea 45X0 a determinare un fenotipo di tipo turneriano con gonadi a strie.

Più complessa diventa la valutazione del contributo al fenotipo di mutazioni del gene SRY in pazienti con cariotipo a mosaico; nei casi riportati in letteratura (Tab. 2) i soggetti presentano tutti striae gonadiche e fenotipo turneriano. In tutti la prevalenza della linea 45,X, anche se in alcuni casi gli autori non riportano la percentuale delle due linee nelle gonadi, non permette una valutazione delle mutazioni del gene SRY in relazione al fenotipo gonadico.

| CARIOTIPO | FENOTIPO | MUTAZIONI SRY | REF |
|---|--|---------------|------|
| 45,X(65%)/47,XYY(35%) | Femminile con stigate turneriane, gonadi a strie, con presenza di follicoli primordiali. | TYR4STOP | [7] |
| 45,X/46,X +mar (SRY+,ZFY+) su gonadi 45,X | Femminile con stigate turneriane, gonadi a strie, presenza di utero primordiale. | SER18ASP | [8] |
| 45,X(82%)/47,XY(18%) su gonadi 45,X(98%)/47,XY(2%) 45,X(96%)/47,XY(6%) | Femminile con stigate turneriane, gonadi a strie, presenza di utero primordiale e tube atrofiche. | SER18ASP | [8] |
| 45,X/46,X,+psu dic(Yp) | Femminile con stigate turneriane, gonadi a strie, presenza di utero primordiale. | R59G | [9] |
| 45,X(80%)/46,XY(20%) | Femminile con stigate turneriane, gonadi a strie, presenza di tessuto stromale simil testicolare. | N82X | [10] |
| 45,X(82%)/46,XY(18%) | Femminile con stigate turneriane, gonadi a strie, presenza di tessuto stromale simil testicolare. | L159fsX167 | [10] |
| 45,X(89%)/46,XY(11%) | Stigate turneriane ambiguità genitale, presenza di utero e derivati mulleriani, strie gonadiche, presenza di un testicolo intraddominale a dx. | Q74H | [10] |

Tab. 2 Cariotipo e fenotipo delle pazienti con UTS e mutazioni del gene SRY.

Nonostante questo, in caso di presenza di un intero cromosoma Y o di regioni del cromosoma Y o semplicemente di positività al gene SRY, la ricerca di mutazioni nel gene è un fattore importante, da valutare unitamente ad altri aspetti, quali il cariotipo su gonadi.

Solo l'approfondimento delle indagini molecolari, infatti, potrà chiarire il contributo di singoli geni ad alcuni aspetti del fenotipo turneriano.

2.2.2 LOCUS GONADOBLASTOMA/TSPY

Il gonadoblastoma è un tumore raro composto di aggregati di cellule germinali primordiali mescolate a piccole cellule epiteliali simili a cellule immature del sertoli e della granulosa, origina nelle gonadi disgenetiche di soggetti con fenotipo femminile che presentano tratti del cromosoma Y (DSD gonadici e UTS), per cui viene riportato un aumento del rischio dal 7 al 30%. Da studi su pazienti che riportavano delezioni del cromosoma Y e gonadoblastoma è stato possibile mappare una regione sul braccio corto del cromosoma Y (Yp), che è stata denominata GBY (*gonadoblastoma locus on chromosome Y*) [11], in cui si ritiene si trovi il gene candidato ad essere l'oncogene associato al gonadoblastoma; normalmente espresso nel tessuto gonadico normale e alterato in quello disgenetico, secondo il modello classico di cancerogenesi. Da qui lo *screening* dei geni che mappano in questa regione [12], in base a cui, l'attenzione è stata accentrata su quelli Y specifici, con una probabile funzione testicolare (Fig.2). Tra questi è stato selezionato il gene TSPY [13] [14] (*Testis specific protein Y-encoded*), che è espresso strettamente nel testicolo [15], e anche nel gonadoblastoma e seminoma, ed è omologo a proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare (ciclina B set/nap1), per cui la sua funzione potrebbe essere quella di stimolare l'entrata in meiosi .

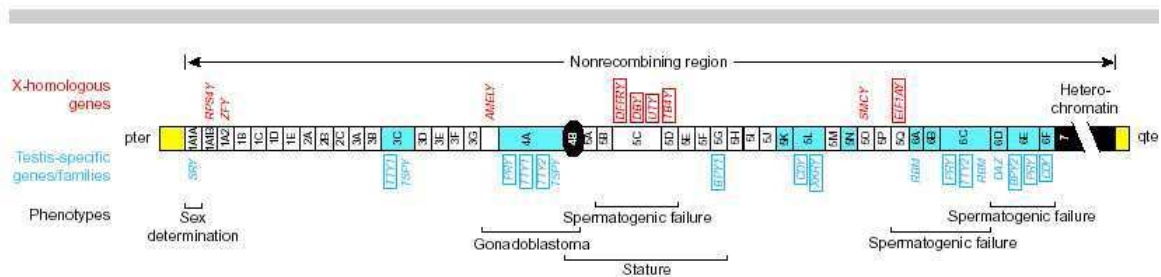
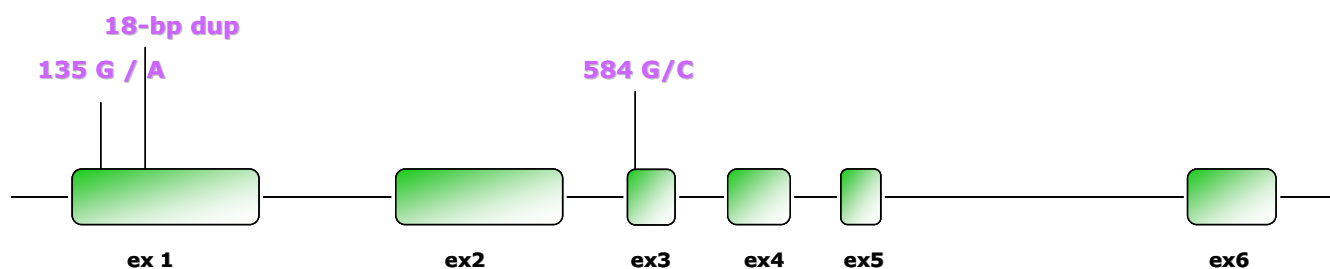


Fig. 2 Mappa genetica del cromosoma Y [16], in azzurro sono indicati i geni con probabile espressione testicolare.

Il gene TSPY presenta un'organizzazione genomica complessa, fa parte di una famiglia genica eterogenea Y-specifica e si trova ripetuto in tandem in unita' chiamate DYZ5 [17] lunghe circa 20kb e ripetute da 27 a 40 volte (variabilita' individuale) nel cromosoma Y.

Si tratta del fenomeno dell'amplificazione genica, che rappresenta una strategia per garantire la possibilità evolutiva a regioni cromosomiche non soggette a ricombinazione, come la regione non autosomica del cromosoma Y. Sul cromosoma Y ci sono circa 50-200 copie del gene TSPY con un cluster piu' grande su Yp ed uno piu' piccolo su Yq. In particolare si riconoscono 6 loci: 4 su Yp: TSPY-A,-B,-C,-D; 2 su Yq: TSPY-E, -F [18].

I membri della famiglia TSPY mostrano una divergenza di sequenza del 10% se si considerano anche gli pseudogeni che si riduce al 3% se si considerano solo i geni funzionali. Ogni unita' trascrizionale si estende per 2.8 kb, presenta 6 esoni e 5 introni, tutti i 6 cluster contengono almeno 2 copie del gene attivo e differiscono tra loro per la presenza o meno di una duplicazione di 18bp nell'ex1 e per due polimorfismi di singolo nucleotide nt. 135 g/c (ex1) e nt. 584c/g (ex3) (Fig. 3).



| 6 LOCI | 135 G/A | 584 G/C | 18bp dup |
|-------------------|---------|---------|-------------|
| TSPYA (Yp) | G/A | C | 18/36 |
| TSPYB (Yp) | G/A | G | 18/36 |
| TSPYC (Yp) | G/A | C | 18 (tracce) |
| TSPYD (Yp) | G/A | C | 18 |
| TSPYE (Yq) | G | C | 18 |
| TSPYF (Yq) | G | G | 18 |

Fig. 3 Schema del gene TSPY, posizione dei polimorfismi è indicata in fuxia; sotto i possibili aplotipi dei sei loci, sul cromosoma Y.

Dal punto di vista dell'espressione, inizialmente è stato identificato un solo trascritto attivo denominato Y-231, in seguito sono stati identificati altri 3 trascritti tramite RT-PCR su tessuto testicolare: TSPY^{major} (569bp), e altri 2 in minor quantità ottenuti per l'uso di un ATG alternativo nell'esone 1 TSPY-A (257bp), TSPY-B (170bp). Y-231 e TSPY^{major} rappresentano i maggiori trascritti e in seguito sono stati denominati TSPY-L (long) e TSPY-S (short) rispettivamente.

In un'analisi condotta su cDNA provenienti da una linea di carcinoma prostatico (LNCaP) sono stati ricercati i tre polimorfismi noti del gene TSPY con lo scopo di identificare aplotipi cDNA specifici relativi ai trascritti TSPY-L e TSPY-S [19] con i risultati decritti in Fig. 4.

| Number of clones | 135 G → A | 584 G → C | 18/36 allel | TSPY-S/L | Percentage |
|------------------|-----------|-----------|-------------|----------|------------|
| 8 | G | C | 18 | S | 32 |
| 3 | A | C | 18 | S | 12 |
| 11 | G | G | 18 | S | 44 |
| 2 | A | C | 36 | S | 8 |
| 1 | G | G | 36 | S | 4 |
| 8 | G | C | 18 | L | 89 |
| 1 | A | C | 36 | L | 11 |

Fig. 4 Aplotipi del cDNA TSPY riscontrati da et al. in LNCaP

Il passo successivo è stato quello di determinare quali geni TSPY sono attivi e responsabili della produzione di questi trascritti. La valutazione possibile è stata quella di ricercare gli aplotipi più frequenti visti nei cDNA a livello genomico, per far questo gli autori non si sono serviti dei sei loci già caratterizzati dal gruppo di Dechend [16] (Fig. 3), ma hanno preferito utilizzare un software, che sulla base delle informazioni di sequenza in banca dati, ha costruito un nuovo pannello di loci (Fig. 5).

| Contig | Code | Pos. | 135 G/A | 584 G/C | 18/36 |
|-----------|----------|----------|---------|---------|-------|
| NT_01189 | | | | | |
| | TSPY-1 | 3.579887 | →G | →G | →18 |
| | TSPY-PS1 | 3.600211 | →A | →C | →18 |
| | TSPY-PS2 | 5.023166 | →A | →C | →18 |
| NT_011878 | | | | | |
| | TSPY-D1 | 210164 | →A | →C | →36 |
| | TSPY-2 | 230497 | →A | →C | →18 |
| | TSPY-3 | 250776 | →G | →C | →18 |
| | TSPY-4 | 271121 | →A | →C | →18 |
| | TSPY-5 | 289655 | →G | →C | →18 |
| | TSPY-D2 | 309967 | →A | →C | →36 |
| | TSPY-D3 | 330250 | →A | →C | →36 |
| | TSPY-6 | 350580 | →A | →C | →18 |
| | TSPY-PS3 | 370767 | →A | →C | →18 |
| | TSPY-PS4 | 730793 | →A | →C | →18 |
| NT_011875 | | | | | |
| | TSPY-PS5 | 9.675439 | →C | →C | →18 |

Fig. 5 Aplotipi possibili per il gene TSPY in tutti i loci del cromosoma Y.

Sulla base di questi aplotipi si ritiene che siano in particolare 3 i geni più attivi, di cui uno TSPY-1 e' l'unico ad avere un promotore diverso dagli

altri e codifica per il trascritto più abbondante TSPY-S (1/3 di tutti i trascritti). Questo lavoro non avuto seguito e a tutt'oggi non c'è stata replica di questi risultati.

Questa panoramica rende l'idea di come sia complessa l'analisi di questo gene a livello genomico, in particolare a scopo diagnostico, per cui molti gruppi utilizzano il gene TSPY solo come marcatore per il cromosoma Y, così come si utilizzano indistintamente altri geni o regioni.

Diverso significato ha invece un'analisi dell'espressione di questo gene, come recentemente presentato dal gruppo di Su [20], che tramite RT-PCR su RNA proveniente da gonadoblastoma in un caso di 46,XY DSD gonadico, ha valutato l'espressione di 15 geni del cromosoma Y e ha avuto un risultato positivo solo per il gene TSPY. Questo conferma che TSPY ha un ruolo nella carcinogenesi del gonadoblastoma e che per la maggiore sua comprensione sono necessari studi approfonditi a livello di RNA e proteina.

2.2.3 Markers del cromosoma Y

Il gene SRY viene anche utilizzato come marker del cromosoma Y in tutte le pazienti con UTS indipendentemente dal cariotipo. A questo scopo vengono utilizzati anche altri geni e regioni del cromosoma Y (tra cui ZFY, PABY, SRY, DYZ3, YRRM, DYZ1, TSPY, BPY1, BPY2, PRY, PRKY, DBY), lo scopo è quello di valutare con tecniche più sensibili del cariotipo classico la presenza di frammenti del cromosoma Y, che conferisce un aumento del rischio di gonadoblastoma dal 7 al 30%. La tecnica maggiormente utilizzata è la PCR, la cui sensibilità ha permesso di individuare la presenza di frammenti del cromosoma Y anche in soggetti con cariotipo 45,X [21] [22] [23]. In questi casi un'ulteriore indagine tramite FISH è in grado di confermare il risultato della PCR, e, visto l'importanza di un risultato positivo, la strategia è quella di utilizzare più di una tecnica per confermare il risultato. Anche in questo caso la possibilità di fare l'analisi

su un campione di gonadi sarebbe molto importante ma troppo invasiva. Questo tipo di indagine, infatti, fa parte di uno *screening* che viene fatto su tutte le pazienti con UTS alla diagnosi. L'uso della PCR è ideale per la semplicità nella realizzazione e per i costi contenuti, ma ha il grande limite di non essere quantitativa.

Il *goal* che si prefigge la ricerca clinica ora è quello di utilizzare una tecnica che sia sensibile come la PCR, specifica e quantitativa. Nella Tab. 3 sono riportati alcuni esempi di tecniche molecolari che vengono utilizzate, si tratta della Realtime-PCR, QF-PCR (*quantitative fluorescent PCR*), Pyrosequencing.

| TECNICA | DESCRIZIONE | REF |
|----------------|--|------|
| QF-PCR | Consiste nell'amplificazione di STS o regioni geniche con l'uso di un primer marcato con un fluoroforo, e la successiva elettroforesi capillare su un sequenziatore automatico, la fluorescenza misurata viene espressa come area sottostante al picco corrispondente al frammento generato in PCR. | [24] |
| REALTIME PCR | PCR quantitativa, in cui la quantità di prodotto viene determinata prima del raggiungimento della saturazione e in relazione ad un controllo interno, la quantificazione avviene ad ogni ciclo sulla base della fluorescenza emessa da molecole legate al DNA, con diverse strategie di marcatura che le rendono da poco ad altamente specifiche. | [24] |
| Pyrosequencing | Metodo quantitativo per l'individuazione di SNPs, basato sulla determinazione di PPI generati durante la sintesi del DNA, che vengono convertiti in ATP, il quale viene utilizzato dalla luciferasi nella reazione di conversione della luciferina in ossiluciferina, che produce luce, la cui intensità è misurata dallo strumento ed è proporzionale al prodotto atteso. | [25] |

Tab. 3 Descrizione delle tecniche quantitative sperimentate per la diagnosi della UTS.

2.2.4 SHOX

La presenza di delezioni in corrispondenza della PAR1 che erano associate alla bassa statura, in pazienti con bassa statura/UTS/S. di Leri-Weill, ha portato nel 1997 all'identificazione di un nuovo gene tramite clonaggio per posizione grazie al lavoro di due gruppi distinti [26] [27].

Il gene denominato SHOX (*Short stature homeobox-containing gene*) mappa in Xp22.3 /Yp11.32, copre una regione di 40 Kb, e consta di 8 esoni di cui due non codificanti (1 e 8). I restanti esoni codificano per 2 trascritti tramite splicing alternativo che risulta in 2 proteine con lo stesso N-ter, ma differente C-ter: Shoxa (292aa) e Shoxb (225aa). Entrambi i prodotti hanno un dominio funzionale della famiglia degli *homeobox* (Fig. 6), si tratta di un dominio di legame al DNA tipico dei fattori di trascrizione scoperti in *Drosophila*, coinvolti nell'embriogenesi, che mostrano un impressionante livello di conservazione.

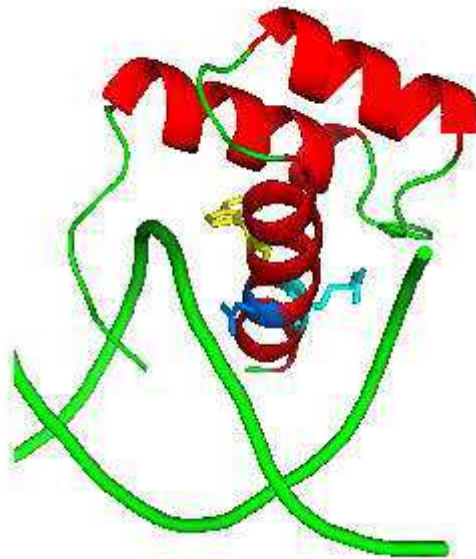


Fig. 6 Modello tridimensionale del dominio homeobox [28], con l' α -elica numero 3 nel solco maggiore del DNA (in verde).

Entrambe le proteine sono espresse durante l'embriogenesi degli arti nell'uomo ²⁴, ma il meccanismo molecolare e i target non sono ancora noti. Alterazioni del gene SHOX sono associate alla bassa statura nella Discondrosteosi di Léri-Weill (LWD): deformità di Madelung del polso, mesomelia, bassa statura (5); nella Displasia Mesomelica di Langer (forma omozigote di LWD); nella UTS (aploinsufficienza di SHOX); e nella bassa statura idiopatica (ISS). In tutti questi casi, indipendentemente dalla natura dell'alterazione del gene SHOX, mutazioni puntiformi o ampie delezioni, l'effetto sembra essere quello della perdita del contributo di un allele, da cui si deduce che SHOX sia legato ad un meccanismo dosaggio-dipendente. Questo è quello che si verifica nella UTS dove l'aploinsufficienza di SHOX, conseguente alla perdita dell'intero cromosoma X, è ritenuta la causa principale, anche se non l'unica, della bassa statura. A conferma di questo, un recente studio ha valutato la risposta alla terapia con GH in pazienti con UTS e pazienti non UTS con delezioni del gene SHOX, dimostrando che in generale, quando la causa della bassa statura è imputabile a SHOX c'è una buona risposta alla terapia, ma la statura finale dei soggetti non UTS è maggiore rispetto a quelli con UTS [29]. Quale sia il legame tra Shox e il *pathway* che coinvolge il GH non è noto, bassi livelli di IGF1 sono stati riscontrati in pazienti con delezione del gene SHOX, ma l'idea che SHOX possa intervenire sul metabolismo dell'IGF1 è solo un'ipotesi [30]; si postula che l'azione di Shox sia come repressore della fusione delle epifisi durante la maturazione scheletrica, in particolare degli arti, tale azione potrebbe essere compensata dalla presenza di un alto livello di IGF1 indotto dalla terapia ad alte dosi di GH.

2.2.5 GHR

Il gene del GHR è situato sul cromosoma 5 nella regione p13.1-p12 [31], si estende per più di 160 Kb ed è costituito da 10 esoni. Il primo esone e parte dell'esone 2 non sono codificanti; il resto dell'esone 2 codifica per il peptide segnale e per i primi aminoacidi del dominio extracellulare, gli esoni dal 3 al 7 codificano per il dominio extracellulare, l'esone 8 per la regione transmembrana e gli esoni 9 e 10 per il dominio intracellulare. A livello proteico il recettore del GH appartiene alla famiglia di recettori per le citochine. La proteina è composta da 638 aa di cui: 18 costituenti il peptide segnale, 246 il dominio extracellulare, 24 la regione transmembrana e 350 il dominio citoplasmatico. Come gli altri membri del gruppo ha una sola regione transmembrana, è privo di attività chinasi intrinseca ed è associato a delle tirosinchinasi della famiglia Janus (nel caso specifico la Jak2). Il legame con il GH favorisce la dimerizzazione del recettore, evento indispensabile per la trasduzione del segnale, che porta alla produzione dei fattori fondamentali per la crescita (Fig. 7). Mutazioni nel gene del GHR sono responsabili della Sindrome di Laron [32], disordine genetico autosomico recessivo, caratterizzata da bassa statura per resistenza al GH, facies tipica (macrocefalia, bozze frontali prominenti, radice del naso insellata, capelli radi), obesità, ossa sottili, muscolatura iposviluppata.

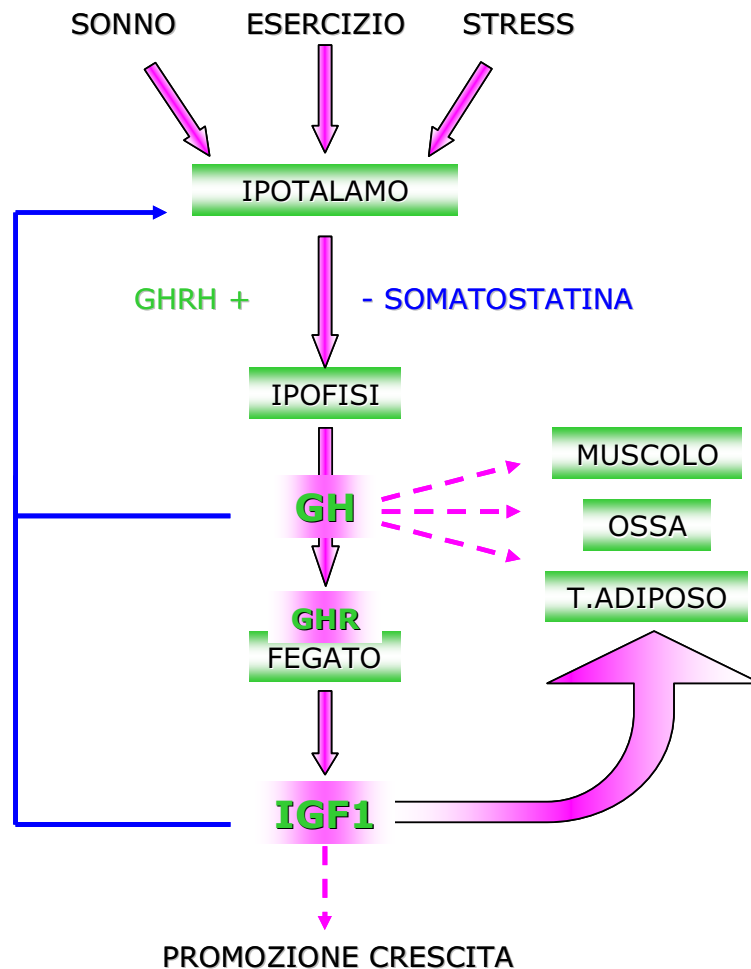


Fig. 7 Schematizzazione dell'azione del GH.

Nel gene del GHR esiste una variante allelica mancante di una zona di circa 2.7 kb comprendente l' esone 3: studi sulla regione fiancheggiante questo esone hanno rivelato la presenza di sequenze retrovirali (LTR) che, probabilmente in seguito ad un evento di ricombinazione omologa intracromosomica, hanno causato l'excisione del frammento compreso tra loro (Fig. 8) [33]. Questa variante è un polimorfismo, con una frequenza per l'allele d3 del 25-32% e una frequenza per gli omozigoti del 9-14%, che, sebbene non sia associato a condizioni patologiche, attualmente è oggetto di studi di associazione [34] [35], in cui viene valutato in relazione alla terapia con GH e alla bassa statura, dovuta a diverse condizioni tra cui anche l'UTS [36]. I risultati sono discordanti [37] [38] e la valutazione in casistiche più ampie è necessaria per chiarire questo aspetto. Dal punto di vista funzionale esiste uno studio [39], condotto in vitro in fibroblasti di

rene embrionale trasfettati con un costrutto in grado di rispondere alla transattivazione mediata dal GHR, in cui l'attività è stata correlata alla presenza del genotipo omozigote fl/fl, eterozigote fl/d3 e omozigote d3/d3, da cui si evince che l'attività dei dimeri fl/d3 e d3/d3 supera del 30% quella del dimero fl/fl.

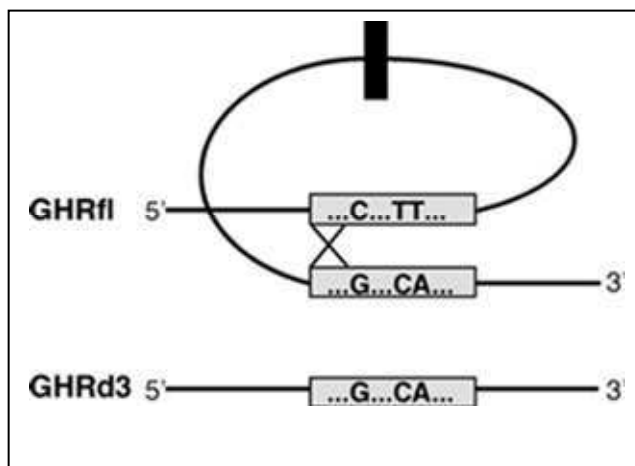


Fig. 8 Schema del meccanismo che porta all'excisione dell' esone 3, che mostra l'appaiamento delle sequenze LTR (in grigio).

Come tutti gli studi in vitro, anche questo potrebbe non rispecchiare le condizioni in vivo, infatti la presenza di una singola copia dell'allele d3 sembra essere sufficiente per una normale crescita. Per questo motivo gli studi sono maggiormente orientati ad una valutazione di tipo farmacogenetico, che però, alla luce della diversità nei risultati, deve trovare un metodo più rigoroso e omogeneo.

3 MATERIALI E METODI

3.1 *Pazienti*

Questo studio comprende 162 soggetti che rappresentano quasi la totalità delle pazienti con Sindrome di Ullrich-Turner seguite presso il centro di Endocrinologia Pediatrica, Ambulatorio di Sindromologia e Malattie Rare, dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria S.Orsola-Malpighi di Bologna. La maggior parte di esse si è presentata alla diagnosi per bassa statura e/o amenorrea primaria; i criteri d'inclusione sono stati: fenotipo femminile senza ambiguità genitale o evidente clitoridomegalia, bassa statura, caratteristiche fenotipiche tipiche della sindrome, monosomia del cromosoma X. L'analisi del cariotipo standard ha evidenziato le seguenti percentuali: 46% 45,X, 10% 46,Xi(Xq), 3% 46,del(X), 41% mosaici (28% 45,X/46,XX 31% 45,X/46Xi(Xq), 16% mosaici con Y). Tra queste 162 pazienti sono state selezionate 68 pazienti che avevano raggiunto la statura finale (SF), che è stata espressa in relazione alla statura attesa o *target height* (TH): come $\Delta\text{SDS}(\text{SF-TH})$; in relazione alla statura media delle donne con UTS Italiane [40]: come SDST; e in relazione alla statura alla prima osservazione, tempo 0 (espresso in SDS in relazione alla statura media delle donne con S. di Turner Italiane) : come $\Delta\text{SDS}(\text{SF-S0})$. I valori sono stati espressi in SDS (*standard deviation score*).

3.2 Estrazione di DNA genomico

Tutti i soggetti analizzati vengono sottoposti ad un prelievo di sangue periferico di 10 ml che viene conservato a -80° C. Al momento dell'estrazione il prelievo viene diviso in due aliquote, di cui da una viene estratto il DNA genomico tramite il kit *Wizard Genomic DNA purification* (Promega), l'altra è tenuta per un' eventuale seconda estrazione.

Dopo l'estrazione viene determinata la concentrazione del DNA tramite spettrofotometro (*SmartSpec 3000 biorad*), il DNA concentrato viene conservato a -20° C e le aliquote pronte all'uso alla concentrazione di $50\text{ng}/\mu\text{l}$ vengono mantenute in frigo a $+4^{\circ}$ C.

3.3 PCR

Le condizioni di PCR per il gene SRY e la regione DYZ3 sono riportate in Tab. 4 i primers utilizzati sono disponibili in letteratura [41] [42]. Dal momento che in pazienti con UTS l'esito dell' amplificazione di regioni del cromosoma Y costituisce di per sé un risultato, è stata applicata una strategia in particolare per il gene SRY, che prevede l'uso di un controllo interno alla PCR, e l'uso di due controlli di amplificazione uno maschile (positivo) ed uno femminile (negativo).

| Nome primer | Sequenza 5'→3' | Tm |
|--------------------|--------------------------------|------|
| AfFor (senso) | GGT GTT GAG GGC GGA GAA ATG C | 64°C |
| AfRev (antisenso) | GTA GCC AAT GTT ACC CGA TTG TC | 60°C |
| DYZ3 F (senso) | TGA AAA CTA CAC AGA AGC TG | 53°C |
| DYZ3 R (antisenso) | ACA CAT CAC AAA GAA CTA TG | 51°C |
| Fr F (senso) | AGG CAA CGT CCA GGA TAG AG | 59°C |
| Fr R (antisenso) | GCA ATT CTT CGG CAG CAT CTT | 58°C |

Tab. 4 Primers utilizzati per la PCR del gene SRY e della regione DYZ3, e per il sequenziamento del gene SRY (FrF e FrR).

Il volume finale della miscela per la reazione di PCR per il gene SRY e la regione DYZ3 è di 50 µl e contiene 200 ng di DNA genomico, 10 pmoli di ogni primer tranne i primers per il controllo interno (3.5 pmoli), dNTPs 0.02 mM, 2U di enzima e 5µl del corrispondente buffer 10x, H₂O sterile bidistillata a volume.

E' stato utilizzato DMSO per aumentare la specificità della reazione. Le condizioni specifiche di ogni amplificazione sono riportate in Tab. 5.

| Frammento | T(°C) | Tempo | N° cicli | Taq e reagenti particolari |
|------------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------------------------|
| SRY | 95 | 5' | 1 | TAQ Roche(3.5 U) |
| | 95 | 40'' | 5 | DMSO 2% |
| | 61 | 20'' | | |
| | 72 | 45'' | | |
| | 95 | 40'' | | |
| | 59 | 15'' | 25 | |
| | 72 | 40'' | | |
| | 72 | 7' | | |
| DYZ3 | 95 | 5' | 1 | TAQ Roche(3.5 U) |
| | 95 | 30'' | 10 | DMSO 2% |
| | 52 | 30'' | | |
| | 72 | 1' 30'' | | |
| | 95 | 30'' | 1 | |
| | 50 | 30'' | 25 | |
| | 72 | 1' 30'' | | |
| | 72 | 5' | 1 | |

Tab. 5 Cicli di amplificazione utilizzati per il gene SRY (sopra); e per la regione DYZ3 (sotto).

L'esito della PCR è stato verificato tramite elettroforesi su gel di agarosio.

3.4 Purificazione e sequenziamento

In caso di positività alla reazione di PCR il gene SRY viene sottoposto a sequenziamento per l'individuazione di eventuali mutazioni. La purificazione del prodotto di PCR viene eseguita mediante separazione su colonna (*QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen*), il frammento purificato viene quindi sottoposto a reazione di sequenza (*GenomeLab DTCS-Quick start kit, Beckman*) con l'utilizzo dei primers di PCR e di altri primers interni al frammento (Tab. 4). Il prodotto della reazione di sequenza viene a sua volta purificato mediante precipitazione con un Kit commerciale (*Seq-Prep Kit II, GENEDIA*) e sottoposto a sequenziamento diretto tramite CEQ8000 (*Beckman*).

3.5 Metodica per lo screening del polimorfismo: delezione dell'ex 3 del GHR

La valutazione della frequenza della delezione dell'esone 3 del GHR è stata effettuata utilizzando la multiplex PCR illustrata da Pantel e Machinis [33]. I primer della reazione sono riportati nella Tab. 6.

| <u>Nome primer</u> | <u>Sequenza 5'→3'</u> | <u>Tm</u> |
|---------------------------|---------------------------------|------------------|
| G1 (senso) | TGT GCT GGT CTG TTG GTC TG | 59.5°C |
| G2 (antisenso) | AGT CGT TCC TGG GAC AGA GA | 59.5°C |
| G3 (antisenso) | CCT GGA TTA ACA CTT TGC AGA CTC | 61.5°C |

Tab. 6 Primers utilizzati per la multiplex PCR dell'esone 3 del GHR.

La miscela di reazione è così composta: 75 ng di Dna; 7.5 picomoli di ciascun primer; 100 μ M di dNTPs; DMSO al 2%; 1.5 U di Taq Eppendorf e relativo buffer 10X in fine H₂O bidistillata fino a raggiungere un volume finale di 25 μ l (non è necessario un volume di reazione maggiore in quanto i prodotti di reazione non vengono poi sottoposti a sequenziamento).

Il ciclo pubblicato è stato modificato in base ai nostri risultati sperimentali per ottimizzare gli stessi ed è stato ottenuto il seguente:

| <u>T(°C)</u> | <u>Tempo</u> | <u>N°Cicli</u> |
|--------------|--------------|----------------|
| 94 | 5' | 1 |
| 94 | 30" | |
| 62 | 30" | 10 |
| 72 | 1.5' | |
| 94 | 30" | |
| 60 | 30" | 20 |
| 72 | 1.5' | |
| 72 | 7' | 1 |

Tab. 7 Cicli di amplificazione utilizzati per lo *screening* della delezione dell'esone 3 del GHR.

I possibili prodotti di questa reazione sono tre (Fig. 9): la coppia **G1G3** genera un frammento di 935 pb solo in presenza dell'allele GHRfl (full length) in quanto mentre il primer **G1** si lega ad una sequenza a monte della parte coinvolta nella delezione, il primer **G3** si lega ad una zona interna alla delezione stessa. Il primer **G2** si lega ad una zona a valle della delezione, la coppia **G1G2** si lega quindi a sequenze che sono comuni ad

entrambi gli alleli (sia quello che presenta la delezione che il full-length), quando si lega all'allele GHRd3 (deleto per l'esone 3) amplifica un frammento di 532 pb; quando si lega ad un allele GHRfl amplifica un frammento di 3248 pb (questo frammento non è desiderato nella reazione quindi i tempi di allungamento del ciclo sono stati impostati al fine di sfavorirlo).

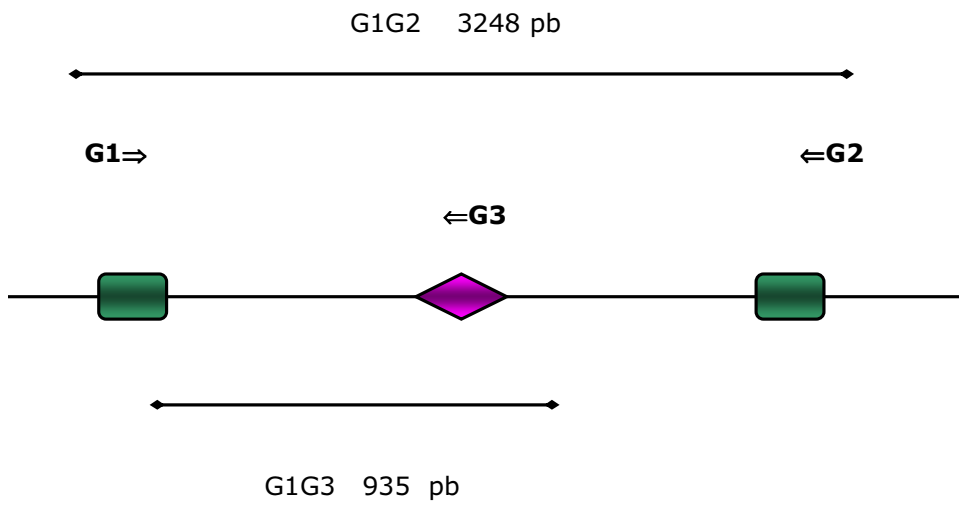
Tre controlli positivi vengono sottoposti alla reazione di PCR contemporaneamente ai campioni da esaminare: uno omozigote GHRfl; uno omozigote GHRd3 ed uno eterozigote. Gli amplificati sono sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% addizionato di etidio bromuro per 40 minuti a 60 V, a corsa terminata il gel viene esposto al transilluminatore e quindi viene fotografato. Il caratteristico pattern di bande è il seguente:

Omozigote GHRfl: un'unica banda di **935 pb**

Omozigote GHRd3: un'unica banda di **532 pb**

Eterozigote: 1 banda di **935 pb** e una banda di **532 pb**

ALLELE GHRf1 :



ALLELE GHRd3 :

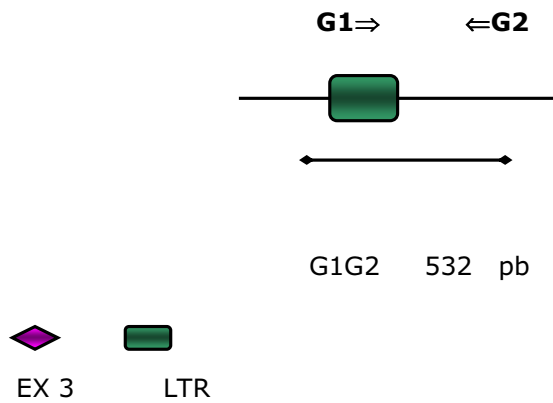


Fig. 9 Schema della multiplex PCR usata per valutare gli alleli GHRf1 e GHRd3.

3.6 MLPA

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) MRC-Holland bv, Amsterdam, The Netherlands.

L'analisi tramite MLPA prevede un' ibridazione di sonde oligonucleotidiche specifiche su sequenze bersaglio: le sonde sono due per ogni sequenza una in 3' e una in 5'; solo il loro corretto appaiamento permette il successivo legame delle loro estremità interne alla sequenza bersaglio mentre le estremità esterne non si ibridano e presentano due sequenze a cui si appaiano i primers: Y in 5' uguale per tutte le sonde, e X in 3' che contiene una sorta di spaziatore di diversa lunghezza per ciascuna sonda, permettendo così la separazione di ogni picco durante la migrazione su gel. L'Ultima fase consiste in una normale PCR dove solo le sequenze su cui le sonde si sono ibridate e legate vengono amplificate. Tutti i reagenti sono forniti dal kit, il protocollo in dettaglio prevede:

1. Denaturazione del DNA (20-500 ng) a 98°C per 5 min. Il DNA viene diluito con TE o H₂Odd fino ad un volume finale di 5 µl.
2. Incubazione di 1 min a 98°C e ibridazione *over night* (minimo 16 ore) a 60°C, dopo aver aggiunto 1.5 µl di *SALSAprobe-mix* e 1.5 µl di *MLPA Buffer*.
3. *Ligation* a 54°C per 15 min, dopo aver aggiunto 32 µl contenenti: 3µl *buffer ligasi-65 A*, 3µl *buffer ligasi-65 B*, 25µl di H₂Odd e 1µl di *Ligasi-65*. Seguita da una inattivazione dell'enzima a 98°C.
4. PCR. Preparazione della mix con: 4 µl di *SALSA PCR Buffer 10x*, 26µl di H₂Odd, 10µl di reazione di *ligation*, e l'aggiunta finale a 60°C di 10 µl di polimerasi-mix (2 µl di *SALSA PCR-primers*, 2 µl di *SALSA Enzyme Dilution Buffer*, 5.5 µl di H₂Odd e 0.5 µl di *polimerasi*). Amplificazione alle seguenti condizioni: 35 cicli: 30 sec a 95°C; 30 sec a 60°C; 60 sec a 72°C; 20 min finali a 72°C.
5. Elettroforesi su sequenziatore CEQ8000. Preparazione dei campioni per la corsa: 0.7µl di reazione di PCR, 0.5µl di *Beckman D1-labeled 60-600 molecular weight marker* e 40µl di SLS (sample loading solution). Elettroforesi alle seguenti condizioni: T dei capillari 50°C; denaturazione a 90°C per 90 sec; tempo di ignizione 60 sec a 2.0 KV; tempo di corsa: 60 min a 4.8 KV.
6. Analisi con CEQ8000 fragment analysis software.

SALSA probe mix per l'analisi del gene SHOX contiene 39 sonde di cui 14 sono di controllo, e 25 sono specifiche (Tab. 8 e Fig. 10): 2 in PAR1 p-ter, 8 per i singoli esoni del gene SHOX, 5 in 3' rispetto il gene SHOX sempre nella regione pseudoautosomica sul braccio corto, 3 specifiche del cromosoma Y, 5 specifiche del cromosoma X, 2 in PAR2 q-ter.

| Lunghezza (nt) | Salsa Probe # | Posizione Cromosomica |
|-----------------------|----------------------------|---|
| 64-70-76-82 | DQ-control bands* | |
| 92 | Synthetic Control probe | 2q14 |
| | | |
| 139 | Control probe 1061-L0727 | 12q |
| 148 | Control probe 0522-L0102 | 10q |
| 157 | AR probe 0652-L0423 | Xq11-q12, approx. 60 Mb from SHOX |
| 166 | SHOX probe 1145-L0702 | exon 1 |
| 175 | Control probe 3110-L2550 | X |
| 184 | UTY probe 0851-L0464 | Yq11, approx. 15 Mb from SHOX |
| 193 | Control probe 0612-L0050 | 1q31 |
| 202 | SHOX probe 1146-L0703 | exon 2 |
| 211 | Control probe 0607-L0591 | 9p21 |
| 220 | OA1 probe 2975-L2406 | Xp, approx. 9 Mb from SHOX |
| 229 | PPEF1 probe 0821-L0465 | Xp22, approx. 15 Mb from SHOX |
| 238 | Control probe 0672-L0169 | 8q24 |
| 247 | SHOX probe 1147-L0802 | exon 3 |
| 256 | Control probe 0587-L0382 | 18q21 |
| 265 | LOC159015 probe 1341-L0887 | 4 Kb before SHOX |
| 274 | SRY probe 1023-L0596 | Yp11.3, approx. 2 Mb from SHOX |
| 283 | Control probe 1227-0771 | 22q11 |
| 298 | SHOX probe 1148-L1331 | exon 4 |
| 310 | ASMT probe 1153-L0712 | PAR1, p-telomeric pseudoautosomal region |
| 319 | L1CAM probe 0819-L0337 | Xq28, approx. 1 Mb from q-ter |
| 328 | OA1 probe 2566-L2027 | Xp, approx. 9 Mb from SHOX |
| 337 | SHOX probe 1149-L0910 | exon 5 |
| 346 | CSF2RA probe 1170-L0710 | PAR1, p-telomeric pseudoautosomal region, ~800 Kb from SHOX |
| 355 | SYBL1 probe 1156-L0659 | q-telomeric pseudoautosomal region, 0.1 Mb from q-ter |
| 364 | SMCY probe 1026-L0312 | Yq11, approx. 21 Mb from SHOX |

| Lunghezza (nt) | Salsa Probe # | Posizione Cromosomica |
|----------------|--------------------------|---|
| 373 | Control probe 1235-L0773 | 22q11 |
| 382 | SHOX probe 1150-L0911 | exon 6 |
| 391 | Control probe 0918-L0506 | 2p22 |
| 400 | SHOX probe 1151-L0708 | exon 7 |
| 409 | PDCD8 probe 0820-L0338 | Xq25, approx. 124 Mb from SHOX |
| 418 | OA1 probe 3135-L2404 | Xp, approx. 9 Mb from SHOX |
| 427 | SHOX probe 1152-L0709 | exon 8 |
| 436 | Control probe 1015-L0595 | 20q12 |
| 445 | Control probe 1440-L0909 | 2p16 |
| 454 | IL3RA probe 1342-L0711 | p-telomeric pseudoautosomal region |
| 463 | Control probe 0979-L0568 | 10p14 |
| 475 | PR48 probe 2726-L1588 | PAR1, between Xpter and SHOX |
| 485 | SYBL1 probe 1763-L2150 | PAR2q-telomeric pseudoautosomal region, 0.2 Mb from q-ter |

Tab. 8 Sonde utilizzate nella MLPA.

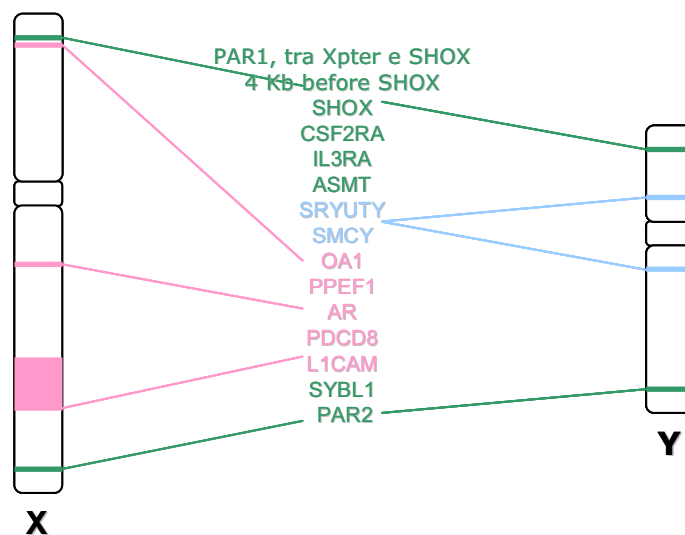


Fig. 10 Schema della posizione cromosomica approssimativa delle 25 sonde specifiche; sonde per le regioni pseudoautosomiche (in verde); sonde Y-specifiche (in azzurro); sonde X-specifiche (in blu).

Oltre ai campioni di cui determinare il dosaggio, vengono aggiunti all'analisi dei campioni di controllo, uno maschile ed uno femminile. L'elaborazione dei dati sfrutta i valori dell'area sottostante il picco relativo ad ogni frammento ed è stata fatta su un normale foglio Excel. La determinazione dei valori, che vanno da 0 (delezione omozigote) a 1 (assenza di delezione) , viene fatta sulla base del rapporto tra i valori relativi al campione di controllo e quelli relativi al campione in studio. Ogni singolo valore, corrispondente ad una determinata sonda, su cui viene calcolato il rapporto viene prima normalizzato sui valori delle 14 sonde di controllo.

3.7 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con l'uso del software SPSS. E' stata valutata la relazione dei parametri: Δ SDSSF-TH, SDST e Δ SF-S0, con i possibili genotipi per la delezione dell' esone tre del gene GHR (fl/fl, fl/d3, d3/d3). E' stato applicato l' ANOVA test, il T-Student e il Bonferroni test per i parametri SDST; mentre per i valori del Δ SDSSF-TH e del Δ SDS(SF-S0) è stato necessario applicare i test non parametrici Kruskhal-Wallis e Mann-Whitney. Per tutti i test è stata stabilita la significatività per $p < 0.05$.

4 RISULTATI

4.1 *Analisi del gene SRY e della regione DYZ3*

L'analisi del gene SRY e della regione DYZ3 è stata condotta su 161 pazienti, dando un risultato coerente con l'analisi standard del cariotipo in tutti i casi tranne 8. L'analisi citogenetica classica, infatti, aveva mostrato la presenza del cromosoma Y in 11 su 161 pazienti, l'analisi tramite PCR del gene SRY e della regione DYZ3 ha incrementato questo numero a 19. I pazienti risultati positivi sono mostrati in Tab. 9. Di questi 12 pazienti hanno subito gonadectomia, e in 4 l'analisi istologica ha evidenziato la presenza di gonadoblastoma (in due casi monolaterale, e negli altri due bilaterale), in due di questi casi il cariotipo standard non aveva evidenziato la presenza del cromosoma Y (45,X/46,X+mar; 45,X).

| CARIOTIPO | SRY | DYZ3 |
|-------------------|-----|------|
| 45,X | + | + |
| 45,X | + | + |
| 45,X | + | + |
| 45,X | + | + |
| 46,Xi(Xq) | + | + |
| 45,X/46,X+mar 20% | + | + |
| 45,X/46,X+mar 14% | + | + |
| 45,X/46,X+mar | + | + |
| 45,X/46,XY 70% | + | + |
| 45,X/46,XY 68% | + | + |
| 45,X/46,XY 32% | + | + |
| 45,X/46,XY 40% | + | + |
| 45,X/46,XY 35% | + | + |

| CARIOTIPO | SRY | DYZ3 |
|----------------------------|-----|------|
| 45,X/46,XY | + | + |
| 45,X/46,X(Yidic) 21% | + | + |
| 45,X/46,XY/46,X(Yidic)12% | + | + |
| 45,X/46,X (Yidic) 33% | + | + |
| 45,X/46 X (Yidic) 16% | + | + |
| 45,X/46,XY/47,X(idicY) 72% | + | + |

Tab. 9 Cariotipo delle 11 pazienti risultate positive alla PCR a SRY e DYZ3.

Nei 4 casi con cariotipo 45,X e nel caso con cariotipo 46,Xi(Xq), è stata condotta la ricerca di mosaicismi nascosti tramite FISH, con sonde specifiche del cromosoma Y (centromero e SRY). I risultati confermano la presenza di frammenti del cromosoma Y con le seguenti percentuali nei 4 casi con cariotipo 45,X: in due casi segnale positivo sia per il centromero che per SRY nel 6% delle metafasi analizzate; in un caso segnale positivo solo per il centromero e non per SRY e Yq nel 5% dei nuclei analizzati; in un caso segnale positivo per il centromero nello 0.8% dei nuclei analizzati e per SRY nell'1% dei nuclei analizzati; nel caso con cariotipo 46,Xi(Xq) il segnale è risultato positivo solo per SRY nel 2.5% dei nuclei analizzati.

In tutti i casi in cui è stata evidenziata la presenza del gene SRY (Fig. 11), si è proceduto al sequenziamento dell'unico esone codificante, e non sono state evidenziate alterazioni in nessuna delle pazienti.

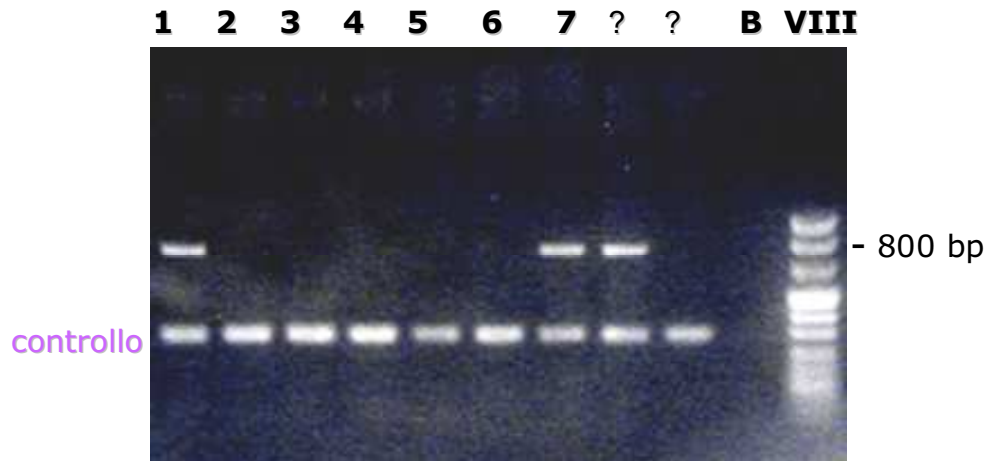


Fig. 11 Fotografie dell' elettroforesi su agarosio dei prodotti di PCR del gene SRY (sopra) e della regione DYZ3 (sotto).

4.2 MLPA

L'analisi tramite MLPA è stata condotta su una serie di pazienti con cariotipo a mosaico che mostravano alterazioni del braccio corto del cromosoma X o Y e che avevano raggiunto la statura finale, con lo scopo di valutare il dosaggio del gene SHOX. L'analisi è stata condotta tramite MLPA e ha evidenziato la presenza della diploidia per il gene SHOX in un caso, in tutti gli altri l'analisi ha evidenziato una condizione di monosomia (Tab. 10). Dal momento che la condizione di monosomia per il gene SHOX è associata alla bassa statura, i risultati dell' MLPA sono stati valutati in relazione alla statura finale delle pazienti analizzate, che è stata espressa in SDS (*standard deviation score*) calcolato sulla base della statura di riferimento per pazienti con UTS Italiane non sottoposte ad alcun trattamento SDST; e come differenza tra SDSSF e SDSTH (Δ SDSSF-TH), dove l' SDS è calcolato sulla base della popolazione femminile normale italiana, sui valori della statura finale (SF) e della *Target Height* (calcolata sulla statura parentale).

| CARIOTIPO | SHOX | Δ SDS (SF-TH) | SDST |
|-------------------------------------|------|----------------------|------|
| 45,X/46,XXp- | 1 | -2.7 | 0.1 |
| 46,XX p-/46, Xi(Xq)/ 47 Xi(Xq)i(Xq) | 1 | -2.5 | 0.7 |
| 46,Xdel(X) | 2 | 1.2 | 1.9 |
| 46,Xdel(X)/46,Xi(Xq) | 1 | 1.1 | 2.9 |
| 46,Xdel(X)/45,X | 1 | -1.0 | 0.7 |
| 45,X/46,X+mar 14% | 1 | 0.2 | 2.4 |
| 45,X/46,X,+mar 37% | 1 | -2.3 | 0.7 |
| 45,X/46,X,+mar 14% | 1 | -0.6 | 3.9 |
| 45,X/46,X(Yidic) 33% | 1 | -0.6 | 1.2 |

| CARIOTIPO | SHOX | Δ SDS (SF-TH) | SDST |
|--|------|----------------------|------|
| 45,X/46,X(Yidic) 21% | 1 | -0.1 | 1.8 |
| 45,X/46,X(Yidic) 16% | 1 | -2.5 | 0.5 |
| 45,X/46,X (Yidic)10% | 1 | -1.4 | 2.3 |
| 45,X 22%/46,XY 4%/47,XYY 2%/46,X,IDIC(Y) 72% | 1 | -1.7 | 0.5 |
| 46,Xr(X) | 1 | -4 | 1.4 |
| 45,X/46,Xr(X) | 1 | -2.9 | -0.7 |
| 45,X/46,Xr | 1 | -0.9 | 1.6 |
| 45,X/46,Xr(X) | 1 | ND | 1.0 |

Tab. 10 Risultati della MLPA, nella seconda colonna è riportato il dosaggio del gene SHOX (1 per monosomia, 2 per Idiploidia); nelle altre due colonne i valori relativi al Δ SDS (TH-SF) e al SDST, in grigio i valori corrispondenti a pazienti non sottoposte a terapia con GH.

Dato il numero scarso di pazienti analizzate, non è stato possibile applicare un'elaborazione statistica ai dati, ma una valutazione è comunque possibile. In base ai valori della SDST, esclusi i tre casi in cui non è stata fatta terapia con GH, si osserva l'assenza di un'apparente associazione con il dosaggio del gene SHOX, che risulta monosomico in tutti i casi a parte uno per cui l' SDST è pari a 1.9, e non si discosta in modo evidente dai valori riportati nelle altre pazienti, compresi in un *range* che va da -0.7 a 3.9, con una media pari a 1.4. Mentre in base al valore del Δ SDSSF-TH si osserva in 2 casi un valore positivo (1.1 e 1.2), che sta a significare che la statura finale raggiunta è maggiore di quella prevista in base alla statura dei genitori e quella della popolazione femminile italiana normale. In uno di questi due casi il dosaggio del gene SHOX risulta normale.

In generale l'analisi tramite MLPA con le 25 sonde specifiche, comprendenti le 8 per il gene SHOX, ha mostrato un pattern sovrapponibile al cariotipo, e con una sensibilità maggiore di quella prevista (30%). Nelle seguenti figure 12, 13, 14 e 15 sono riportati alcuni

esempi che mostrano il dosaggio di tutte le 25 regioni nei casi più significativi.

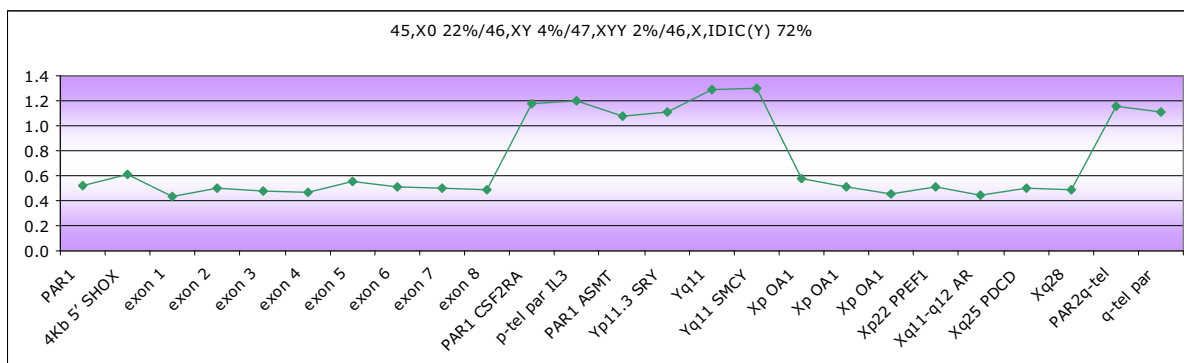


Fig. 12 Il dosaggio delle 25 regioni cromosomiche determinato tramite MLPA, mostra una monosomia per le regioni sul Xp/Yp fino al gene SHOX, una diploidia per la regione Xp/Yp fino al gene ASMT, una diploidia per tutte le regioni specifiche del cromosoma Y, una monosomia per tutte le regioni specifiche del cromosoma X, di nuovo una diploidia delle regioni qter della PAR2, in accordo con la presenza di un cromosoma Y isodicentrico nel cariotipo.

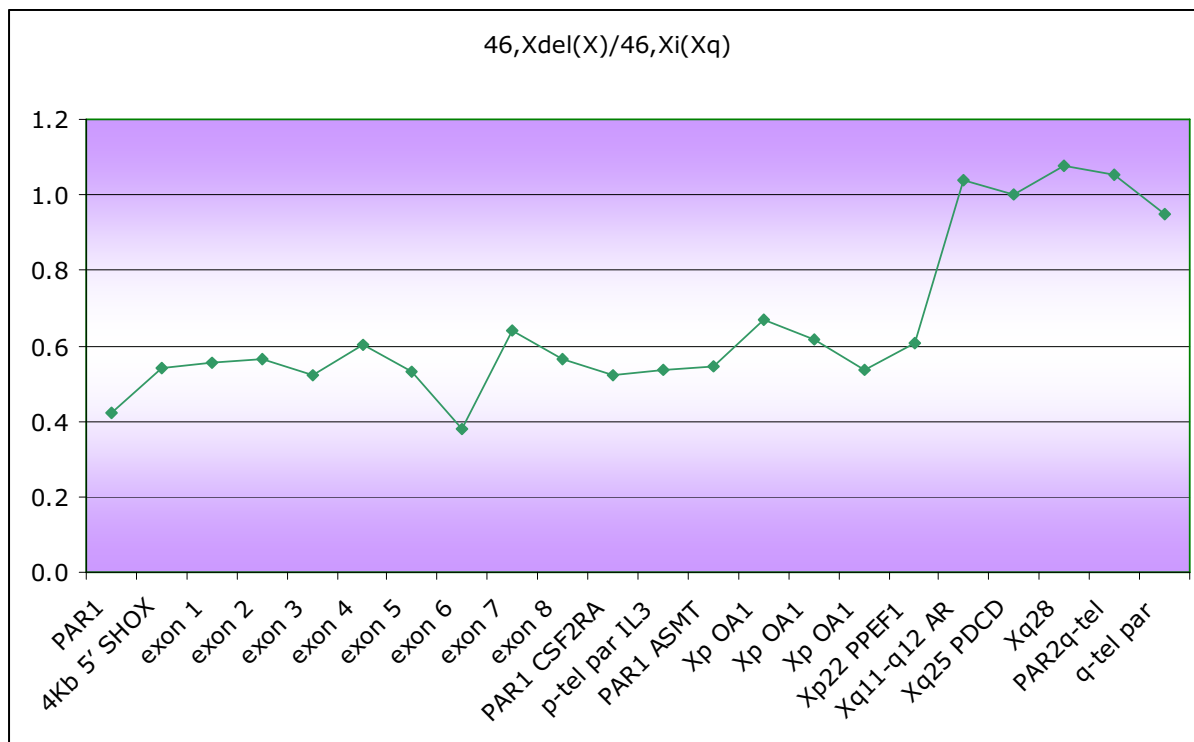


Fig. 13 Il dosaggio delle 25 regioni cromosomiche determinato tramite MLPA, mostra una monosomia per tutte le regioni sul Xp. Le regioni sul Xq risultano dipliodi in accordo con la presenza di un cromosoma X isodicentrico nel cariotipo.

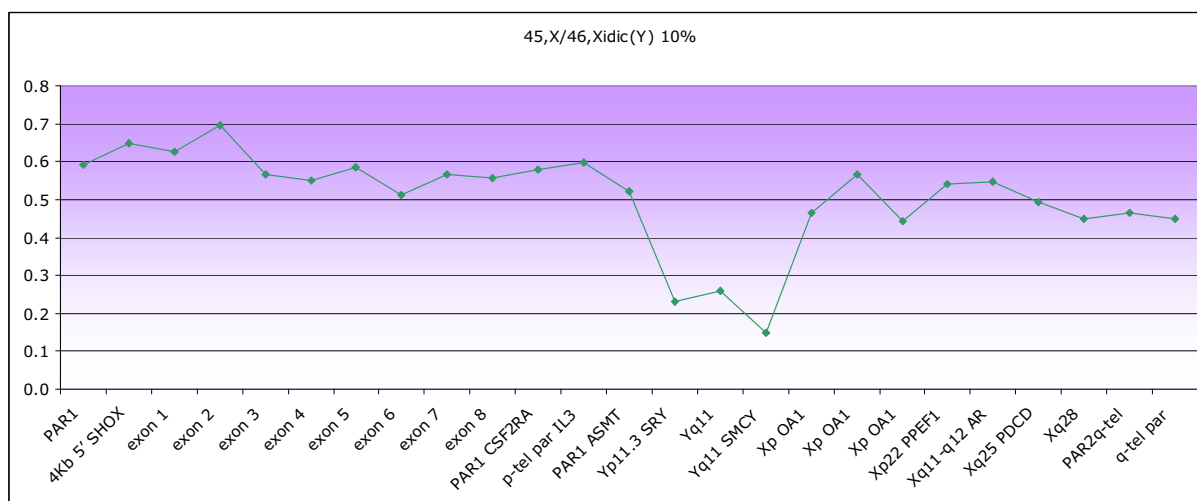


Fig. 14 Il dosaggio delle 25 regioni cromosomiche determinato tramite MLPA, mostra una monosomia per tutte le regioni analizzate. E' presente uno scarso segnale intorno a 0.2 per le regioni non pseudoautosomiche del cromosoma Y (Yp11.3, Yq11, Yq11), riferibili alla linea 46,Xidic(Y) presente al 10%.

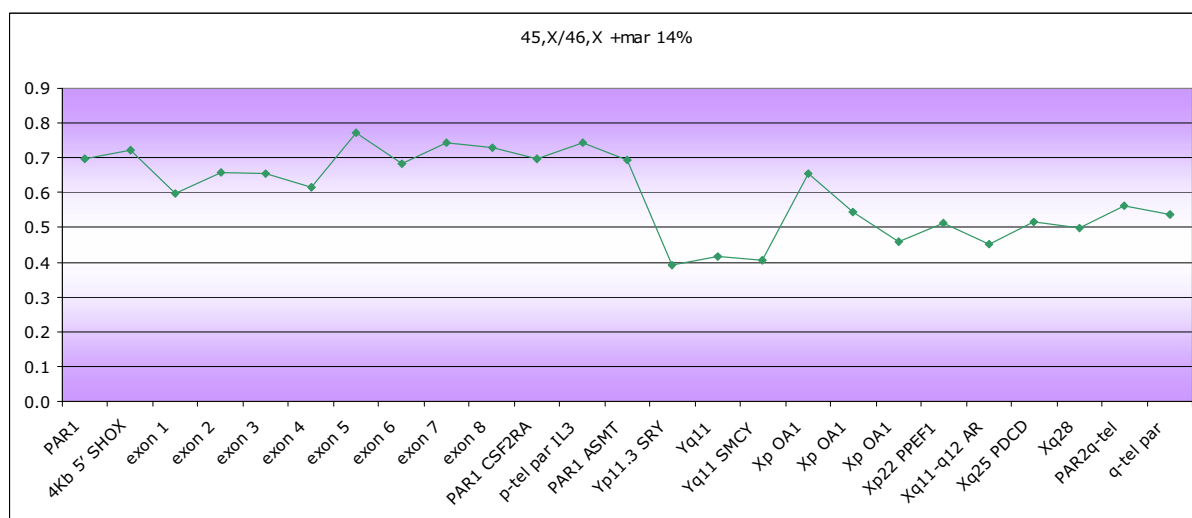


Fig. 15 Il dosaggio delle 25 regioni cromosomiche determinato tramite MLPA, mostra una monosomia per tutte le regioni sul Xp, anche se con un valore al di sopra di 0.5, probabilmente dovuto alla presenza di un marcatore nel cariotipo, che è riconducibile al parte del cromosoma Y come mostra un valore intorno a 0.4 per le regioni non pseudoautosomiche del cromosoma Y (Yp11.3, Yq11, Yq11). Le restanti regioni sono monosomiche.

4.3 GHR

L'analisi della delezione dell'esone 3 del GHR (Fig. 16), condotta su 76 pazienti che avevano conseguito la statura finale, ha riportato una frequenza del 51% per gli omozigoti normali fl/fl, del 46% per gli eterozigoti fl/d3 e del 3% per gli omozigoti deleti d3/d3. La presenza di una correlazione di tipo statistico tra i genotipi e la statura finale, espressa come Δ SDSSF-TH, Δ SDST e Δ SF-S0 è stata valutata solo per due genotipi (fl/fl, fl/d3), la frequenza del genotipo d3/d3 non è stata determinata per la scarsa presenza nelle pazienti analizzate 2/161, e quindi non è stato possibile includere questo genotipo nell'analisi.

L'analisi statistica non ha evidenziato la presenza di una correlazione significativa per nessuno dei due genotipi e i parametri considerati. In figura 17 è rappresentata la distribuzione dei 3 genotipi in relazione ai tre parametri.

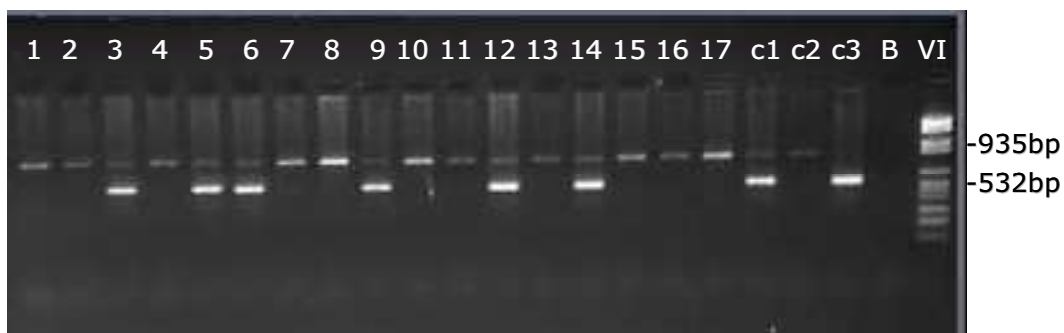


Fig. 16 Fotografia dell' elettroforesi su agarosio dei prodotti di PCR dell'esone 3 del GHR; c1 controllo eterozigote fl/d3, c2 controllo omozigote fl/fl, c3 controllo omozigote d3/d3.

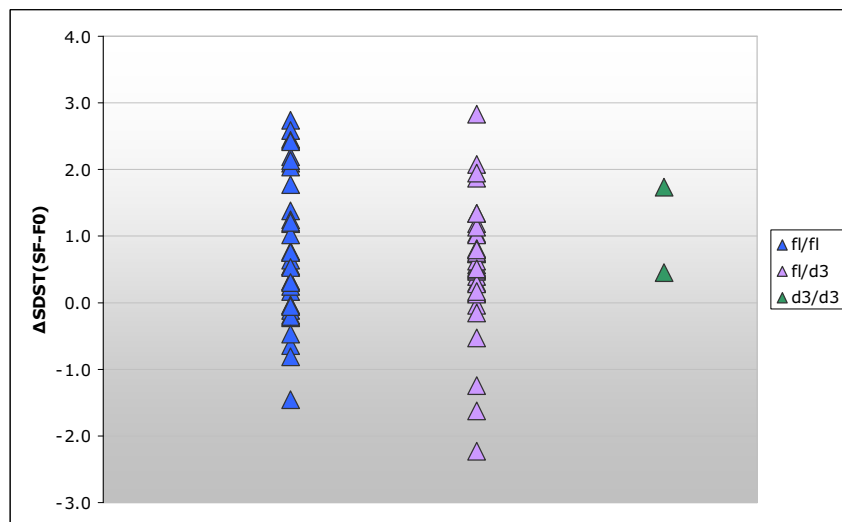
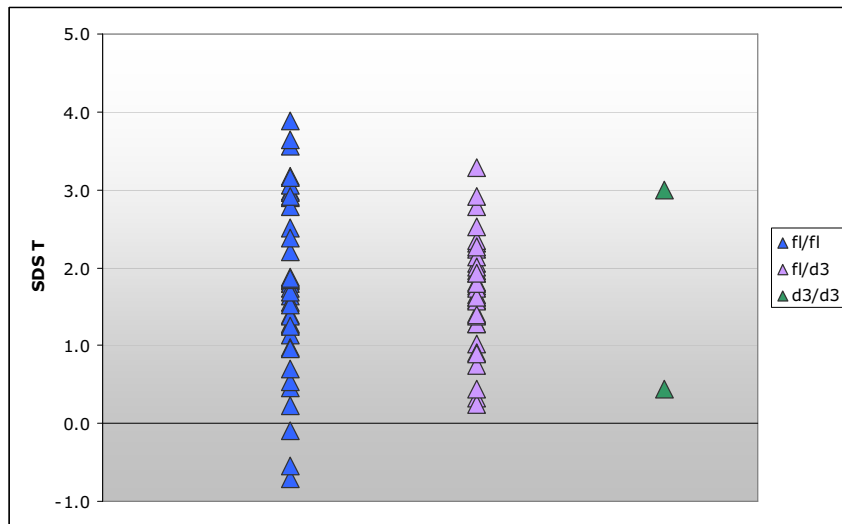
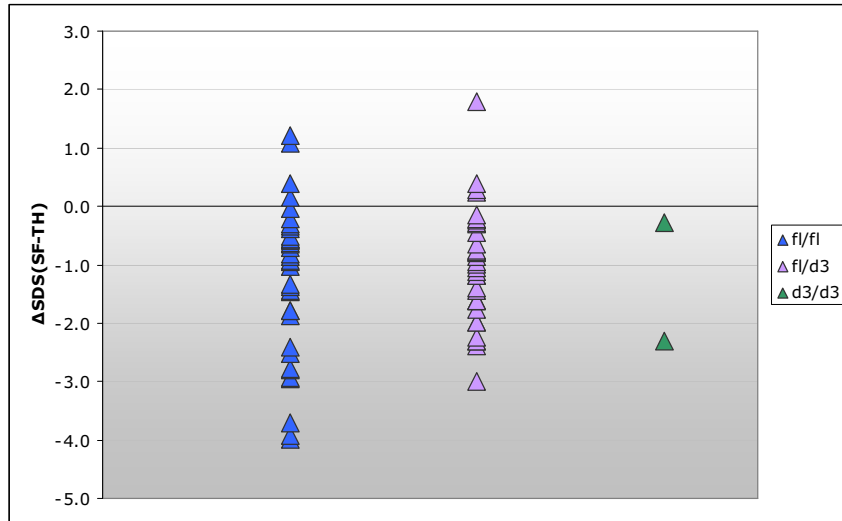


Fig. 17 Distribuzione dei genotipi fl/fl, fl/d3 e d3/d3 in realzione al Δ SDS(SF-TH), Δ SDST e Δ SDST(SF-S0) nelle pazienti analizzate.

5 DISCUSSIONE

E' noto che pazienti con UTS possono avere un cariotipo a mosaico con presenza del cromosoma Y normale o anormale o solo con frammenti di cromosoma Y. L'analisi del gene SRY e della regione DYZ3 condotta su 161 pazienti, ha evidenziato 8 casi in cui solo l'analisi molecolare è stata in grado d'individuare la presenza di regioni del cromosoma Y, 4 di questi presentavano un cariotipo 45,X. Dal momento che la presenza di regioni del cromosoma Y aumenta il rischio di gonadoblastoma dal 7 al 30% rispetto la popolazione generale, le pazienti positive vengono sottoposte a gonadectomia. Nella nostra casistica 4 pazienti presentavano gonadoblastoma, due di queste avevano un cariotipo 45,X, la presenza di regioni del cromosoma Y è stata successivamente confermata tramite FISH. Nella nostro gruppo di pazienti, la presenza di mosaicismo con il cromosoma Y ha una prevalenza del 7% paragonabile a quella riportata in letteratura [21] [22] , l'analisi molecolare ha portato questa prevalenza al 12%, il che implica che l'analisi tramite cariotipo standard perde il 5% dei casi Y positivi. Riteniamo che l'analisi molecolare di regioni del cromosoma Y sia un ottimo metodo da utilizzare per ovviare a questa perdita, sicuramente anche l'analisi tramite FISH garantisce una sensibilità paragonabile a quella della PCR classica, ma implica tempi e costi maggiori. Nella Fig. 18 viene riepilogata la nostra strategia diagnostica dal punto di vista genetico.

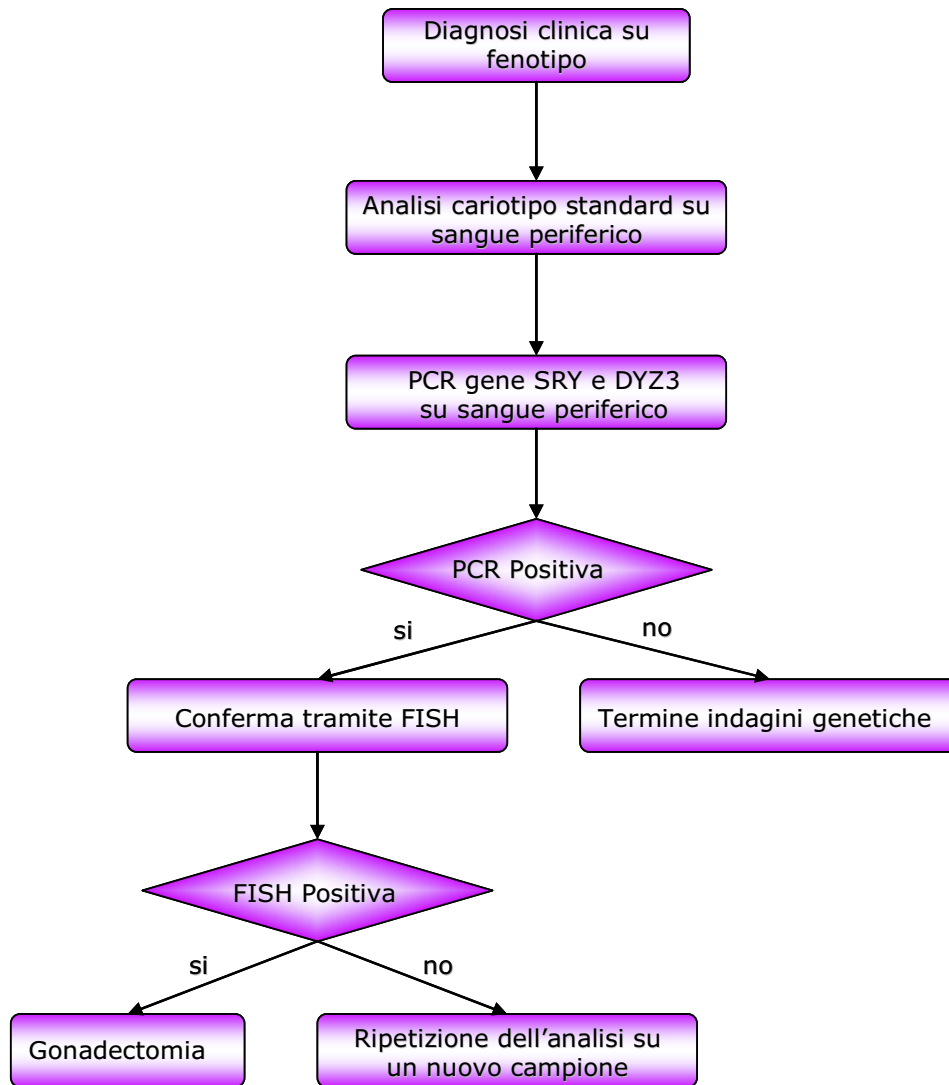


Fig. 18 Flusso relativo alla diagnostica molecolare nella UTS.

La gonadectomia, a fronte di una positività a regioni del cromosoma Y è un'opzione che, nonostante le incertezze dal punto di vista dell'eziopatogenesi e delle relazioni tra gonadoblastoma e presenza del cromosoma Y, i clinici suggeriscono, soprattutto per il rischio della degenerazione in neoplasia maligna delle cellule germinali [43]. In questo senso la genetica molecolare assume un ruolo importante, che è quello di offrire un tipo di analisi altamente sensibile e accurata, che sia in grado cioè di individuare la presenza del cromosoma Y anche in bassissime percentuali, e di poter valutare qualitativamente e quantitativamente questa presenza.

A questo scopo nuove tecniche, in particolare Realtime-PCR e QF-PCR, si stanno facendo strada e si prevede che presto sostituiranno la PCR classica anche nell'analisi di routine. Tali tecniche oltre che offrire una maggiore sensibilità rispetto la PCR standard, sono quantitative e danno quindi la possibilità di valutare quanto materiale del cromosoma Y è presente, fattore che potrebbe avere un certa rilevanza nella comparsa del gonadoblastoma. Oltre al tipo di tecnica utilizzata, altri fattori possono unirsi al miglioramento delle indagini genetiche, tra cui l'aumento del numero di marcatori che si possono anche amplificare insieme in multiplex PCR [44], e sicuramente la provenienza del DNA. Insieme a quello estratto da sangue periferico infatti, sarebbe molto utile avere DNA di diversa provenienza, come da cute e da capelli, che sono già utilizzati per l'analisi del cariotipo, ma anche da cellule epiteliali orali e dall'urina. In un interessante lavoro [45], sebbene utilizzando una tecnica ritenuta a rischio di falsi positivi [46] (nested-PCR), hanno valutato la presenza del gene TSPY su DNA da campioni di cellule epiteliali orali e urina in 29 pazienti con cariotipo 45,X. Hanno individuato una paziente positiva al gene TSPY alla nested PCR su DNA da cellule epiteliali orali, e cinque pazienti positive al gene TSPY alla nested PCR su DNA da urina. Recentemente un altro gruppo ha condotto l'analisi del gene SRY e della regione DYZ3 su 20 pazienti con cariotipo 45,X tramite PCR standard su DNA proveniente da sangue e da cellule epiteliali orali, individuando 7 pazienti positive [47], ovvero nel 35% dei casi, contro il 5,5% (4/63 45,X) della nostra casistica, e il 3% e il 3.6% di altre [21] [22].

Anche se questi risultati andrebbero replicati, utilizzando per esempio la realtime-PCR invece della nested-PCR, come suggeriscono gli autori, la possibilità di utilizzare DNA da urina o da cellule epiteliali orali è da considerare, anche per la facilità di ottenere campioni del genere.

Alla luce di quanto detto, proponiamo di migliorare la nostra strategia diagnostica, su tre punti: la provenienza del DNA, la tecnica molecolare, e l'uso di altri marcatori del cromosoma Y, come illustrato in Fig. 19.

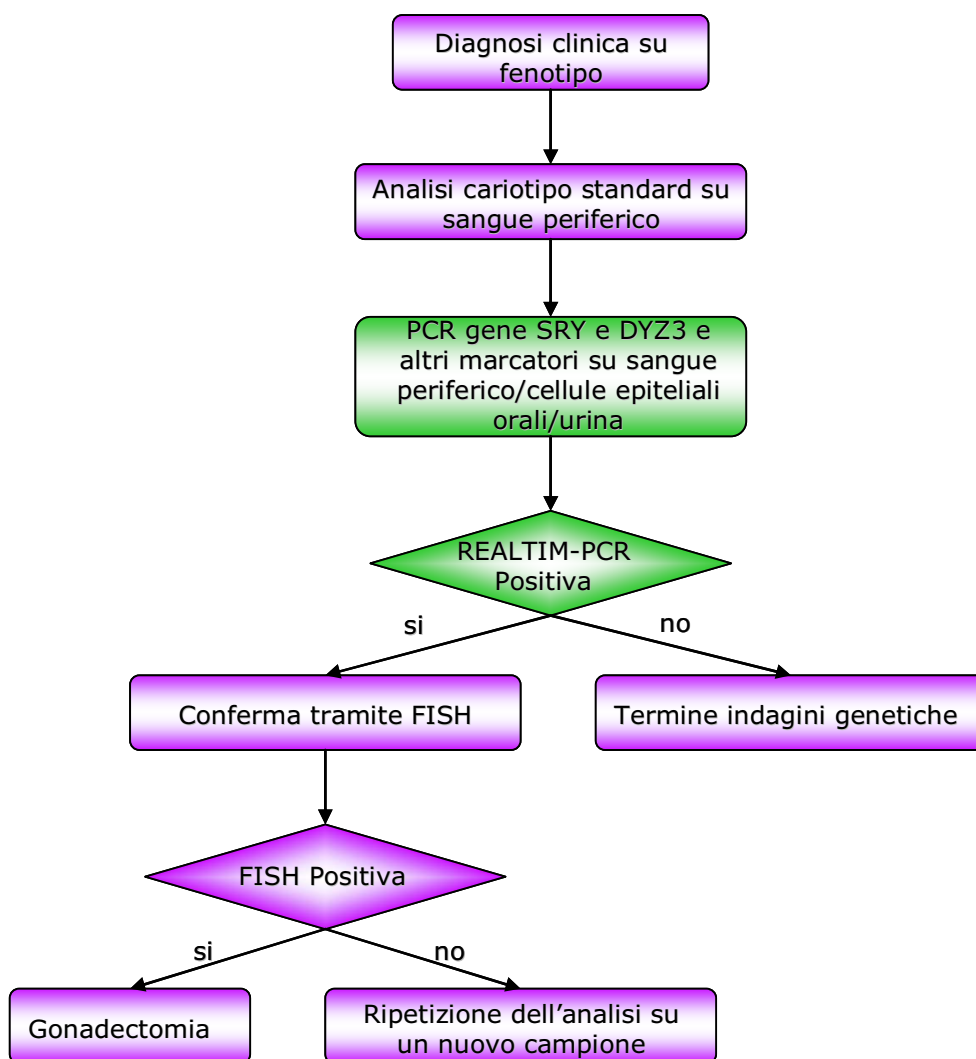


Fig. 19 Modificazioni proposte per il flusso relativo alla diagnostica molecolare nella UTS.

Dal punto di vista della ricerca clinica invece, quello che preme maggiormente sottolineare è una valutazione più approfondita della relazione cromosoma Y/gonadoblastoma. Infatti non tutte le regioni del cromosoma Y conferiscono rischio di gonadoblastoma, ma sebbene sia stato ipotizzato il locus, GBY, ancora non c'è un oncogene confermato. Il gene TSPY, che è il maggiore candidato, non può essere soggetto di analisi genetiche a livello genomico poiché la sua organizzazione in più locus e l'omologia del 99% tra i geni attivi non permette una PCR specifica, in alcuni laboratori viene comunque svolta l'analisi del gene

TSPY tramite PCR su DNA genomico, con un significato del tutto uguale all'analisi di altri marcatori. L'unica possibilità per comprendere il ruolo del gene TSPY è valutare la sua espressione, quindi spostare lo studio a livello del RNAm e della proteina. Per far questo è necessario ottenere campioni di tessuto con gonadoblastoma provenienti dalle gonadi asportate dai pazienti. Un recente studio [20] ha valutato l'espressione di 15 geni del cromosoma Y in un campione di gonadoblastoma e ha avuto un risultato positivo solo per il gene TSPY. Questo tipo di valutazione conferma l'importanza di questo gene nel gonadoblastoma, ma non dice nulla sul *pathway* della carcinogenesi di questa neoplasia. Questo tipo d'informazione richiede una valutazione molto più complessa, come la possibilità di analizzare insieme una quantità molto più ampia di dati di espressione offerta dall'analisi tramite microarray o DNChip. Stiamo collezionando campioni di tessuto proveniente da gonadoblastoma asportato in pazienti con UTS e 46,XY DSD, con l'intento di mettere a punto un'analisi dell'espressione del gene TSPY su più livelli come indicato in Fig. 20.

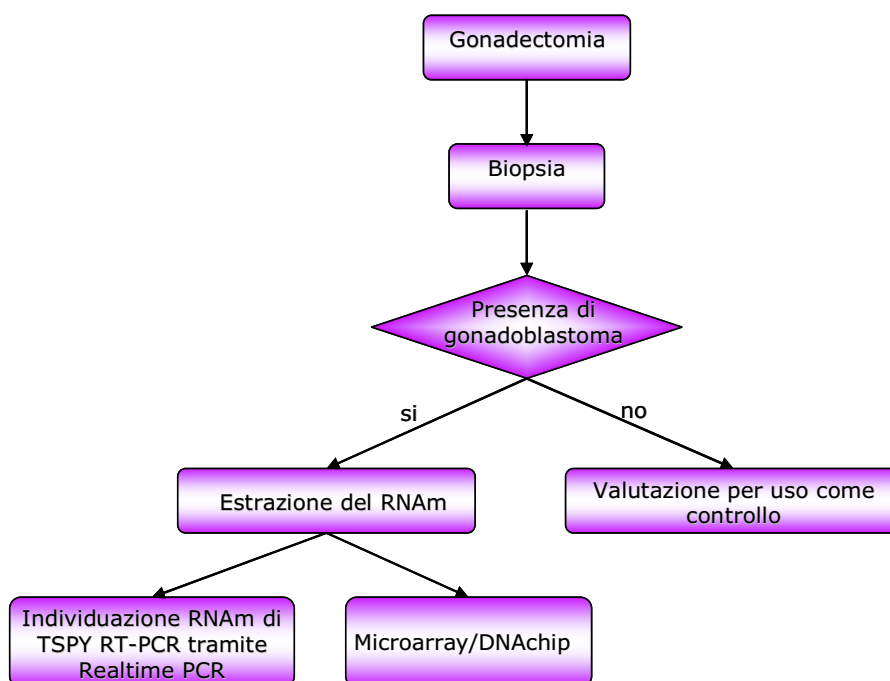


Fig. 20 Strategia proposta per l'analisi del profilo d'espressione del gonadoblastoma.

L'analisi tramite MLPA, condotta su una serie di pazienti con cariotipo a mosaico, che mostravano alterazioni del braccio corto del cromosoma X o Y, e che avevano raggiunto la statura finale, è stata fatta con lo scopo di valutare il dosaggio del gene SHOX. La presenza della diploidia per il gene SHOX è stata evidenziata in un caso, mentre in tutti gli altri, l'analisi ha evidenziato una condizione di monosomia.

In 2 casi si è osservato un valore positivo del Δ SDS(SF-TH) (1.1 e 1.2), che sta a significare che la statura finale raggiunta è maggiore di quella prevista, in base alla statura dei genitori e quella della popolazione femminile italiana normale. In uno di questi due casi il dosaggio del gene SHOX risulta normale, nell'altro è monosomico ma con un normale dosaggio di tutte le regioni analizzate in Xq. Un altro caso con un valore positivo (1.8) per Δ SDSSF-TH tra le 161 pazienti Turner, è stato individuato in una paziente con cariotipo 45,X, che non era stata inclusa nell'analisi tramite MLPA. In questa paziente, lo studio di mosaicismi nascosti potrebbe essere utile per chiarire se possa esserci una linea diversa da quella 45,X, ma la possibilità che in questa eventuale linea vi sia la presenza di due alleli del gene SHOX, è davvero remota, è più probabile che se è presente un contributo genetico sull'incremento della statura in questo caso, sia di tipo autosomico, o di tipo farmaco-genetico (risposta alla terapia con GH). Nell'unico caso trovato diploide per il gene SHOX, è sicuramente suggestivo pensare sia questo il motivo del raggiungimento di una statura finale maggiore di quella prevista, oltre alla terapia con GH ovviamente, ma un unico caso non permette altro che supposizioni. La mancata corrispondenza del risultato del MLPA con il cariotipo 46,del(Xp), richiede comunque una conferma, che è già in previsione tramite analisi di microsatelliti appena i genitori saranno disponibili per un prelievo di sangue.

In generale, per valutare la risposta al GH in relazione al dosaggio del gene SHOX, occorrerebbe un numero ampio di pazienti con SHOX in monodose, e con SHOX in bidose, ma tra i mosaici Turner questo tipo di condizione non è frequente, e la diversa percentuale delle linee a mosaico

complica ulteriormente questo tipo di valutazione. Ciò che è più significativo è il confronto in relazione alla risposta al GH le diverse casistiche che sono accomunate da un'aploinsufficienza del gene SHOX, come soggetti con UTS e con S. di Leri-Weill, come dimostra un lavoro recente di un gruppo tedesco [29]. In questo studio vengono confrontati tre gruppi di soggetti aploinsufficienti per il gene SHOX, uno con UTS trattato con terapia con GH, uno con bassa statura trattato con terapia con GH, uno con bassa statura non trattato con terapia con GH; i risultati dimostrano che i due gruppi trattati rispondono in modo sovrapponibile alla terapia con GH, anche se i soggetti con UTS mostrano una statura inferiore rispetto al gruppo non UTS. Questo risultato sottolinea che l'aploinsufficienza del gene SHOX non è l'unica causa della bassa statura nella UTS.

In generale l'analisi tramite MLPA con le 25 sonde specifiche, comprendenti le 8 per il gene SHOX, ha mostrato un *pattern* sovrapponibile al cariotipo, e con una sensibilità maggiore di quella prevista (30%), tuttavia questo tipo di tecnica è ancora in fase di sperimentazione e richiede la replica dei risultati con un altro metodo. L'analisi tramite microsatelliti o la determinazione di SNPs specifici del cromosoma X e Y tramite minisequencing, sono entrambe possibili nel nostro laboratorio, e possono essere utili non solo nella valutazione del dosaggio del gene SHOX, ma anche per una genotipizzazione compensativa dell'analisi citogenetica. Questo tipo di analisi è già stata effettuata su pazienti con UTS tramite genotipizzazione di SNPs (22 sul cromosoma X e 8 sul cromosoma Y) con Pyrosequencing, e i risultati mostrano una buona sovrapposizione con l'analisi citogenetica [25]. La possibilità che offrono queste tecniche, è quella di aumentare la risoluzione rispetto l'analisi del cariotipo, in modo più veloce e più economico dell'analisi tramite FISH, offrendo una sorta di lente d'ingrandimento che potrebbe rendere possibile l'individuazione di

associazioni fra ristrette regioni cromosomiche o addirittura di singoli geni e specifici aspetti fenotipici della Sindrome di Turner.

L'analisi della delezione dell' esone 3 del GHR condotta su 76 pazienti, selezionate tra le 162 per aver raggiunto la statura finale ed essere state sottoposte a terapia con GH, non ha evidenziato la presenza di una correlazione significativa per nessuno dei due genotipi e la statura finale, come evidenziato già in letteratura. Purtroppo la frequenza degli omozigoti d3/d3 è risultata troppo bassa per una valutazione di tipo statistico, man mano che saranno disponibili i dati relativi alla statura finale per altre pazienti, si prevede che tale frequenza aumenti in modo da permettere il calcolo della correlazione. Nel frattempo è comunque possibile fare una correlazione tra la velocità di crescita durante il primo anno di terapia con GH e i tre genotipi. Per far questo non è necessario attendere che le pazienti raggiungano la statura finale, il calcolo della velocità di crescita è possibile secondo la formula riportata da Ranke [48], in particolare per la UTS:

$$\begin{aligned} &\text{Cm di crescita durante 1 anno di terapia=} \\ &8.1+[2.2 \times \text{rhGH dose (ln;IU/kg}\cdot\text{wk)}]+[-0.3 \times \text{età alla diagnosi dose} \\ &(\text{yr})]+ [0.4 \times \text{peso SDS}]+ [-0.2 \times (\text{altezza SDS} - \text{MPH SDS})]+ [0.4 \times \\ &\text{numero di iniezioni alla settimana}]+ [1.6 \times (\text{oxandrolone}=1;\text{no} \\ &\text{oxandrolone}=0)] \end{aligned}$$

Dove MPH= altezza media parentale

Lo stesso gruppo di Ranke, ha condotto uno studio di associazione, in cui la velocità di crescita è stata correlata ai tre genotipi possibili fl/fl, fl/d3, d3/d3 in due casistiche di pazienti, una con UTS, una con SGA (*small for gestational age*); in entrambi i gruppi è stata riscontrata una correlazione significativamente positiva con il genotipo d3/d3 .

6 PROSPETTIVE

I risultati dell'analisi del gene SRY e della regione DYZ3, condotta nelle 162 pazienti con UTS ha confermato l'importanza di eseguire lo *screening* di regioni del cromosoma Y in tutte le pazienti con UTS, tuttavia ci sono molti aspetti migliorabili nella strategia diagnostica, tra cui ci preme di sottolineare:

- L'uso di altre fonti da cui estrarre il DNA, come le cellule epiteliali orali.
- L'uso di una tecnica quantitativa (Realtime-PCR) invece della normale PCR per lo *screening* di regioni del cromosoma Y.
- L'aumento del numero di markers utilizzati.

Dal punto di vista della ricerca applicata, sicuramente una valutazione del profilo d'espressione del gene TSPY, e meglio ancora del trascrittoma nel gonadoblastoma, rappresenta un traguardo ambizioso che richiederà lungo tempo, ma di cui sottolineiamo l'importanza per l'entità delle informazioni che un tipo di progetto come questo può portare; diversamente, altri programmi possono più facilmente essere attuati, anche per il tipo di strumentazione richiesta, che sono:

La realizzazione dell'analisi tramite MLPA nel resto delle pazienti, che sarà affiancata dall'analisi dei microsatelliti, ed eventualmente da una genotipizzazione tramite SNPs.

- L'analisi dei microsatelliti finalizzata alla determinazione dell'origine parentale del cromosoma X nelle pazienti con cariotipo 45,X0; per una valutazione in relazione ai parametri clinici (statura, eventuale ritardo mentale).
- Lo studio dello stato di metilazione del cromosoma X nelle pazienti con cariotipo 45,X0.

- Il compimento dell'analisi della delezione dell'esone 3 del GHR in tutta la casistica, da valutare in relazione alla velocità di crescita nel primo anno di terapia con GH.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Alessandro Cicognani, direttore dell'Unita Operativa di Pediatria, per la fiducia affidatami e gli investimenti fatti per la realizzazione di questi studi, la Prof.ssa Laura Mazzanti che dirige l'ambulatorio di auxologia e ha fornito tutta la casistica, per avermi assistito nell'elaborazione dei dati clinici insieme al suo staff in particolare alla Dr.ssa Emanuela Scarano; la Dr.ssa Lilia Baldazzi referente del laboratorio di Genetica Molecolare dove lavoro, che mi ha sostenuto e lasciato piena autonomia, e tutto il personale del laboratorio per la grande collaborazione che mi hanno offerto, D.ssa Soara Menabò, Sig. Giuseppe Cangemi e Sig. Maurizio Maccaferri. Ringrazio inoltre la Dr.ssa Eleonora Zampiga per l'aiuto nell'elaborazione statistica.

7 BIBLIOGRAFIA

- [1] Sybert PV and McCauley E. Turner's Syndrome. The New England J Medicine 2004; 351(12):1227-1238.
- [2] Bondy CA. Turner's Syndrome and X Chromosome-Based Differences in Disease Susceptibility. Gender Medicine 2006; 3:18-30.
- [3] Mazzanti L, Cacciari E. Congenital heart disease in patients with Turner's syndrome. Italian Study Group for Turner Syndrome (ISGTS). J Pediatr. 1998;133(5):688-92.
- [4] Hunt PA. Meiosis in mammals: recombination, non-disjunction and the environment. Biochemical Society Transactions 2006; 34 part 4: 574-577.
- [5] Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Firschauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 1990; 346: 240-244.
- [6] 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.
- [7] Werner MH, Huth JR, Gronenborn AM and Clore GM. Molecular basis of human 46,XY sex reversal revealed from the three-

dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell* 1995; 81: 705-714.

- [8] Takagi A, Imai A, Tamaya T. A novel sex-determining region on Y (SRY) nonsense mutation identified in a 45,X/47,XYY female. *Fertil Steril.* 1999; 72(1):167-9.
- [9] Canto P, de la Chesnaye E, Lopez M, Cervantes A, Chavez B, Vilchis F, Reyes E, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S, Mendez JP. A mutation in the 5' non-high mobility group box region of the SRY gene in patients with Turner syndrome and Y mosaicism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(5):1908-11.
- [10] Fernandez R, Marchal JA, Sanchez A, Pasaro E. A point mutation, R59G, within the HMG-SRY box in a female 45,X/46,X,psu dic(Y)(pter-->q11::q11-->pter). *Hum Genet* 2002; 111(3):242-246.
- [11] Shahid M, Dhillon VS, Aslam M, Husain SA. Three new novel point mutations localized within and downstream of high-mobility group-box region in SRY gene in three Indian females with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(4): 2429-2435.
- [12] Page DC. Hypothesis: a Y-chromosome gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development* 1987; 101 Suppl: 151-155.

- [13] Lau YFC SEX CHROMOSOME GENTICS '99. Gonadoblastoma, Testicular and Prostate Cancer , and the TSPY gene. Am J Hum Genet 1999; 64: 921-927.
- [14] Arnemann J , Jakubiczka S, Thüring S, Schmidtke J. Cloning and sequence analysis of a human Y-chromosome-derived, testicular cDNA, TSPY. Genomics 1991; 11: 108-114.
- [15] Schnieders F, Dork T, Arnemann J, Vogel T, Werner M, Schmidtke J. Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. Hum Mol Genet 1996; 5(11):1801-1807.
- [16] Lahn BT e Page DC. Functional coherence of the Human Y Chromosome. Science 1997; 278: 675-680.
- [17] Manz E, Schnieders F, Brechlin AM, Schmidtke J. TSPY-related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutive elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y chromosome. Genomics 1993; 17:726-731.
- [18] Dechend F, Williams G, Skawran B, Schubert S, Krawczak M, Tyler-Smith C, Schmidtke J. TSPY variants in six loci on the human Y chromosome. Cytogenet Cell Genet 2000; 91: 67-71.
- [19] Krick R, Jakubiczka S, Arnemann J. Expression, alternative splicing and haplotype analysis of transcribed testis specific protein (TSPY) genes. Gene 2003; 302: 11-19.

- [20] Su MT, Lee IW, Kuo PL. Presence of TSPY transcript and absence of transcripts of other Y chromosomal genes in a case of microscopic gonadoblastoma. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 357-360.
- [21] Gravholt CH, Fedder J, Naeraa RW, Müller J. Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: A population study. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3199–3202.
- [22] Alvarez-Nava F, Soto M, Sanchez MA, Fernandez E, Lanes R. Molecular analysis in Turner Syndrome. *J Pediatr* 2003; 142: 336–340.
- [23] Mazzanti L, Cicognani A, Baldazzi L,2 Bergamaschi R, Scarano E, Strocchi S, Nicoletti A, Mencarelli F, Pittalis M, Forabosco A and Cacciari E. Gonadoblastoma in Turner Syndrome and Y-Chromosome-Derived Material. *American J Med Genet* 2005; 135 A: 150–154.
- [24] Vodicka R, Vrtel R, Scheinost O, Zapletalova J, Dusek L, Marie G, Santavy J. Refined quantitative fluorescent PCR of Y-chromosome DNA sequences mosaics in Turner's syndrome patients--alternative to real-time PCR. *J Biochem Biophys Methods* 2004; 60: 151-162.
- [25] Meng H, Hager K, Rivkees SA, Gruen JR. Detection of Turner syndrome using high-throughput quantitative genotyping. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(6): 3419-3422.

- [26] Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S, Winkelmann M, Nordsiek G, Heinrich U, Breuning MH, Ranke MB, Rosenthal A, Ogata T, Rappold GA. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nature Genet* 1997; 17: 54-63.
- [27] Ellison JW, Wardak Z, Young MF, Gehron Robey P, Laig-Webster M, Chiong W. PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome. *Hum Mol Genet* 1997; 6(8): 1341-1347.
- [28] Wolberger C, Vershon AK, Liu B, Johnson AD, Pabo CO. Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* 1991; 67:517-528.
- [29] Blum WF, Crowe BJ, Quigley CA, Jung H, Cao D, Ross JL, Braun L, Rappold G; SHOX Study Group. Growth hormone is effective in treatment of short stature associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: Two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(1): 219-228.
- [30] Gravholt CH, Chen JW, Oxvig C, Overgaard MT, Christiansen JS, Frystyk J, Flyvbjerg A. The GH-IGF-IGFBP axis is changed in Turner syndrome: partial normalization by HRT. *Growth Hormone & IGF Res* 2006; 16: 332-339.

- [31] Barton DE, Foellmer BE, Wood WI, Francke U. Chromosome mapping of the growth hormone receptor gene in man and mouse. *Cytogenet Cell Genet* 1989; 50: 137-141.
- [32] Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR, Galgani JP, Hellmiss R, Keret R, Rotwein PS, Parks JS, Laron Z, Wood WI. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 8083-8087.
- [33] Pantel J, Machinis K, Sobrier ML, Duquesnoy P, Goossens M, Amselem S. Species-specific alternative splice mimicry at the growth hormone receptor locus revealed by the lineage of retroelements during primate evolution. *J Biochem Chem* 2000; 275 (25): 18664-18669.
- [34] Audi L, Esteban C, Carrascosa A, Espadero R, Perez-Arroyo A, Arjona R, Clemente M, Wollmann H, Fryklund L, Parodi LA; Spanish SGA Study Group. Exon 3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism genotype frequencies in Spanish short small-for-gestational-age (SGA) children and adolescents (n = 247) and in an adult control population (n = 289) show increased fl/fl in short SGA. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(12):5038-43.
- [35] Jorge AA, Marchisotti FG, Montenegro LR, Carvalho LR, Mendonca BB, Arnhold IJ. Growth hormone (GH) pharmacogenetics: influence of GH receptor exon 3 retention or deletion on first-year growth response and final height in patients with severe GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):1076-80.

- [36] Binder G, Baur F, Schweizer R, Ranke MB. The d3-growth hormone (GH) receptor polymorphism is associated with increased responsiveness to GH in Turner syndrome and short small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(2): 659-664.
- [37] Carrascosa A, Esteban C, Espadero R, Fernandez-Cancio M, Andaluz P, Clemente M, Audi L, Wollmann H, Fryklund L, Parodi L; Spanish SGA Study Group. The d3/fl-growth hormone (GH) receptor polymorphism does not influence the effect of GH treatment (66 microg/kg per day) or the spontaneous growth in short non-GH-deficient small-for-gestational-age children: results from a two-year controlled prospective study in 170 Spanish patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(9):3281-6.
- [38] Jorge AA, Marchisotti FG, Montenegro LR, Carvalho LR, Mendonca BB, Arnhold IJ. Growth hormone (GH) pharmacogenetics: influence of GH receptor exon 3 retention or deletion on first-year growth response and final height in patients with severe GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(3):1076-80.
- [39] Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougneres P. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone *Nat Genet* 2004; 36:720-724.
- [40] Gruppo Italiano di Studio della Sindrome di Turner G.I.S.S.T. Elaborazione statistica: S.Milani.

- [41] Affara NA, Chalmers IJ, Ferguson-Smith MA. Analysis of the SRY gene in 22 sex-reversed XY females identifies four new point mutations in the conserved DNA binding domain. *Hum Mol Genet* 1993; 2:785-789.
- [42] Warburton PE, Greig GM, Haaf T, Willard HF. PCR amplification of chromosome specific alpha satellite DNA: Definition of centromeric STS markers and polymorphic analysis. *Genomics* 1991; 11:325-333.
- [43] Bondy CA for the Turner Syndrome Consensus Study Group. Care of Girls and Women with Turner Syndrome: A Guideline of the Turner Syndrome Study Group. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 2007;92(1):10-25.
- [44] Pelotti S, Bini C, Ceccardi S, Ferri G, Abbondanza A, Greggio NA, Ponzano E, Caenazzo L. Sex Chromosome analysis in Turner Syndrome by a pentaplex PCR assay. *Genet Test* 2003; 7(3): 245-247.
- [45] Bartmann AK, Ramos ES, Caetano LC, Rios AF, Vila RA. TSPY detection in blood, buccal, and urine cells of patients with 45,X karyotype. *Am J Med Genet A.* 2004 15;130(3):320-1.
- [46] Nishi MY, Domenice S, Medeiros MA, Mendonca BB, Billerbeck AE. Detection of Y-specific sequences in 122 patients with Turner syndrome: nested PCR is not a reliable method. *Am J Med Genet.* 2002 Feb 1;107(4):299-305.

- [47] Bianco B, Lipay MV, Melaragno MI, Guedes AD, Verreschi IT. Detection of hidden Y mosaicism in Turner's syndrome: importance in the prevention of gonadoblastoma. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006;19(9):1113-7.
- [48] Ranke MB, Lindberg A, Chatelain P, Wilton P, Cutfield W, Albertsson-Wikland K, Price DA; KIGS International Board. Kabi International Growth Study. Prediction of long-term response to recombinant human growth hormone in Turner syndrome: development and validation of mathematical models. KIGS International Board. Kabi International Growth Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(11):4212-8.