

Update su PCOS e sintomatologia da eccesso di androgeni: identificazione di overespressione di *SOS1* in donne affette da irsutismo

Premessa

Gli effetti del testosterone sono vari e tessuto-specifici e riflettono la somma della sua azione e le azioni dei suoi prodotti di conversione, diidrotosterone ed estradiolo. Il testosterone entra nella cellula per diffusione e viene quindi 5 α ridotto a diidrotosterone od aromatizzato ad estradiolo. Successivamente, testosterone ed estradiolo si legano ad una proteina-recettore intracitoplasmatico ad alta affinità per gli androgeni. Questo recettore presenta un'affinità di legame due volte maggiore per il diidrotosterone rispetto al testosterone. Esso è codificato da un gene localizzato tra centromero ed Xq13 sul cromosoma X ed è presente nei tessuti-bersaglio sensibili agli androgeni di maschi e femmine. Il recettore per gli androgeni è membro di una famiglia di proteine di regolazione che comprende recettori specifici per gli steroidi, per la vitamina D, per gli ormoni tiroidei e per l'oncogene *v-erb A*. Questi recettori hanno in comune tre domini: (1) un dominio NH₂-terminale ritenuto essere coinvolto nella trascrizione del gene; (2) una sequenza utile per il legame con il DNA che contiene due *zinc-fingers*, di cui uno possiede l'informazione per il legame sequenza-specifico con il DNA e l'altro è ritenuto utile a stabilizzare il legame del recettore al DNA; (3) un dominio COOH-terminale necessario per il legame con l'androgeno. La sequenza NH₂-terminale di questi recettori presenta una bassa omologia. In assenza di ligando, i recettori per gli steroidi formano un complesso con le *heat shock proteins*, omodimeri proteici in grado di interagire con questi. Il legame steroide-recettore comporta un cambiamento conformazionale di quest'ultimo, con dissociazione dalla *heat shock protein* ed attivazione recettoriale. Il complesso recettore-steroidi attivato è più piccolo del complesso inattivo. Esso si lega ad elementi steroide-responsivi del DNA genomico che sono correlati alla zona *promoter* della trascrizione genica. RNA polimerasi ed altri fattori di trascrizione intervengono quindi per iniziare il meccanismo di trascrizione del gene steroide-responsivo. L'RNAm formato si muove nel citoplasma ove è tradotto dai ribosomi citoplasmatici con conseguente sintesi di nuove proteine ed espressione dell'effetto biologico.

I recettori per gli androgeni sono, al momento, assieme agli ormoni androgeni, gli elementi di cui meglio si conosce il ruolo nel controllo della differenziazione sessuale, nell'inizio e mantenimento della gametogenesi, nello sviluppo e mantenimento delle caratteristiche sessuali secondarie. I pazienti resistenti all'azione degli androgeni (CAIS e PAIS) presentano una varietà di fenotipi sessuali anormali che vanno dal fenotipo femminile a quello ipogonadico maschile infertile.

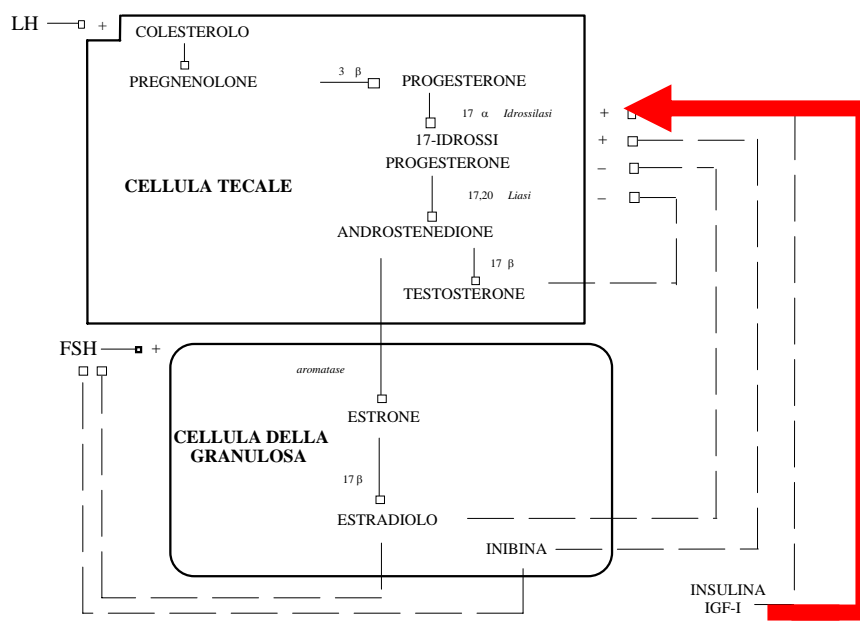
Le fonti di iperproduzione androgena nella femmina sono: ovarica, surrenalica e periferica extraghiandolare. Le cause possono essere ascritte alle condizioni schematizzate nella seguente tabella:

Iperandrogenismo funzionale surrenalico	Iperandrogenismo funzionale gonadico	Iperproduzione androgena periferica	Iperandrogenismo tumorale
Adrenarca prematuro Sregolazione adrenarca Iperplasia surrenale congenita Morbo di Cushing Iperprolattinemia Abnorme attività bio logica del cortisolo	Disordini virilizzanti extraovarici Blocco steroidogenetico ovarico Sregolazione del complesso P450c17 Arresto della maturazione follicolare Stati Intersessuali	Obesità Irsutismo idiopatico	Tumori surrenalici Tumori ovarici Tumori gonadotropino secernenti

L'aumento della produzione di androgeni che caratteristicamente si verifica nel periodo peripuberale, e' il risultato sia della aumentata secrezione ghiandolare che del metabolismo periferico dei precursori secreti. Il Testosterone e' il maggior androgeno circolante nelle donne in virtu' della sua potenza e concentrazione relativa. L'Androstenedione e' comunque il principale prodotto di secrezione androgeno dell'ovaio. Ovaie e surreni normalmente contribuiscono in egual misura alla produzione di testosterone nelle donne. La secrezione di androgeni e' regolata dai rispettivi ormoni trofici di ovaio e surrene, LH ed ACTH. E' stata anche postulata l'azione di un altro ormone ipofisario il "fattore adrenarca" che porta avanti i cambiamenti che si verificano appunto durante la fase di adrenarca (7). La secrezione ovarica di androgeni aumenta durante la puberta' in risposta all'aumentata secrezione di gonadotropine che presentano peraltro una maggiore "attivita' biologica". La normale funzione ovarica dipende dall'azione combinata dell'LH sulle cellule tecali (teca-interstizio-stromali) e dell' FSH sulle cellule della granulosa, in accordo con il modello delle "2 cellule-2 gonadotropine" della steroidogenesi ovarica (8) (Fig. 2).

I fattori che regolano la produzione periferica di androgeni sono valutabili in un modo piu' complesso rispetto a quelli che ne regolano la secrezione. Un fattore molto importante e' la Sex Hormone Binding Globuline (SHBG) che regola la distribuzione dei 17 β idrossisteroidi tra albumina plasmatica e frazioni libere determinando il *tasso di clearance metabolica* e la biodisponibilita' dei ligandi steroidei. Le concentrazioni plasmatiche di SHBG possono essere influenzate da un largo numero di ormoni (estrogeni, ormoni tiroidei le aumentano; androgeni, glucocorticoidi, GH ed insulina le diminuiscono). In considerazione di questo, i livelli di SHBG sono spesso diminuiti negli stati iperandrogenici e nell'obesita' con conseguente incremento delle concentrazioni plasmatiche di testosterone libero e segni clinici di iperandrogenemia.

La sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), principale causa, insieme all'"adrenarca esagerato", di iperandrogenismo funzionale ovarico, e' un disordine caratterizzato da anovulazione, iperandrogenemia, aumentati livelli circolanti di LH e bassi livelli di FSH, oligomenorrea o amenorrea, e segni clinici di aumentato turnover androgeno quali acne ed irsutismo. La etiopatogenesi di questa condizione non e' chiara. Le fasi iniziali della follicologenesi quali il *recruitment* e la crescita di piccoli follicoli sino alla classe 3-4 di sviluppo sono normali mentre anomala e' la selezione del follicolo dominante e lo sviluppo di una condizione pre-ovulatoria con conseguente accumulo nel contesto del tessuto ovarico di molti piccoli follicoli allo stato antrale. Il denominatore comune della sindrome e' appunto rappresentato dallo stato di incremento della disponibilit  di androgeni a livello del tessuto ovarico che genera una insufficiente biosintesi di estradiolo a causa della sregolazione di vari enzimi ovarici del citocromo P450, in particolare la Δ^5 -isomerasi-3 β idrossisteroidodeidrogenasi (3HSD) che svolge un ruolo chiave nel meccanismo aromatasico. Livelli molto bassi di estradiolo si rilevano nel liquido follicolare di pazienti con sindrome dell'ovaio policistico anche in presenza di abbondanti quantita' di substrato (androstenedione). FSH ed Insulin-like Growth Factor I sono in grado di stimolare, anche in sistemi di coltura di cellule di granulosa da pazienti con PCOS, l'attivita' aromatasica agendo in modo sinergico. Lo sviluppo di un circolo vizioso "bassi livelli di estrogeni-amplificazione del segnale gonadotropinico-incremento dell'attivit  interstiziale-iperandrogenemia" genera la sintomatologia clinica della PCOS ed in alcune donne la sindrome da eccesso di androgeni. Implicato in questo meccanismo   anche un eccesso di disponibilit  di IGF-I a livello della cellula interstiziale ovarica, che amplifica l'effetto dell'LH e che   correlato alla iperinsulinemia legata alla sindrome metabolica presente in molte donne affette da PCOS.



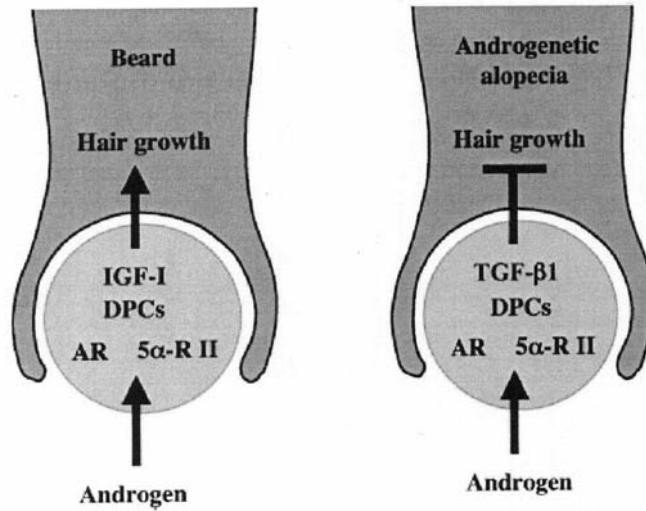
La nostra ipotesi sperimentale parte dalla osservazione clinica che molte donne affette da eccesso di androgeni ed in particolare da irsutismo non presentano iperandrogenemia. Inoltre in una percentuale alta di donne in fase fertile l'irsutismo può essere presente non associato ad alcun segno di PCOS e tanto meno ad iperandrogenemia, essendo in questo caso definito "irsutismo idiopatico". Abbiamo dunque pensato di progettare un programma destinato ad identificare geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi dell'irsutismo ritenendo che la manifestazione clinica possa essere ricondotta ad un alterato meccanismo paracrino-intracrino che si sviluppa a livello della papilla dermica del follicolo pilifero sede delle cellule staminali preposte al rinnovamento ciclico di questo.

Il follicolo pilifero umano presenta un rinnovamento omeostatico ciclico continuo attraverso fasi di crescita (anagen) degenerazione (catagen) e pausa (telogen). Le cellule staminali del follicolo pilifero giacciono al di sotto della ghiandola sebacea in una regione riconosciuta come "protuberanza" che è connessa al muscolo erettore del pelo. Durante i periodi di pausa le cellule staminali della protuberanza formano la base del follicolo che è adiacente alle cellule mesenchimali specializzate che costituiscono la papilla dermica. Alla partenza di ogni ciclo di crescita pilifera (fase anagen) le cellule staminali presenti alla base della protuberanza si attivano per formare una popolazione di nuove cellule germinali pilifere altamente proliferative. Non appena queste cellule germinali crescono, un compartimento proliferativo di cellule "*transiently amplifying*" (TA o cellule della matrice) riempie la papilla dermica dalla base. Queste cellule progrediscono e si differenziano per formare sette gusci concentrici di linee cellulari progenitrici che sono dall'esterno all'interno :

- Una lamina di protezione
- Tre lamine del foglietto della radice interna
- Tre lamine del fusto del pelo

Queste lamine differenziate sono circondate dal foglietto della radice esterna, che si estende al di sotto del rigonfiamento e che è ritenuto sede delle cellule staminali che continuano a migrare verso la parte inferiore del follicolo durante la fase di crescita. L'epidermide interfollicolare consiste in un epitelio stratificato costituita da una lamina basale che contiene cellule progenitrici unipotenti e cellule TA.

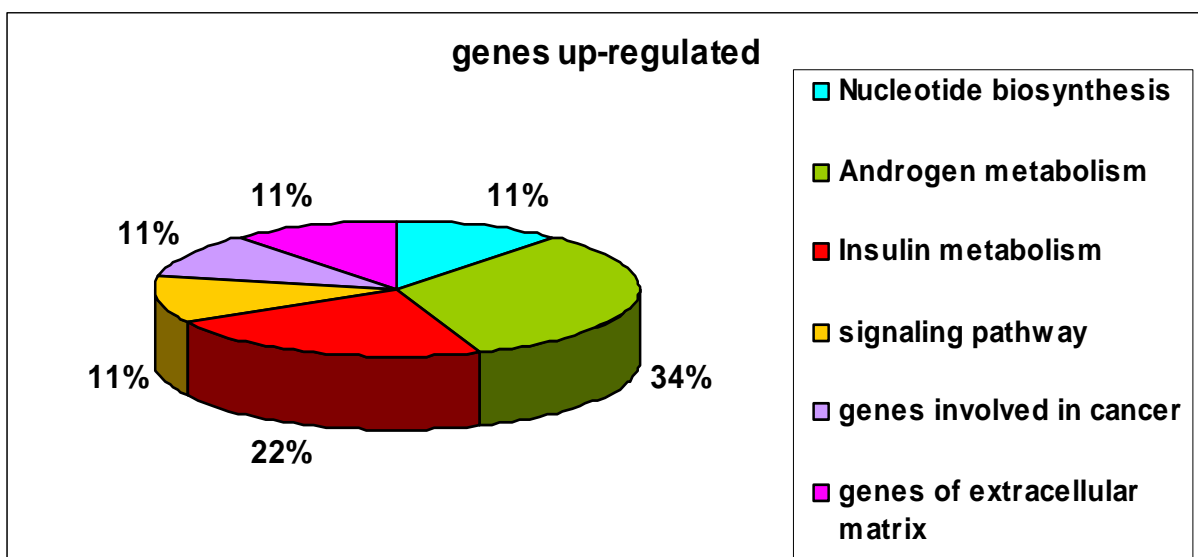
I follicoli piliferi sono distribuiti in varie e specifiche sedi del corpo e presentano un grado congenito di suscettibilità alla crescita androgeno dipendente. La barba, le ascelle e lo scalpo frontale possiedono le caratteristiche di cellule target per gli androgeni e mostrano marcata espressione per il recettore androgenico e la 5alpha reduttasi tipo 2 in relazione al fatto che le cellule della papilla dermica mediano i segnali degli androgeni alle cellule epiteliali follicolari in modo paracrino. In vitro la risposta appare differente a seconda dei fattori di crescita implicati nella mediazione del segnale sui cheratinociti, essendo di stimolo alla fase anagen laddove il fattore prevalente è la IGF-I (stimolo alla crescita) o di stimolo alla fase telogen laddove il fattore prevalente è il TGFβ1.

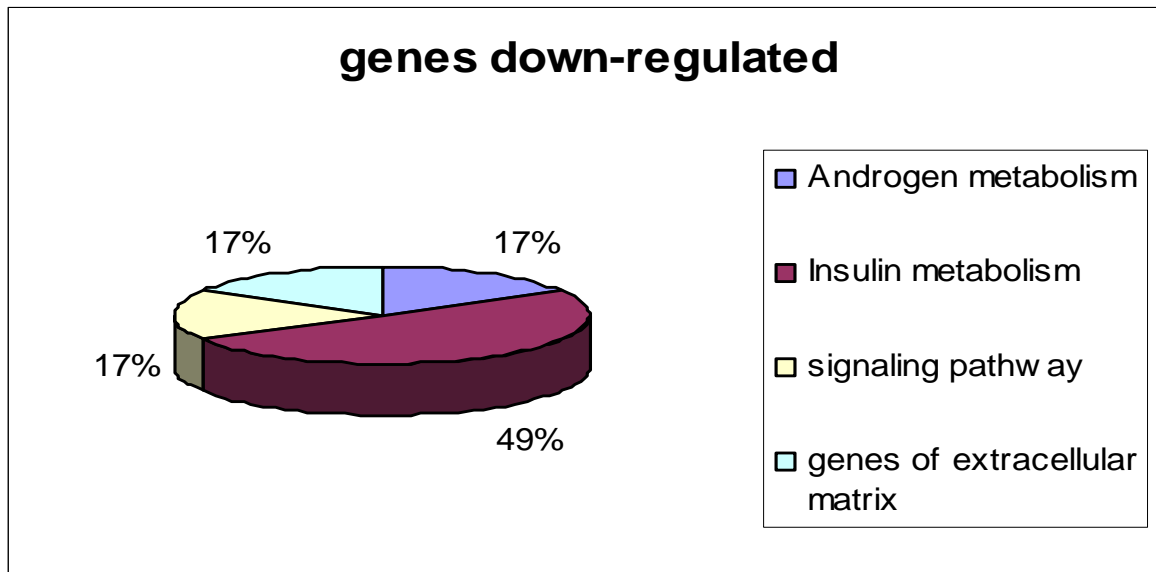


S.Itami and S.Inui *J Investig Dermatol Symp Proc* 10:209-211,2005

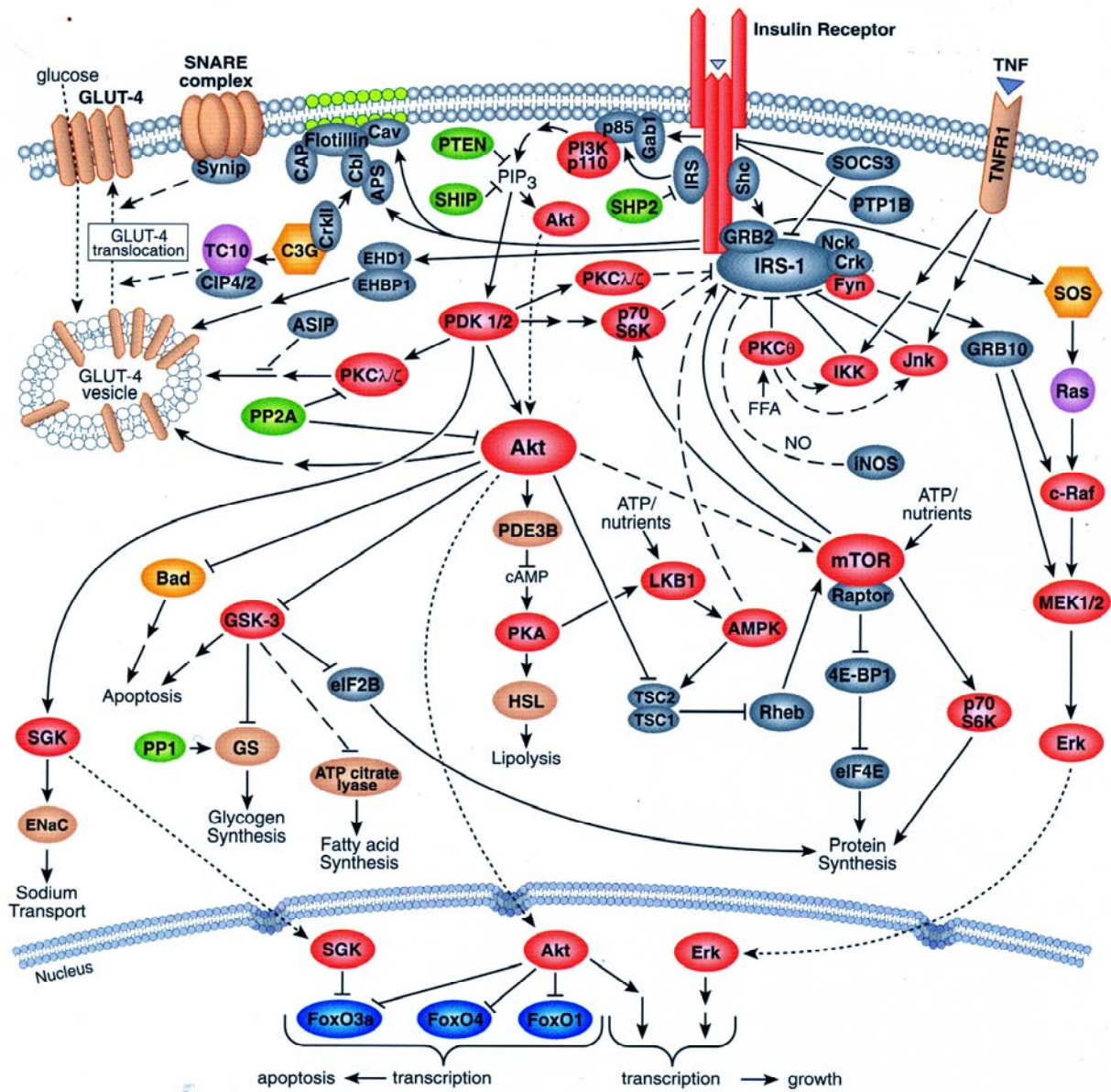
Attuale fase di sviluppo della ricerca

Allo scopo di identificare geni coinvolti nella patogenesi dell'irsutismo è stato sviluppato nel 2005 un microarray low density a oligonucleotidi (andro-chip) ed è stato studiato il profilo di espressione di 204 geni, coinvolti nel metabolismo degli androgeni e nella *pathway* del signaling insulinico, in fibroblasti di cute prelevata a livello della zona inguinale in pazienti fertili affette da una grave forma di irsutismo (indice di Ferriman & Gallway tra 20 e 30). I risultati preliminari indicavano:



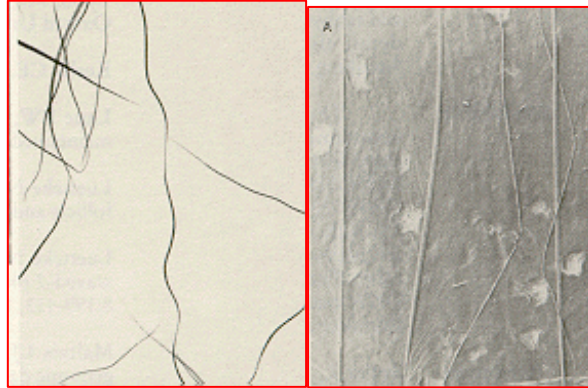


In particolare sono stati studiati 65 geni correlati alla biosintesi ed al metabolismo degli androgeni e 16 geni codificanti per recettorie degli androgeni e relativi coregolatori. L'analisi statistica definitiva ha consentito di concentrarci su 6 geni differenzialmente espressi, di cui 4 up-regolati (in particolare SOS1 [FC 2.0], Caspasi9 ed RNAsel) e 2 down regolati (FN1 e V-CAM1) ed i risultati sono poi stati presentati alla Società Italiana di Genetica nel 2006. Sorprendentemente, come indicato, il gene più chiaramente overespresso non appartiene alla pathway androgenica ma è risultato SOS1, codificante una proteina implicata nel *signaling* insulinico. L'insulina raggiunta la cellula target attiva uno specifico recettore tirosinchinasico che fosforila e recluta differenti substrati. Queste proteine fosforilate dispongono di siti di legame per numerosi altri partner di segnale. Tra questi PI3K presenta un ruolo importante nella funzione insulinica, in particolare attraverso la attivazione delle cascate Akt/PKB e PKCζ. Akt attivata induce la sintesi di glicogeno, attraverso la inibizione di GSK-3. L'insulina stimola l'uptake di glucosio a livello di muscolo ed adipociti attraverso la traslocazione delle vescicole di GLUT4 al plasma lemma. Il segnale insulinico ha anche effetti di crescita e mitogenici che sono per la maggior parte mediati sia dalla cascata delle Akt che dalla attivazione della pathway RAS/MAPK attivata fra l'altro da SOS. SOS (son of sevenless) è un fattore di scambio guanin nucleotidico che attiva RAS in risposta alla stimolazione di fattori di crescita. SOS appare anche in grado di funzionare come scambiatore guanin nucleotidico e può essere reclutato a differenti livelli di localizzazione cellulare attraverso interazioni con le proteine adattatrici GRB2 (che lega la porzione intracellulare del recettore insulinico attivato) ed E3b1.



Nel Feb 2006 sono stati programmati esperimenti per valutare se la overespressione di SOS potesse essere legata ad un meccanismo diretto od indiretto, decidendo di rimettere in coltura i fibroblasti. Nel frattempo si è verificato un problema di inquinamento per cui sono andati persi i fibroblasti delle più importanti pazienti studiate con biopsia cutanea. E' stato però possibile accedere ad una notevole quantità di DNA estratto da 44 pazienti irsute provenienti dall'Università di Cagliari. E' stato anche suggerito di trattare fibroblasti in coltura primaria con androgeni (Testosterone e DHT) per valutare le condizioni di modulazione di questi sulla espressione di SOS. Nel frattempo presso l'Istituto di Genetica è stato attuato uno studio preliminare della sequenza promoter di SOS per valutare la presenza di polimorfismi in grado di identificare

la popolazione di pazienti affette. In effetti 4 su 44 (il 9%) presentava polimorfismo nel promotore di *SOS*.



Cell, Vol. 102, 211–220, July 21, 2000

Interessante il rilievo che *SOS1* ripristina il fenotipo di topi mutanti *EGFR* generando la ricrescita del pelo in questi topi che ne sono completamente privi. L'iper-espressione del gene *SOS1* è stata confermata singolarmente in ciascuna paziente mediante QRT-PCR. Studi preliminari di western blot, da estratti proteici di colture primarie di fibroblasti, sembrano confermare l'iper-espressione del gene *SOS1* riscontrata mediante microarray e Quantitative Real Time PCR. Attualmente sono in corso esperimenti per confermare attraverso wester blotting la presenza di *SOS1*.