



BMP15-Mutationen bei XX-Gonadendysgenesien und POF



Susanne Ledig¹, Sibylle Jakubiczka¹, Gabriele Häusler², Bernd Hinney³ and Peter Wieacker¹

¹Institut für Humangenetik, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg, Deutschland; ²Klinische Abteilung für Allgemeine Pädiatrie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde, AKH Wien, Österreich; ³Universitäts-Frauenklinik Göttingen, Deutschland

Einleitung

Der Begriff "prämaures Ovarialversagen" (POF) umfasst eine Vielzahl von Erkrankungen, die durch eine hypergonadotrope Amenorrhoe vor dem 40. Lebensjahr charakterisiert sind. Obwohl ca. 1% der Frauen betroffen ist, ist die Ätiologie des POF bis heute wenig verstanden. In Finnland wurden homozygote oder compound heterozygote Mutationen im FSHR (follicle stimulating hormone receptor)-Gen als genetische Ursache für ovarielle Dysgenesien bei Frauen mit XX-Karyotyp nachgewiesen. In anderen Ländern scheinen Mutationen im FSHR-Gen jedoch eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Zwei Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, das X-chromosomal lokalisierte BMP15 (bone morphogenetic protein-15) und sein autosomales Paralog GDF9 (growth differentiation factor-9), spielen eine essentielle Rolle bei der frühen Follikulogenese des Menschen und des Schafs [Galloway, 2000; Di Pasquale, 2004]. Bei beiden handelt es sich um von Oocyten sezernierte Faktoren, die als Granulosazell (GC)-Mitogene die Proliferation vom primären bis zum FSH-abhängigen Stadium fördern [Elvin, 1999; Otsuka, 2000]. BMP15 und GDF9 werden ebenso wie andere Mitglieder der TGF- β -Superfamilie als Präproproteine translatiert. Diese bestehen aus einem kurzen Signalpeptid, einer langen Proregion und einer sehr kurzen reifen Proteinregion [McPherron, 1993; Dube, 1998]. Die Prodomäne ist für die Dimerisierung und die anschließende posttranslationelle Prozessierung zum biologisch aktiven, dimeren Protein von Bedeutung.

Vor kurzem wurde eine heterozygote Mutation in der Proregion des BMP15-Gens zweier italienischer Schwestern mit hypergonadotroper Ovarialinsuffizienz nachgewiesen [Di Pasquale, 2004]. Als Träger dieser Mutation wurde der gesunde Vater der Mädchen identifiziert. Funktionelle Tests zeigten, daß das mutierte Protein mit einer verminderten GC-Proliferation assoziiert war, welche eventuell auf eine durch die Mutation verursachte veränderte Prozessierung des Proteins zurückzuführen ist.

Patienten

Bei Patientin 1 handelt es sich um eine 25 Jahre alte Frau mit hypergonadotroper Ovarialinsuffizienz bei einem XX-Karyotyp. Im Alter von 16 Jahren traten leichte Schmierblutungen auf. Histologische Untersuchungen der Ovarien ergaben zwar regelrechtes Ovargewebe ohne Entzündungszeichen, jedoch wurden hauptsächlich Primär- und Primordialfollikel, wenige Sekundärfollikel und nur ein früher Tertiärfollikel nachgewiesen. Die Schwester der Patientin ist nicht betroffen.

In der zweiten Familie sind zwei Schwestern erkrankt: Patientin 2 hat eine Oligomenorrhoe, während bei ihrer Schwester, Patientin 3, eine sekundäre Amenorrhoe auftrat. Die Mutter der Schwestern ist nicht betroffen. DNA des Vaters war nicht verfügbar.

Methoden

Die DNA wurde aus peripheren Blut-Leukozyten isoliert [Miller, 1988]. Für die PCR wurden ca. 200 ng DNA in einem Volumen von 60 μ l und Primer, die spezifisch für die kodierenden Bereiche des FSHR- und BMP15-Gens sind, eingesetzt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden mittels direkter Sequenzierung (Dyanamic ET Terminator Kit, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) auf dem Megabace 500 (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) untersucht.

Resultate

a) FSHR Mutationsanalyse

Durch die Mutationsanalyse des FSHR-Gens wurde bei Patientin 1 eine bereits beschriebene heterozygote Mutation im Exon 6 (Ile160Thr) nachgewiesen, durch welche die Oberflächenexpression des Proteins beeinträchtigt wird [Beau, 1998]. Jedoch wurde bei der nicht betroffenen Schwester von Patientin 1 dieselbe Mutation gefunden, die von dem Vater der Schwestern vererbt wurde (Abb. 1).

Bei Patientin 2 und 3 wurde ein heterozygoter Polymorphismus (c.-29G>A) in der Promoterregion des FSHR-Gens nachgewiesen.

Da das Vorliegen einer heterozygoten Mutation im FSHR-Gen keine hinreichende Erklärung für vorzeitiges Ovarialversagen darstellt [Beau, 1998], wurde eine Mutationsanalyse des BMP15-Gens durchgeführt.

b) BMP15 Mutationsanalyse

Im BMP15-Gen von Patientin 1 und 2 wurde dieselbe heterozygote Substitution (Ala180Thr) identifiziert (Abb. 1), durch die eine β -Faltblattstruktur in der Proregion des Proteins verändert wird. Dieser Austausch wurde vor kurzem im Zusammenhang mit POF beschrieben [Di Pasquale, 2006].

Bei Patientin 3 konnte jedoch keine Sequenzveränderung im BMP15-Gen nachgewiesen werden (Abb. 2).

Bei 19 weiteren Patientinnen mit vorzeitiger Ovarialinsuffizienz und einem XX-Karyotyp konnte keine Sequenzveränderung im BMP15-Gen festgestellt werden.

Da in beiden Familien die jeweilige Mutter als Überträgerin der BMP15-Sequenzveränderung identifiziert wurde (Abb. 2), können wir hiermit heterozygote Mutationen als alleinige Ursache für POF ausschließen. Unterstützt wird diese Aussage dadurch, daß die nicht betroffene Schwester von Patientin 1 ebenfalls für dieselben Mutationen im FSHR-, bzw. BMP15-Gen heterozygot ist.

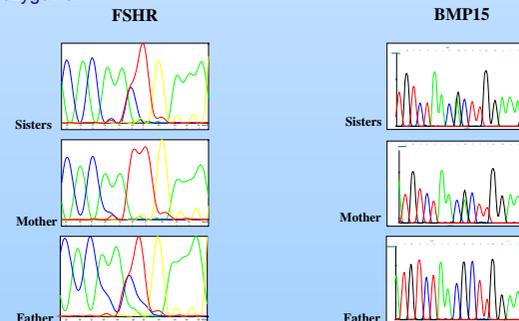


Abb. 1 Sequenzanalyse bei Patientin 1. Sequenzanalyse des FSHR- und BMP15-Gens bei Patientin 1, ihrer nicht betroffenen Schwester und ihren Eltern. Die Mutationsanalyse ergab eine heterozygote Transition von T zu C an Basenposition 479 im FSHR-Gen und eine heterozygote Transition von G zu A an Basenposition 538 im X-gekoppelten BMP15-Gen. Die nicht betroffene Schwester von Patientin 1 hatte denselben Genotyp. Während die Mutter sich als Trägerin der heterozygoten BMP15-Sequenzveränderung herausstellte, wurde die heterozygote Mutation im FSHR-Gen durch den Vater vererbt.

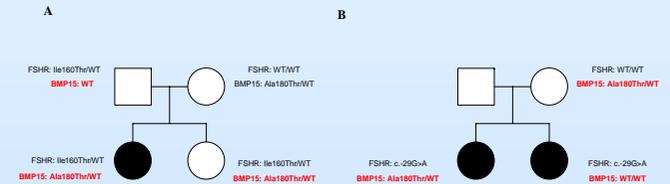


Abb. 2 Stammbäume der Patientinnen. A, Stammbaum von Patientin 1. Die Patientin stelle sich mit vorzeitiger Ovarialinsuffizienz vor, während alle anderen Familienmitglieder nicht betroffen sind. B, Stammbaum von Patientin 2 und 3. Während Patientin 2 eine Oligomenorrhoe hat, leidet Patientin 3 an einer sekundären Amenorrhoe.

Schlussfolgerungen

Im Gegensatz zur aktuellen Literatur sind wir der Meinung, daß heterozygote Mutationen im X-chromosomalen BMP15-Gen für die Entstehung einer vorzeitigen Ovarialinsuffizienz nicht ausreichen können. Eventuell bewirkt der Aminosäureaustausch Ala180Thr im BMP15-Protein eine Verminderung seiner proliferativen Wirkung auf Granulosazellen. Es ist denkbar, daß dieser Effekt bei Patientin 1 durch eine verringerte FSHR-Expression der Granulosazellen, verursacht durch die Mutation Ile160Thr, verstärkt wird.

Im Fall von Patient 2 und 3 sind Mutationen in anderen Genen, die für die Follikulogenese von Bedeutung sind, sehr wahrscheinlich.

Literaturachweis

Beau, I, Touraine P, Meduri G, Gougeon A, Desroches A., Matuchansky C, Milgrom E, Kuttann F, Mierah M. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *J Clin Invest* 1998; 102:1352-9.
Di Pasquale, E., Beck-Peccoz P, Persani L: Hypergonadotrope ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 2004 75:106-11.
Di Pasquale E, Rosetti R, Marozzi A, Bodega B, Borgato S, Cavallo L, Einaudi S, Radetti G, Russo G, Sacco M, Wasniewska M, Cole T, Beck-Peccoz P, Nelson LM, Persani L: Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1976-9
Dube, JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM: The bone morphogenetic protein is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endo* 1998; 12:1809-17.

Elvin, JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM: Paracrine actions of growth differentiation factor-9in the mammalian ovary. *Mol Endo* 1999; 13:1035-48.
Galloway, S.M., McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luuro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O: Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000 25:279-83.
Miller, SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
McPherron, AC, Lee SJ: GDF-3 and GDF-9: two novel members of the transforming growth factor- β superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 1993; 268:3444-9
Otsuka, F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S: Bone morphogenetic protein-15: Identification of target cells and biological function. *J Biol Chem* 2000; 275: 39523-8.

Corresponding author:

Dr. Susanne Ledig
Institut für Humangenetik
Otto-von-Guericke-Universität
Leipzig, Str. 44
D-39120 Magdeburg

Tel: +49 - 391 - 6715342
FAX: + 49 - 391 - 6715066
e-mail: susanne.ledig@medizin.uni-magdeburg.de