

Il ruolo di WNT4 nella genesi delle malformazioni mulleriane: rassegna della letteratura

M. PELLEGRINO, R. MAIORINO, S. SCHONAUER

RIASSUNTO: Il ruolo di WNT4 nella genesi delle malformazioni mulleriane: rassegna della letteratura.

M. PELLEGRINO, R. MAIORINO, S. SCHONAUER

Il presente lavoro si propone di analizzare il meccanismo di azione biologico del gene WNT4, alla luce delle sue implicazioni genetiche nell'ambito della patologia malformativa ginecologica. Dai recenti studi emerge il fondamentale ruolo svolto dal suo prodotto di secrezione a livello dello sviluppo dell'apparato riproduttivo femminile e sue alterazioni come causa di severi quadri malformativi. Nuove prospettive si aprono al trattamento farmacologico sostitutivo di queste sindromi, dalla più severa Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser a quadri più sfumati simil-ovaio policistico permettendo in molti casi la possibilità di un trattamento mirato endouterino fino al ripristino della ovulazione e, quindi, della fertilità nella vita adulta.

SUMMARY: The role of WNT4 at the origin of müllerian malformations. An overview in medical literature.

M. PELLEGRINO, R. MAIORINO, S. SCHONAUER

This review has the aim to analyze the biological mechanism of WNT4, a gene who plays a crucial role in the development of Müllerian ducts and their abnormalities in women. Recent works have demonstrated the important role played by WNT4 protein during the stage of development of the female reproductive tract and specific loss of function of this protein as cause of severe malformative syndromes. New perspectives can be found for the substitutive pharmacological management of these gynaecological diseases such as Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser or PCOS-like syndrome, allowing in some cases the possibility of a restored fertility in adulthood.

KEY WORDS: WNT4 - Beta-catenina - Estrogeni - Müller - Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser - Agenesia - Gonadi - PCOS.
WNT4 - Beta-catenin - Oestrogens - Müller - Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser - Agenesis - Gonadi - PCOS.

Introduzione

La gonade embrionale è caratterizzata da un tessuto capace di dare origine indifferentemente ad ovaie o testicoli a seconda dello specifico ambiente ormonale che si viene a creare nelle prime settimane di gestazione. Il sesso finale di un embrione è definito dal suo corredo cromosomico: feti con cariotipo XY svilupperanno un sesso maschile, cariotipi XX daranno origine ad individui femmine (Nef, Vassalli, 2009). Il sesso è determinato al momento della fertilizzazione dalla presenza o meno del cromosoma Y e dalla conseguente espressione di una sostanza Y correlata, la Sry, capace di indurre una cascata di eventi determinanti lo sviluppo del fe-

notipo maschile con lo sviluppo dei dotti di Wolff e alla regressione di quelli di Müller (DiNapoli, Capel, 2009). In assenza di questa sostanza, la gonade bipotenziale si differenzierà in ovaio producendo il pattern di ormoni tipico dell'individuo femminile, e mantenendo il differenziamento dei dotti di Müller nelle strutture mesodermiche che ne derivano. L'assenza del corredo ormonale maschile determina quindi la regressione dei dotti di Wolff ed il mantenimento di quelli di Müller capaci di dare origine alle strutture proprie dei genitali interni femminili: utero, tube di Falloppio e 4/5 superiori della vagina (Biason - Lauber, Konrad, 2008).

La patologia *mülleriana* è un difetto di tipo malformativo legata ad un'alterazione dello sviluppo dei dotti di Müller nel corso dell'embriogenesi.

Numerosi studi hanno messo in evidenza il ruolo svolto dal gene WNT4 (*wingless - tipe MMTV integration site family member 4*) nella patogenesi di queste malformazioni. La proteina codificata da questo gene, localizzato sul cromosoma 1, sembra essere implicata sia in processi legati alla differenziazione cellulare che al control-

lo dell'omeostasi nell'adulto. Nell'ambito della prima, il prodotto di secrezione di WNT4 risulta coinvolto nel processo di differenziamento del tessuto gonadico femminile, mediante un'azione paracrina sulle cellule epiteliali. Secreto nelle cellule della granulosa, opera un controllo negativo sulla produzione degli androgeni ovarici (Merchant, 1975 McLaren, 1984)

WNT4 è un gene molto ben conservato lungo la linea evolutiva fino ai vertebrati, è espresso nel cervello in via di sviluppo e tende a manifestare questo suo importante ruolo nel differenziamento e nello sviluppo cellulare nel corso di tutta la vita (Hollyday, 1995 Ungar, 1995).

La proteina WNT4 è capace di legarsi a due differenti recettori: Fz (Frizzeld), una proteina eptamerica di membrana di cui il genoma umano è capace di codificare 10 isoforme (Logan, 2004) ed LRP5/6 (He, 2004). A questo legame, amplificato dalla coespressione di tutte le citate strutture recettoriali, segue una cascata biologica che porta ad una stabilizzazione finale dei livelli nucleari della beta-catenina che, accumulandosi nel nucleo, spiazzia il sito di legame dei DNA *binding domains*. Segue la fase di trascrizione genica (Atcha, 2007).

La funzione di WNT4 è stata studiata inizialmente nella nefrogenesi murina, essendo stato rinvenuto in forma attivata nel rene metanefrico e mutato in topi WNT4^{-/-} morti rapidamente pochi giorni dopo la nascita per una forma di insufficienza renale acuta. Fu più tardi identificato il ruolo cruciale svolto da WNT4 nella differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule epiteliali nella complessa organizzazione delle strutture tubulari del rene (Kispert, 1998). Acquisizioni più recenti hanno dimostrato la sua presenza nelle strutture mesonefriche dell'embrione, a livello gonadico ed in stretta associazione con le strutture mülleriane, ipotizzando un'azione importante svolta nell'orientamento dello sviluppo del tratto riproduttivo e urinario, caratterizzati da un'origine mesodermica comune (McDonald). Questa osservazione permette di affermare che lo sviluppo dell'apparato genitale femminile non sia solo dipendente dall'assenza della Sry e di elevati livelli di testosterone, ma anche da un meccanismo genetico molto finemente regolato dall'attivazione di WNT4, coinvolto sia nella sviluppo delle strutture mülleriane durante l'embriogenesi, sia nella migrazione delle cellule endoteliali e gonadiche dell'ovaio, che nell'inibizione della steroidogenesi ovarica (organizzazione in follicoli, sintesi di estrogeni) (Yao, 2004).

Ruolo di WNT4 nello sviluppo di ovaie e ovociti

All'attivazione di WNT4 in condizioni normali fa seguito una risposta negli ovociti che porta alla *up-regulation* di due fattori di trascrizione specifici: il *factor in germ-*

line alpha (FIG α , FIGLA) (Liang, 1997) e il *newborn ovary homeobox encoding gene* (NOBOX) (Rajkovic, 2004), entrambi coinvolti nel prevenire la morte cellulare per apoptosi degli ovociti e nel favorire la loro organizzazione in follicoli. All'attivazione di FIG β fa seguito l'attivazione del gene FOXL2, un fattore di trascrizione necessario per regolare la differenziazione delle cellule della granulosa nel corso della follicologenesi e prevenire l'uscita delle cellule germinali dalla prima profase meiotica (De La Chesnaye, 2008). Il gene WNT4 controlla la *Bone Morphogenic Protein 15* (BMP15) e il *Growth Factor Differentiation 9* (GDF9): essi risultano cruciali per il fisiologico sviluppo del follicolo ovarico favorendo l'incremento dei livelli di aromatasi, enzima coinvolto nella trasformazione degli androgeni nell'estrogeno e del numero di *Estrogen Receptors* (ER) presenti sulle cellule del follicolo (Su, 2008). Recenti studi hanno confermato che mutazioni del GDF9 e del gene FOXL2, e quindi un'alterazione nel meccanismo di *signaling* da questo attivato, sono state rinvenute in topi *knock-out* manifestanti una condizione di precoce fallimento della maturazione ovarica associata curiosamente ad un quadro di blefarofimosi/ptosi/epicanto (Harris, 2002). Il ruolo pro-ovarico e, nel contempo, anti-testis svolto dal gene WNT4 nel corso dell'embriogenesi è da mettere in relazione alla sua capacità di sopprimere, attraverso la sintesi della follistatina, la migrazione delle cellule dell'endotelio mesonefrico prevenendo la formazione della ricca trama vascolare che ha origine dalla superficie antero-posteriore del coeloma che funge, nell'uomo, da supporto alla sintesi testicolare di testosterone (Jeays - Ward, 2003).

Ruolo di WNT4 nel controllo della steroidogenesi ovarica

Il prodotto di WNT4 è trascritto e tradotto dalle cellule somatiche ovariche (cellule della pre-granulosa); una volta nel nucleo di queste cellule WNT4 agisce stimolando la trascrizione di Dax1 (Jordan, 2001), un gene noto per la sua capacità di antagonizzare il ruolo del recettore nucleare per il fattore steroidogenico 1 e quindi di inibire la funzione degli enzimi coinvolti nella sintesi del corredo ormonale maschile. L'attivazione di Dax1 consente di limitare fino ad annullare la sintesi di testosterone e di orientare la biosintesi verso la conversione degli androgeni in estrogeni; in assenza di testosterone le strutture mülleriane potranno svilupparsi negli organi genitali interni della donna (Vainio, 1999).

Topi di sesso femminile mutati per WNT4^{-/-} manifestano così un alto grado di mascolinizzazione a livello fenotipico: presentano uno sviluppo marcato dei dotti di Wolff nelle loro strutture di derivazione e mancano del tutto dei dotti di Müller, è compromesso lo sviluppo sia dell'apparato urinario che delle strutture surre-

naliche ed è alto il tasso di attività funzionale di due specifici enzimi richiesti nella produzione del testosterone (3beta-idrossisteroide deidrogenasi e 17alpha-idrossilasi) che sono normalmente soppressi nella gonade femminile insieme ad un incremento del Cyp17, marker caratteristico di sintesi steroidea.

All'istologia ovarica si rinviene un più povero contingente oocitario, suggerendo il ruolo cruciale di WNT4 nel processo di sopravvivenza degli ovociti e nel meccanismo di comunicazione/adesione fra questi e le cellule di sostegno della granulosa nell'organizzazione del follicolo ovarico. Mutazioni del gene WNT4 determinano quindi una condizione di simil - ovaio policistico nella donna con una condizione di iperandrogenismo e di anovularietà (Yao, 2004).

Recenti studi hanno invece messo in evidenza che, in topi di sesso maschile con over espressione di WNT4, l'attivazione *del signaling* mediato da questo gene induce un abbassamento drastico dei livelli di testosterone accompagnati da un'alterazione strutturale delle vescichette seminali, androgeno - sensibili. L'espressione della *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR), proteina coinvolta nello *shuttle* del colesterolo all'interno dei mitocondri, tappa quest'ultima limitante l'intero processo di steroidogenesi, è addirittura assente. Nell'uomo invece la mancata espressione di WNT4 porta all'attivazione dei geni SRY e SOX9 nelle cellule di sostegno primitive che poi diventeranno cellule del Sertoli. La proteina SRY nell'uomo appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione Sox (Sry - *related high mobility group* (HMG) box) capaci, una volta traslocati nel nucleo, di legarsi e rimodellare specifici segmenti di cromatina (HMG - DNA *binding domains*) favorendo così lo *switch* verso il fenotipo maschile. Alla *Müllerian inhibiting substance* (Mis) prodotta alla 8 settimana di gestazione sempre dalle cellule del Sertoli si deve invece la contemporanea regressione dei dotti di Müller (Albrecht, 2001).

Ruolo di WNT4 nella morfogenesi delle strutture mülleriane

Le strutture *mülleriane* nell'embrione di sesso maschile vanno incontro a progressiva involuzione sotto l'azione del Mis (*Müllerian inhibiting substance*) prodotta dalle cellule del Sertoli; nell'embrione di sesso femminile, mancando l'azione inibente di questa sostanza e con bassi i livelli di testosterone, sono i dotti di Wolff a regredire con sviluppo dei dotti di Müller secondo il modello di *signaling* di WNT4 descritto precedentemente.

WNT4, favorendo la sintesi estrogenica determina lo sviluppo dell'apparato genitale femminile di origine mesodermica e del corrispondente apparato urinario. Secondo questa origine comune, mutazioni che riguardano WNT4 interessano entrambi gli apparati portando

ad anomalie complesse riscontrabili fin dalla nascita o clinicamente manifeste durante l'età pediatrica. Nell'uomo più copie del gene WNT4 dovute ad un fenomeno di duplicazione del cromosoma 1p31β1p35 sono state rinvenute in pazienti 46,XY presentanti una severa condizione di ambiguità genitale (*male to female sex reversal*) con ipospadia, testicoli di tipo fibroso e residui sia di dotti di Wolff che di Müller (Jordan, 2001). Dall'altra parte l'inattivazione di WNT4 dovuta ad una mutazione missenso in omozigosi di entrambe le copie in soggetti 46, XX definisce una condizione di ambiguità genitale in soggetti genotipicamente femmine presentanti da una ovotestis ad un testicolo definitivo, agenesia renale e severi difetti cardiaci e polmonari. Questa entità clinica chiamata SERKAL syndrome (*Sex Reversion, Kidneys, Adrenal and Lung dysgenesis*) correla all'importante ruolo svolto da WNT4 nello sviluppo embrionale di differenti tessuti ed organi (Mandel, 2008). A seguito del sequenziamento del gene mediante PCR - DNA è stato possibile evidenziare la sede della mutazione responsabile dovuta ad una transizione CβT in posizione 341 che comporta la sostituzione di un'alanina in un residuo di valina la quale compromette la successiva stabilità dell'RNA messaggero e della struttura secondaria della proteina WNT4 (Nusse, 2003). Al centro di questo ampio spettro di malformazioni ritroviamo la sindrome di Mayer - Rokitansky - Kuster - Hauser (Folch, 2000): anomalia *mülleriana* rara che interessa 1:4500 individui di sesso femminile; essa si manifesta con aplasia uterina, contestuale assenza di tube di Falloppio, vagina breve ed a fondo cieco in donne con caratteri sessuali secondari normali (MRKH). Un elevato livello sierico di testosterone determina un quadro di androgenismo che si ritrova associato a malformazioni renali (agenesia, ectopia, rene a ferro di cavallo), scheletriche (sindrome di Klippel - Feil, sindattilia), difetti cardiaci e sensitivi uditivi (MRKH tipo II) (Morcel, 2006). Anche in questo caso il sequenziamento del DNA ha permesso di individuare la mutazione, corrispondente alla *single - base exchange CgT* che comporta la sostituzione di cisteina con un residuo di arginina in posizione 83. La forma mutata arg83 della proteina sarà dunque incapace di subire il processo di palmitoilazione che normalmente avviene in corrispondenza del residuo di cisteina; la proteina anomala verrà ritenuta nel ER, non potrà essere secreta e pertanto non potrà avviare la cascata del segnale capace di modulare negativamente la sintesi steroidea nella donna (*lack of secretion/ trapping*) (Dobson, 2004).

Ruolo di WNT4 nell'omeostasi minerale ossea

L'osteoporosi rimane a tutt'oggi un importante problema di ordine terapeutico, soprattutto in meno

pausa. Recentemente è stato individuato il ruolo del *signaling* mediato da WNT4/betacatenin nel controllo dell'omeostasi della matrice ossea. Il prodotto di WNT4 si lega sulla membrana cellulare al recettore LRP5 che, in forma mutata, è coinvolto nell'insorgenza di una sindrome clinica complessa: l'OPPG (*osteoporosis with pseudo ganglioma syndrome*) caratterizzata da un quadro di osteoporosi associato ad alterazioni della rete vascolare dell'occhio (Gong, 2001). Una *gain of function* del recettore LRP5 che, al contrario, causa un aumento della sua espressione e lo rende insensibile all'azione inibente del fattore SOST, è responsabile di una condizione dominante di *high bone mass disease* (HBM), quindi aumento della matrice ossea, assimilabile per espressione clinica alla sclerostosi legata a mutazioni missenso del gene SOST (Ellies, 2006). Da questi studi emerge quindi il ruolo svolto da LRP5 nel controllo della regolazione dell'omeostasi ossea mediante l'induzione della proliferazione degli osteoblasti e l'antagonismo funzionale nei confronti dei prodotti di secrezione SOST e DKK1, che sono elettivamente espressi negli osteociti maturi (Williams e Insogna, 2008).

Nota la via di trasduzione del segnale mediata dal legame fra WNT4 ed il suo recettore nel tessuto osseo, LRP5, che porta in ultima analisi ad un'attivazione della differenziazione cellulare del compartimento osteoblastico e ad una sintesi di nuova matrice ossea, emerge l'importante prospettiva terapeutica di una selettiva modulazione del legame WNT4/LRP5 in donne affette da osteoporosi, patologia questa intimamente correlata alla progressiva riduzione del pattern estrogenico in epoca menopausale.

Aspetti clinici delle malformazioni mülleriane

Da un punto di vista clinico le anomalie mülleriane possono presentarsi con uno spettro molto ampio di manifestazioni in età pediatrica o adolescenziale, estrinsecandosi in corso di gravidanza nelle donne portatrici di anomalie meno complesse o in età perimenarcale. La maggior parte delle malformazioni tende a manifestarsi nel corso dell'adolescenza, in età perimenarcale. L'involutione dei dotti di Müller in soggetti di sesso cromosomico femminile determina un quadro di malformazioni variabile dalla completa agenesia/aplasia di utero, tube di Falloppio e 4/5 superiori della vagina a forme meno complesse nelle quali lo sviluppo dei genitali interni è portato a termine con quadri di ipoplasia o minori alterazioni morfologiche dell'utero. Il corredo sintomatologico sarà quindi variabile e, in assenza di altre patologie di tipo ostruttivo a carico dei genitali femminili, si manifesterà secondo modi e tempi differenti. È possibile distinguere i diversi quadri clinici in base all'organo inte-

ressato dalla malformazione. L'agenesia uterina si associa ad una condizione di amenorrea primaria; la sindrome di Rokitansky rappresenta infatti la seconda causa di amenorrea primaria dopo quella di tipo ipogonadotropo. Ipomenorrea è invece presente nel caso di malformazioni uterine meno complesse come l'utero bicornuto o con corno rudimentario, condizioni di ipoplasia uterina nelle quali la più esigua mestruazione è garantita da una presente ma ridotta superficie di sanguinamento endometriale con una più povera trama vascolare uterina o dovuta ad una scarsa recettività dell'endometrio agli stimoli ormonali. La criptomenorrea è dovuta alla ritenzione di sangue mestruale in emiutero non comunicante con la vagina o in un utero normoconformato con atresia/aplasia cervico - istmica o stenosi del collo. La sintomatologia algica tende ad aggravarsi progressivamente durante il periodo mestruale per la ritenzione del sangue mestruale. Sono possibili secondario ematocolpo ed ematometra associati ad atresia della cervice o *aditus* vaginale a fondo cieco. Essi determinano la comparsa di dolori ciclici in sede pelvica e ritenzione urinaria con difficoltà minzionali da fenomeno compressivo sul plesso sacrale. Idronefrosi si ha per coinvolgimento da parte della massa pelvica che progressivamente va ingrandendosi lungo il decorso degli ureteri, stipsi ostinata per compressione sul segmento sigmoideo - rettale del tubo intestinale, ridotto ritorno venoso per compressione sui plessi venosi pelvici. Molto frequenti sono i fenomeni flogistici delle vie urinarie, scatenati dalla infezione batterica dovuta alla ritenzione urinaria. Il mancato deflusso del sangue mestruale è fattore predisponente l'insorgenza di endometriosi secondaria; tale rischio è inversamente proporzionale al tempo intercorso fra epoca di comparsa del menarca e epoca della diagnosi di patologia. L'impianto di frammenti endometriali a livello del cavo peritoneale, non opportunamente antagonizzato dai meccanismi immunologici anti - impianto, favorisce l'estensione della endometriosi a livello addominale con comparsa di sintomatologia legata allo sviluppo di lesioni aderenziali estese a livello intestinale e peritoneale. L'endometriosi si ritrova in un alto numero di malformazioni uterine dall'utero bicornuto o con unico corno rudimentario all'aplasia/atresia cervicale in presenza di corpo uterino normoconformato. La dismenorrea insorge in caso di emivagina atresica, solo in parte capace quindi di garantire l'espulsione all'esterno del sangue mestruale e di vagina presentante setti trasversi o longitudinali completi. Anche nel caso di patologia malformativa vaginale, il mancato deflusso di sangue mestruale favorisce l'insorgenza di endometriosi caratterizzata dall'intensificarsi della sintomatologia dolorosa nel corso del periodo mestruale. Possibili sono i sanguinamenti aciclici ovvero in periodi diversi dalla mestruazione in caso di uteri funzionanti comunicanti con emivagina atresica.

Mutazioni del gene WNT4 si associano spesso an-

che ad anomalie complesse ovariche. L'ovaio, sebbene di derivazione endodermica e pertanto non riconducibile ai dotti di Müller, è spesso interessato da alterazioni che si estrinsecano a carico della follicologenesi e della organizzazione strutturale dei follicoli fin dall'epoca gestazionale. In donne presentanti delezioni del gene WNT4 si è infatti apprezzato un progressivo depauperamento del contingente oocitario normale fino a vere e proprie *streak-gonads* con alterazioni riferibili a fenomeni di apoptosi e di morte cellulare programmata delle cellule di sostegno del parenchima ovarico. Anomalie nella trasmissione del segnale paracrino fra oociti e cellule di sostegno della granulosa determinano un disassemblamento delle strutture follicolari con riduzione nel numero dei follicoli e ridotta capacità di ovulazione. L'alterazione dell'ambiente ormonale come in corso di iperandrogenismo indotto da delezioni del gene WNT4 determina difetti della maturazione follicolare e dell'ovulazione che può in questi casi mancare del tutto, andando a compromettere la fertilità della donna e configurando un quadro assimilabile alla sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) (Wood, 2004).

La clinica delle malformazioni *mülleriane* può rendersi manifesta in epoca più tardiva, spesso in corso di gravidanza nelle donne affette da patologia minore (utero setto, utero subsetto, utero bicorni o didelfo). In queste donne la malformazione riguarda limitatamente la cavità uterina, risultano integre le rimanenti strutture genitali interne. La gravidanza può decorrere asintomatica fino al termine, laddove anomalie di presentazione della parte presentata impongono la scelta del taglio cesareo elettivo o complicarsi fin dal primo trimestre per aumentato rischio d'aborto per sofferenza del prodotto del concepimento o nei trimestri successivi per anomalie dello sviluppo fetale o induzione di parto pretermine.

Prospettive terapeutiche

Data l'estrema variabilità spazio-temporale delle condizioni in cui questo *signaling* cellulare viene ad essere attivato, mutazioni del gene WNT4 possono associarsi a patologie tanto relative all'embriogenesi (patologie malformative) quanto dell'età adulta (iperandrogenismo, PCOS, infertilità). WNT4 risulta cruciale nello sviluppo di organi e apparati e nel mantenimento della loro omeostasi; ne deriva quindi che mutazioni del gene siano implicate in numerose condizioni patologiche come patologie a carattere ereditario e neoplasie. In ambito ginecologico, specificatamente, delezioni del gene WNT4 sono associate a quadri severi di malformazioni *mülleriane*: il mancato o incompleto sviluppo dei dotti di Müller e quindi dell'apparato genitale femminile interno si complica con un quadro di anovularietà indotto dal modificato ambiente ormonale del soggetto che presenta ele-

vati tassi ematici di androgeni e sintomi clinici caratteristici dell'iperandrogenismo (anovularietà, caratteri sessuali secondari maschili). L'alterata espressione del gene causa una condizione assimilabile a quella della policistosi ovarica; ne deriva che una prospettiva futura possa essere quella di modulare l'espressione del gene in donne con familiarità per questa condizione patologica e clinica evocativa al fine di correggere il difetto endocrinologico e quindi la sua estrinsecazione ovarica, garantendo una corretta ovulazione e quindi ripristino della fertilità. Sono noti tuttavia gli effetti teratogeni nell'embrione legati ad una duplicazione del gene WNT4: un monitoraggio più attento della terapia deve essere effettuato in donne in terapia per PCOS desiderose di prole. Elevati livelli della proteina WNT4 sono coinvolti nella patogenesi di anomalie genitali note con il termine di *male to female sex reversal*.

Un campo molto attivo di ricerca è rappresentato dallo studio del ruolo svolto dai mediatori biologici della attivazione di WNT4 nello sviluppo dell'osteoporosi. La proteina WNT4 si lega infatti al recettore LRP5, attivato sia nel corso dell'embriogenesi sia durante la vita adulta, periodo durante il quale svolge un ruolo determinante nella regolazione dell'omeostasi minerale dell'osso e nel mantenimento della massa ossea stimolando la proliferazione degli osteoblasti. Prospettive terapeutiche relative a questo recettore sono state indotte dalle recenti acquisizioni: si sono ritrovate mutazioni capaci di indurre una perdita dell'attività recettoriale di LRP5 in soggetti affetti da osteoporosi associata a sindrome dello pseudoglioma (OPPS), una patologia a carattere recessivo caratterizzata da riduzione della massa minerale ossea e da alterazioni nella vascolarizzazione dell'occhio. Una mutazione strutturale del recettore LRP5 che ne modifica il dominio extracellulare, rende la molecola insensibile alla modulazione a carattere inibitorio del suo antagonista SOST che, come DKK1, è espresso in maniera elettiva negli osteoclasti che tendono a spegnere la risposta indotta dall'interazione WNT4/LRP5. Una prospettiva futura nell'ambito del trattamento dell'osteoporosi, soprattutto in epoca postmenopausale, potrebbe essere attuata mediante l'utilizzo di anticorpi diretti contro SOST e DKK1, sostanze che antagonizzano l'azione *in vivo* del recettore LRP5. In questo modo la costante attivazione di WNT4/LRP5 determinerebbe il mantenimento dell'omeostasi calcica anche in condizioni metaboliche ormonali sfavorevoli come la drastica caduta del tasso di estrogeni nel sangue di donne in menopausa. Recenti studi hanno permesso di valutare il positivo effetto terapeutico di anticorpi diretti contro DKK1 in topi affetti da mieloma multiplo e osteoartrite, patologie ossee a carattere tumorale la prima ed infiammatorio la seconda, entrambe caratterizzate da un'importante depauperamento della componente minerale ossea; viene limitata l'evoluzione della patologia in favore di un costante aumento della mas-

sa ossea. Recenti studi hanno messo in evidenza una via indipendente, non legata alla riduzione dei tassi intracellulari di beta-catenina, con cui LRP5 modula la formazione della matrice ossea. In modelli murini l'attivazione di LRP5 è in grado di inibire l'espressione di Tph1, un enzima attivo nella tappa limitante della biosintesi della serotonina nelle cellule enterocromaffini del duodeno. La serotonina infatti lega i recettori Htr1b e CREB presenti sugli osteoblasti, inibendone la proliferazione. Il rapido calo delle concentrazioni di serotonina indotte da LRP5 determina un aumento della massa ossea, anche in condizioni metaboliche avverse come il calo degli estrogeni in menopausa, agendo questo recettore secondo una via alternativa a quella di WNT4/beta-catenina e prevenendo quindi il severo quadro di osteoporosi aggravato dalla menopausa.

Il recettore LRP6 invece, attivato da WNT4 durante l'embriogenesi, funge nella vita adulta da corecettore dell'ormone paratiroideo (PTH). Somministrazioni inter-

mittenti di PTH in pazienti affette da osteoporosi, stimolano l'attività degli osteoblasti, permettendo la neoformazione di matrice ossea. Il legame di PTH al suo recettore osteoblastico PTH1R è seguito dall'attivazione di LRP6, un corecettore di WNT4, cui segue la formazione di un complesso terziario contenente il recettore LRP6 in forma fosforilata. L'attivazione della PKA e il rapido passaggio di LRP6 alla forma fosforilata permette il rapido accumulo dell'Axin e la stabilizzazione conseguente della beta-catenina cui segue la sua distruzione; il segnale determina aumento dell'attività osteoblastica.

Infine, il ruolo di WNT4 come marker di attività teratogena nell'ambito di terapie non direttamente correlate alla patologia ovarica ma che tendono ad alterare la funzionalità di queste ghiandole. Un danno specifico a carico dell'ovaio si può rendere manifesto con una riduzione dell'espressione di questa proteina cui fa seguito il fallimento della sua attività biologica.

Bibliografia

1. Albrecht K, Eicher E. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* 240: 92 – 107, 2001.
2. Archa FA, Syed a, Wu B, Hoverter NP, Yokohama NN, Ting JH, Munguia JE, Mangalam HJ, Marsh JL, Waterman ML. A unique DNA binding domain converts T – cell factors into strong Wnt effectors. *Mol Cell Biol* 27, 8352 – 8363, 2007.
3. Biason – Lauber A, Konrad D. WNT4 and sex development. *Sexual Development* 2: 210 – 218, 2008
4. De La Chesnaye E, Kerr B, Paredes A, Merchant – Larios H, Mendez JP, Ojeda SR. Fbxw15/Fbxo12j is a F – box protein – encoding gene selectively expressed in oocyte of the mouse ovary. *Biol Reprod* 78: 714 – 725, 2008.
5. DiNapoli L, Capel B. SRY and the Standoff in Sex Determination. *Molecular Endocrinology* 22(1): 1-9, 2008.
6. Dobson CM. Principle of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol* 15:3-15, 2004.
7. Ellies DL, Viviano B, McCarthy J, Rey Jp, Itasaki N, Saunders S, Krumlauf R. Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. *J Bone Miner Res* 21: 1738-1749, 2006.
8. Folch M, Pigem I, Konje jc. Müllerian agenesis: etiology, diagnosis and management. *Obstet Gynecol Surv* 55: 644 – 649, 2000.
9. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman – Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux Fh, Lev D. LDL receptor – related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development *Cell* 107: 513 – 523, 2001
10. Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Aittomaki K, Shelling AN. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 8: 729 – 733, 2002.
11. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng x. LDL receptor – related protein 5 and 6 in Wnt/ catenin signalling: arrows point the way. *Development* 131, 1666 – 1677, 2004.
12. Hollyday M, McMahon JA McMahon AP. Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mech Dev* 52(1), 9 – 25, 1995.
13. Jeays – Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Allhus G. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by Wnt4 in the developing mammalian gonad. *Development* 130: 3663 – 3670, 2003.
14. Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Delot e, Chen XN. Up regulation of Wnt4 signaling and dosage - sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 68: 1102 – 1109, 2001.
15. Kispert A, Vainio S, McMahon AP. Wnt4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* 125(21), 4225 – 4234, 1998.
16. Liang L, Soyal SM, Dean J. FIGalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* 124: 4939 – 4947, 1997.
17. Logan CY, Nusse R. The Wnt signalling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781 – 810, 2004.
18. Mandel H, Shemer R, Borochowitz ZU, Okopnik M, Knopf C. SERKAL syndrome: an autosomal recessive disorder caused by a loss of function mutation in WNT4. *Am J Hum Genet* 82: 39 – 47, 2008
19. McDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ catenin signalling: components, mechanism and disease. *Developmental Cell* 17, July 21, 2009.
20. McLaren A. Meiosis and differentiation of mouse germ cell. *Symp Soc Exp Biol* 38: 7 – 23, 1984
21. Merchant H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cell. An ultrastructural study. *Dev Biol* 44: 1 – 21, 1975.
22. Morcel K, Camborieux L. Programme de Recherches sur les Aplasies Mülleriennes (PRAM), Guerrier D Mayer – Rokitansky – Kuster – Hauser (MRKH) syndrome Orphanet Journal of Rare Disease 2 :13, 2007.
23. Nef S, Vassalli JD. Complementary pathways in mammalian female sex determination. *Journal of biology* 8:74, 2009.
24. Nusse R. Wnts and hedgehogs: lipid – modified proteins and similarities in signalling mechanism at the cell surface. *Development* 130: 5297 – 5305, 2003.
25. Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, Suzumori N, Matzuk MM

- NOBOX. deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte – specific gene expression. *Science* 305: 1157-1159, 2004.
26. Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135: 111-121, 2008.
 27. Ungar AR, Kelly GM, Moon RT. Wnt4 affects morphogenesis when mixexpressed in the zebrafish embryo. *Mech Dev* 52(2-3), 153-164, 1995.
 28. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt4 signaling. *Nature* 397: 405-409, 1999.
 29. Yao HH. The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Mol Cell Endocrinol* 230: 87-93, 2004.
 30. Yao HH, Matzuk MM, Jorgez CJ, Menke DB, Page DC. Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn* 230: 210-215, 2004.
 31. Williams BO, Insogna KL. Where Wnts went: the exploding field of LRP5 and LRP6 signaling in bone. *J Bone Miner Res* 24: 171-178.
 32. Wood JR, Ho CK, Nelson – Degraeve VL, McAllister JM, Strauss JF. The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cell defined by gene expression profiling. *J Reprod Immunol* 63: 51-60, 2004.
-