

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA E GENETICA
DELLE MALATTIE OSTEOMETABOLICHE

XX CICLO

CARLO GALLI

LA DELEZIONE DI UN DISTAL ENHANCER DEL GENE
RANKL RIDUCE IL RIMODELLAMENTO OSSEO ED AU-
MENTA LA MASSA OSSEA

TESI DI DOTTORATO

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Multas per gentes et multa per aequora vectus

**LA DELEZIONE DI UN DISTAL ENHANCER DEL GENE RANKL
RIDUCE IL RIMODELLAMENTO OSSEO ED AUMENTA LA
MASSA OSSEA**

INTRODUZIONE

Il rimodellamento osseo nei mammiferi ha la funzione di mantenere l'integrità biomeccanica dello scheletro, attraverso la rimozione e la deposizione continua di tessuto osseo. Questo viene realizzato da team di osteoblasti, che depongono tessuto mineralizzato, e osteoclasti, che lo riassorbono (1). Il tasso di rimodellamento è, almeno in parte, controllato dai livelli sierici di un polipeptide secreto dalle ghiandole paratiroidi e denominato ormone paratiroideo (PTH). È da tempo noto che la perdita o la riduzione dei livelli di PTH diminuisce la formazione di osteoblasti ed osteoclasti in esseri umani e roditori (2-4) e l'aumento di PTH, come nell'iperparatiroidismo primario o secondario, aumenta la formazione di osteoclasti ed osteoblasti (5). Più recentemente un polipeptide dalla struttura parzialmente analoga a PTH è stato identificato in tessuti extrascheletrici, e denominato PTH related protein, o PTHrP. Tale proteina ha funzione agonistica nei confronti del recettore per PTH anche se le sue funzioni appaiono essere parzialmente distinte dal paratormone (3).

L'azione di PTH nel controllo del riassorbimento osseo è complessa. PTH stimola l'espressione di Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL), una proteina transmembrana presente negli esseri umani anche in forma solubile, membro della superfamiglia di Tumor Necrosis Factor, necessaria per il differenziamento degli osteoclasti ed il supporto della loro sopravvivenza e dell'attività osteolitica, tramite il legame con un recettore specifico presente sulla superficie dei precursori osteoclastici (6-8).

E' stato quindi proposto che PTH controlli il tasso di rimodellamento osseo attraverso il controllo di RANKL. PTH aumenta anche la produzione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ attraverso la stimolazione di 25-idrossivitamin D-1- α -idrossilasi (9-11); $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e' a sua volta anch'esso un potente stimolatore di RANKL (12). Cambiamenti nei livelli di PTH dunque possono alterare l'espressione di RANKL da soli o mediante l'azione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Tentativi iniziali di identificare gli elementi che controllano la trascrizione di *rankl* in risposta a PTH o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ non hanno portato a risultati convincenti. Kitazawa et al hanno riportato che reporter constructs contenenti fino a 2kb della 5'-flanking region a monte del transcription start site (TSS) di *rankl* vengono stimolati da forskolina e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in una linea cellulare stromale murina (13-15). Questi risultati sono stati difficili da confermare da parte di altri autori usando reporter contenenti fino a 7kb di 5'-flanking region (16-18). In studi piu' recenti abbiamo identificato un enhancer trascrizionale localizzato 76kb upstream dal TSS di *rankl*, che sembra mediare la risposta a PTH e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, usando un approccio che prevede l'utilizzo di costrutti basati su

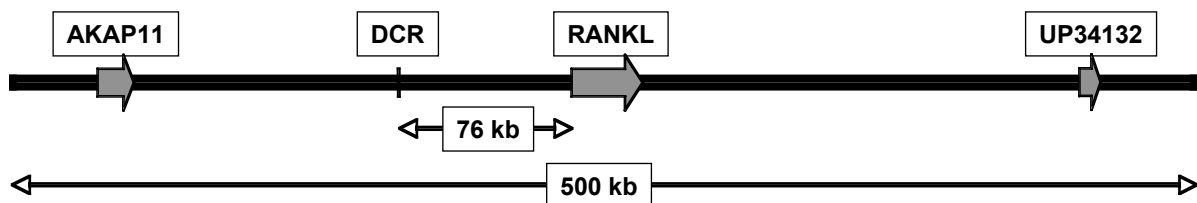


Figura A: La Distal Control Region (DCR) è localizzata 76 kb upstream dal gene *rankl*, in una regione relativamente isolata del genoma.

bacterial artificial chromosomes (BAC), di dimensione molto maggiore ai plasmidi tradizionali ed in grado quindi di contenere al suo interno sequenze nucleotidiche di lunghezza fino a 200 kb (19). In questi studi, sono state individuate, nella regione distale di questo enhancer, sequenze specifiche che legano cAMP response element binding protein (CREB), in seguito a stimolazione con PTH e che sono necessarie per la up-regolazione dell'espressione di *rankl*. E' stato indipendentemente mostrato, utilizzando un'analisi ChIP-on-chip, che la porzione prossimale di questo enhancer lungo 2kb contiene anche un insolito Vitamin D responsive element (VDRE), che media l'azione di 1,25(OH)₂D₃ (20). Data la sua significativa distanza da *rankl*, e la sua abilita' di integrare segnali di diversi ormoni, abbiamo denominato questo enhancer distal control region, o DCR (19,20)

L'importanza di DCR per il controllo della trascrizione di *rankl* da parte di PTH e' stata confermata dalla delezione condizionale di questo enhancer dal genoma murino, seguendo la strategia illustrata in Figura B (19). Abbiamo osservato che topi privi di DCR (DCR^{-/-}) si sviluppano normalmente, e, in contrasto a topi privi di RANKL, non presentano osteopetrosi. Questo nonostante la stimolazione di *rankl* da parte di PTH sia diminuita in modo significativo in cellule stromali midollari provenienti da topi DCR^{-/-} in vitro.

Nello studio qui presente, mostriamo che la delezione di DCR riduce l'espressione di *rankl* nel tessuto osseo e linfoide e riduce la stimolazione di *rankl* da parte di PTH e 1,25(OH)₂D₃ in vivo. I topi DCR^{-/-} mostrano inoltre un aumento della massa ossea e delle caratteristiche biomeccaniche ossee in conseguenza di

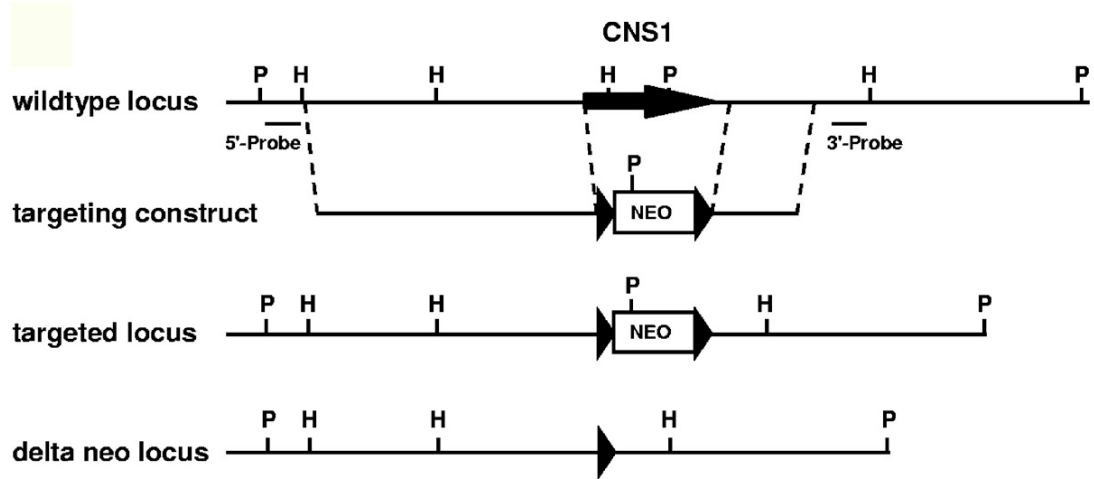


Figura B: Strategia per la delezione di DCR dal genoma murino tramite ricombinazione omologa di un targeting construct e successiva eliminazione della cassetta di selezione NEO tramite topi Flipper

una ridotta formazione di osteoclasti, ed un ridotto rimodellamento osseo.

Questi studi dimostrano che il controllo ormonale di *rankl* da parte di PTH,

tramite DCR, controlla il tasso di rimodellamento osseo.

MATERIALI E METODI

Materiali

PTH umano (1-84) è stato acquistato da Bachem California Inc. (Torrance, CA, USA). PTH bovino (1-34) è stato acquistato da Sigma (St. Louis, MO). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è stato acquistato da Biomol (Plymouth Meeting, PA). Le cellule sono state mantenute in alpha-medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) contenente FBS 10% (HyClone, Logan, UT) e penicillina, streptomicina e glutamina 1% (Sigma).

Studi animali

La generazione dei topi $\text{DCR}^{-/-}$ è stata descritta in precedenza (19). Per ottenere i topi utilizzati in questo studio, l'allele DCR -null è stato sottoposto a backcross in background C57BL/6 per 4-6 generazioni ed i topi eterozigoti $\text{DCR}^{+/-}$ sono stati incrociati per ottenere $\text{DCR}^{+/+}$ e $\text{DCR}^{-/-}$. A topi $\text{DCR}^{+/+}$ e $\text{DCR}^{-/-}$ di 6 mesi è stato iniettato per via intraperitoneale (i.p.) PBS in presenza o in assenza di PTH 1-84 (230 ng/g) o polipropilenglicole in presenza o in assenza di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1 ng/g). Tutti gli studi che hanno coinvolto topi sono stati approvati dall' Institutional Animal Care and Use Committees della University of Arkansas for Medical Sciences e della University of Wisconsin in Madison.

Colture cellulari primarie

Cellule di midollo osseo sono state prelevate da femori di topi $\text{DCR}^{+/+}$ e $\text{DCR}^{-/-}$ dell'età di 2 mesi. Per gli studi time-course e dose-response, le cellule midollari sono state seminate alla densità di 5×10^6 cellule/pozzetto in piastre da 12

pozzetti e coltivate per 10 giorni, dopodichè è stato aggiunto veicolo, PTH (1-34) e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Per i saggi osteoclastogenici le cellule sono state seminate alla densità di $1.5 \cdot 10^6$ cellule/pozzetto in piastre da 24 pozzetti o alla densità di $5 \cdot 10^6$ cellule/pozzetto in piastre da 12 pozzetti. Dopo 3 giorni, PTH (1-34) (10^{-7} M), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8} M) o RANKL e M-CSF (30 ng/ml ciascuno) sono stati aggiunti e le colture sono state incubate per 6 giorni, cambiando il medium ogni 3 giorni. L'ultimo giorno, le cellule sono state fissate e colorate per la fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP), come descritto in precedenza (7) o utilizzate per l'estrazione di RNA.

Analisi dell'RNA

L'RNA totale è stato purificato dalle colture cellulari e dai tessuti usando il reagente Ultraspec (Biotech Laboratories, TX), seguendo le indicazioni del produttore. RT-PCR quantitativa è stata eseguita come descritto precedentemente (19) utilizzando i seguenti primer probe set forniti da Applied Biosystems (Foster City, CA):

RANKL (Mm0041908-m1); IL-6 (Mm00446190-m1); OPG (Mm00435451-m1); Cathepsin K (Mm01255862-g1); A Kinase Anchor Protein 11 (Mm01313936-m1), e ribosomal protein S2 (forward, 5'-CCCAGGATGGCGACGAT-3'; reverse, 5'-CCGAATGCTGTAATGGCGTAT-3'; probe, FAM-5'-TCCAGAG CAGGATCC- 3'-NFQ). SYBR Green quantitative RT-PCR è stata eseguita come descritto precedentemente (21) usando i seguenti primers per RANKL 5'-ATTCAGGTGTCCAACCCTTCC-3', reverse, 5'-TGCTAATGTTCCACGAAATG-3'.

Determinazione della BMD

A partire dall'età di 1 mese, misure sequenziali della densità della massa ossea (BMD) in topi vivi sono state effettuate tramite dual-energy X-ray absorptiometry tramite un densitometro PIXImus Mouse (Lunar, Fitchburg, WI), usando il software fornito dal produttore, come descritto in precedenza (22).

Istomorfometria ossea

Le prime 4 vertebre lombari sono state fissate ed incluse senza previa decalcificazione in metilmetacrilato, come descritto precedentemente (23). L'esame istomorfometrico è stato compiuto con un computer ed una tavoletta grafica (OsteoMetrics, Decatur, GA), interfacciati ad un microscopio Zeiss Axioscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY). La percentuale del perimetro di osso trabecolare ricoperto da osteoblasti cuboidali su tessuto osteoide (osteoblast perimeter) e la percentuale di perimetro di osso trabecolare ricoperto da osteoclasti TRAP-positivi (osteoclast perimeter) sono stati misurati direttamente da operatore, mentre il tasso di formazione ossea per perimetro di osso trabecolare è stato derivato. La terminologia usata è quella raccomandata dalla Histomorphometry Nomenclature Committee dell'American Society for Bone and Mineral Research (24)

Testing biomeccanico

Le proprietà di resistenza alla compressione della sesta vertebra lombare (L6) sono state misurate usando una macchina per test meccanico di materiale a colonna singola ed una cella di carico calibrata (Model 5542: Instron Corp., Grove City, PA), come descritto in precedenza (22).

Markers biochimici

Plasma ed campioni di urina sono stati raccolti da topi DCR^{+/+} e DCR^{-/-} di 5 mesi di età, femmine. DPD e creatinina sono stati quantificati tramite kit ELISA (Metra Biosystems, Quidel, San Diego, CA) ed i valori di DPD sono stati corretti per la creatinina. I livelli di calcio, PTH e osteocalcina sierici sono stati quantificati usando un assay colorimetrico (StanBIO, Boerne, TX), ELISA (Immutopics Inc, san Clemente, CA) o RIA (Metra Biosystems) rispettivamente.

Statistica

I dati sono stati analizzati usando SigmaStat (SPSS Science, Chicago, IL). Tutti i valori sono riportati come media \pm deviazione standard (SD). Le differenze tra medie sono state valutate con test t di Student o 2 way ANOVA.

RISULTATI

La delezione di DCR^{-/-} non causa osteopetrosi.

Topi DCR^{-/-} presentano normale eruzione dentaria (Figura 1A-B) ed assenza dei segni di osteopetrosi, con normali cavità midollari nelle ossa lunghe (Figura 1C-D).

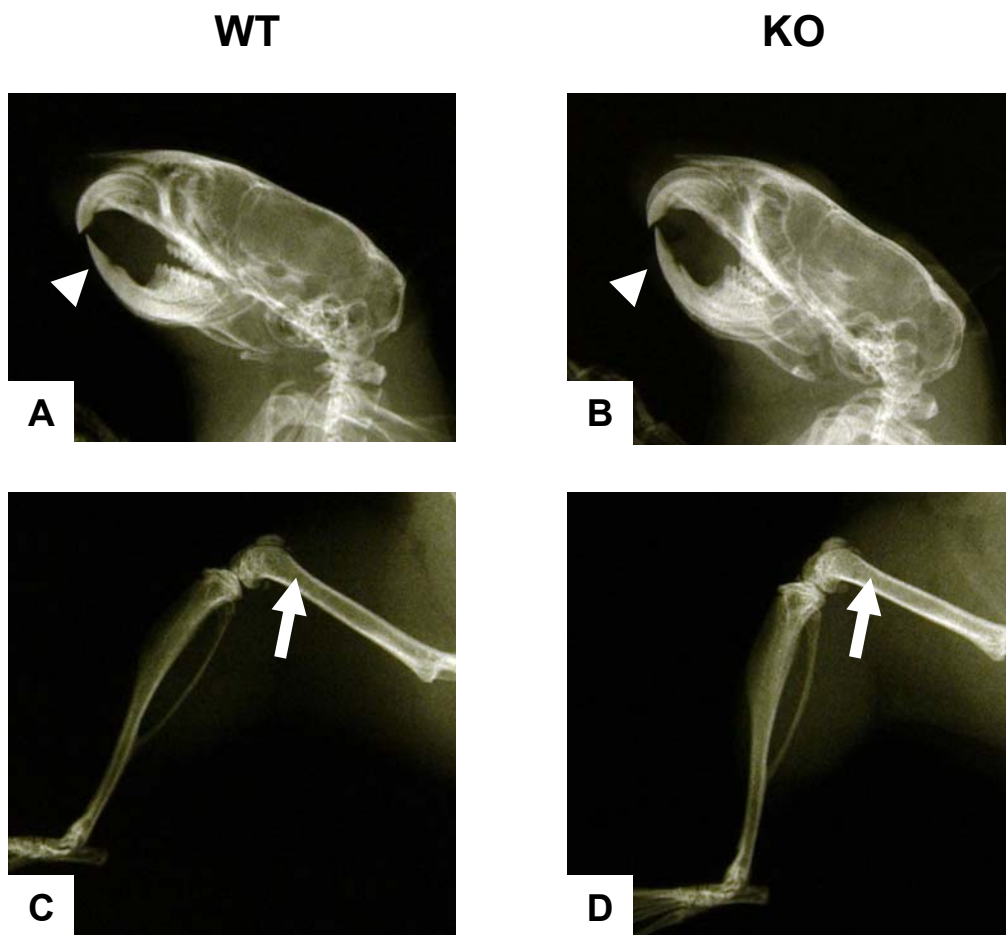


Figura 1. L'assenza di DCR non provoca osteopetrosi.

Proiezione radiografia di topi wild type e DCR^{-/-} in sezione sagittale. Non si evidenziano segni di osteopetrosi ed i topi non presentano differenze in termini di eruzione dentaria (A-B). Le cavità midollari nelle ossa lunghe risultano pervie (C-D).

Il controllo ormonale di rankl è attenuato nelle cellule di topi DCR^{-/-}.

Precedenti lavori hanno mostrato che la risposta di *rankl* a PTH in colture primarie di midollo da topi DCR^{-/-} è diminuita (19). Questi studi erano però eseguiti ad un singolo time-point (24 ore) con una concentrazione massima di PTH. Per determinare se la responsività a PTH fosse differente a time point diversi o a concentrazioni sub-massimali di PTH, abbiamo effettuato studi time course e dose-response in colture primarie di midollo, quantificando mRNA tramite RT-PCR.

PTH ad una concentrazione di 10^{-7} M stimola l'espressione di RANKL in cellule wild-type a partire da 1 ora dal trattamento, con una risposta massima dopo 4 ore; quest'effetto è ridotto significativamente in cellule DCR^{-/-} all'ora 4 (Figura 2A). L'ablazione di DCR non sembra avere effetto sulla soppressione di osteoprotegerina (OPG, un gene controllo) da parte di PTH. Concentrazioni progressivamente elevate di PTH portano ad un aumento progressivo dell'mRNA di RANKL in cellule wild-type, ma questo effetto viene significativamente ridotto in cellule DCR^{-/-} (Figura 2B).

In contrasto, l'inibizione di OPG non è differente tra cellule wild-type e DCR^{-/-} per nessuna concentrazione di PTH.

La precedente analisi di mappatura (19) e ChIP-on chip (20) ha mostrato che anche $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ può utilizzare DCR per controllare la trascrizione di *rankl*. Come mostrato in figura 2C, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimola RANKL in cellule wild-type a tutti i time-points, con una risposta massima dopo 24 ore. La delezione di

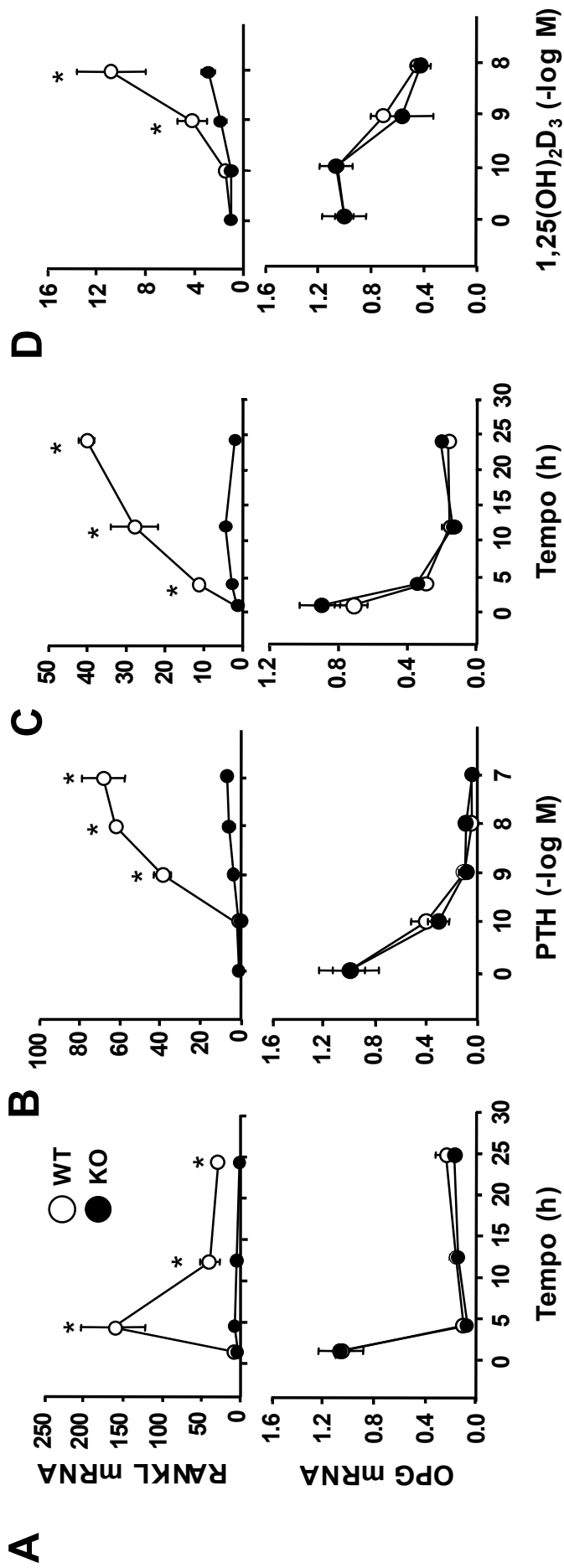


Figura 2. La delezione di DCR riduce la stimolazione di RANKL da parte di PTH e 1,25(OH)₂D₃ in vitro.

RT-PCR quantitativa dell'espressione di RANKL e OPG in colture midollari primarie trattate con (A) 10⁻⁷ M PTH o (C) 10⁻⁸ M 1,25(OH)₂D₃ per i tempi indicati, o trattati con concentrazioni progressivamente maggiori di (B) PTH o (D) 1,25(OH)₂D₃ per 4 ore. I valori di RANKL e OPG sono stati normalizzati per la proteina ribosomiale S2. I valori rappresentano la media ± DS espressa relativamente alla coltura di controllo. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti in triplicato. *, P < 0.05 vs wild type.

DCR comunque riduce la risposta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a 4, 12 e 24 ore (Figura 2C). In contrasto la soppressione di un gene controllo, OPG, da parte di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, non sembra essere affetta dall'assenza di DCR. Una significativa riduzione nella stimolazione di DCR da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ si nota anche alle due concentrazioni più elevate, di nuovo senza differenze nella risposta di OPG tra i due genotipi (Figura 2D).

Considerati globalmente questi risultati dimostrano che la delezione di DCR riduce la risposta del gene *rankl* a PTH e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in colture midollari primarie.

Per determinare se questa riduzione nella risposta del gene *rankl* fosse sufficiente ad alterare l'osteoclastogenesi in topi $\text{DCR}^{-/-}$, cellule da colture primarie di topi wild type e knock out sono state trattate con PTH e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e l'osteoclastogenesi è stata quantificata contando le cellule multinucleate TRAP

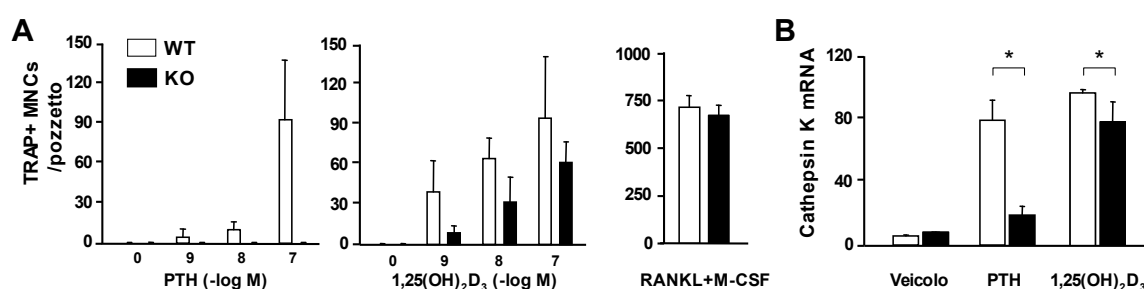


Figura 3. La mancanza di DCR riduce la formazione di osteoclasti da parte di PTH e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in vitro.

(A) Cellule di midollo osseo di topi $\text{DCR}^{-/-}$ e wild type sono state trattate con concentrazioni crescenti di PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o con RANKL+M-CSF (30 ng/ml), e cellule TRAP-positive contenenti almeno 4 nuclei sono state contate dopo 6 giorni. (B) RT-PCR quantitativa dell'espressione di cathepsina K in colture midollari dopo stimolazione con 10^{-7} M PTH o 10^{-8} M $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ per 6 giorni. I valori sono la media di colture in triplicato \pm DS. *, $P < 0.05$ vs wild type.

positive. Concentrazioni crescenti di PTH aumentano il numero di osteoclasti nelle colture wild type in modo dose-dipendente (Figura 3A). Questa risposta è però assente nelle colture DCR^{-/-} (Figura 3A). La delezione di DCR riduce anche l'osteoclastogenesi indotta da 1,25(OH)₂D₃ anche se in misura minore. La ridotta formazione di osteoclasti non è da ascrivere ad un ridotto numero di precursori in quanto RANKL e M-CSF stimolano il differenziamento osteoclastico in modo simile in colture cellulari da topi di entrambi i genotipi.

In colture parallele abbiamo quantificato la formazione di osteoclasti misurando il trascritto per il gene Cathepsin K. Cathepsin K è ridotto in colture provenienti da topi DCR^{-/-} trattate con PTH (Figura 3B). L'ablazione di DCR diminuisce anche la risposta a 1,25(OH)₂D₃, anche se in misura inferiore.

Questi risultati dimostrano che la perdita di DCR riduce la stimolazione ormonale dell'osteoclastogenesi in vitro.

Il controllo ormonale di RANKL è ridotto in vivo

Abbiamo mostrato in precedenza che DCR è necessario per l'aumento dei livelli di trascritto di *rankl* nel tessuto osseo in vivo dopo 7 giorni di dieta priva di calcio, una condizione che aumenta PTH e 1,25(OH)₂D₃ (19).

Comunque non era chiaro se l'aumento di RANKL in questa situazione fosse dovuto ad un controllo diretto di *rankl* da parte di PTH 1,25(OH)₂D₃ o entrambi oppure attraverso fattori downstream regolati da questi ormoni. Per determinare se DCR sia richiesto per il controllo di RANKL da parte di un aumento acuto di

uno di questi due ormoni, è stata eseguita un'iniezione di PTH o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in topi wild type o $\text{DCR}^{-/-}$ e l'espressione di RANKL è stata quantificata nel tessuto osseo 1 ora dopo l'iniezione di PTH e 6 ore dopo quella di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La perdita di DCR diminuisce in modo significativo la risposta del gene *rankl* ad entrambi gli ormoni (Figura 4A e B). Geni controllo, IL-6 per PTH e CYP24 per $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ rispondono in maniera identica in entrambi i genotipi (Figura 4A e B). Questi risultati sono in accordo con la ridotta risposta in vitro e sug-

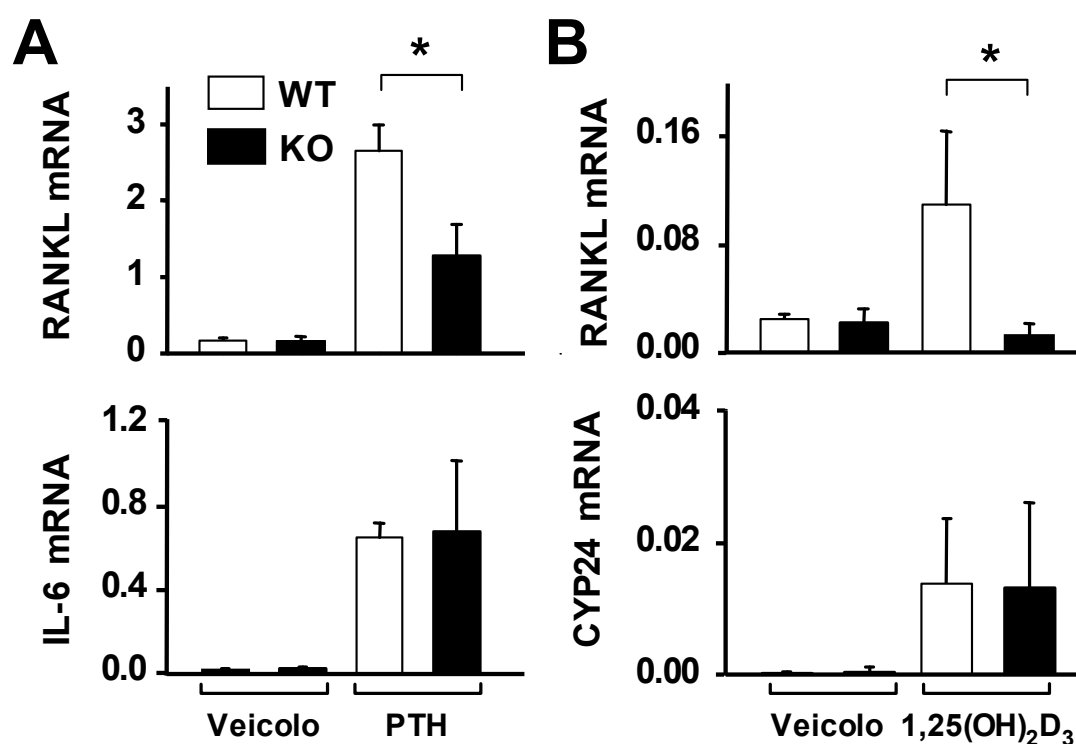


Figura 4. La delezione di DCR riduce la stimolazione di RANKL da parte di ormoni calciotropici in vivo.

RT-PCR quantitativa dell'espressione di RANKL, IL-6 o CYP24 in calvaria di topi wild type o $\text{DCR}^{-/-}$ dopo somministrazione intraperitoneale di PTH (in PBS) o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (in polipropilene glicole). (A) Topi maschi di 6 mesi di età iniettati con PTH 1-84 (230 ng/g) e sacrificati dopo 1 ora. (B) Topi maschi e femmine di 3 mesi di età iniettati con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1 ng/g) 6 ore prima del sacrificio). I valori rappresentati sono la media di 3-6 topi/gruppo \pm DS. *, $P < 0.05$ vs wild type.

geriscono che DCR sia davvero necessario per il controllo diretto di RANKL da parte degli ormoni calciotropici.

L'espressione di RANKL è ridotta nel tessuto osseo e linfoide dei topi DCR^{-/-}

Successivamente abbiamo determinato se l'ablazione di DCR alterasse la quantità di mRNA del gene *rankl* in tessuti che esprimono alti livelli di questo gene, come osso e tessuti linfoidei. All'età di 1 mese, l'espressione di RANKL nel tessuto osseo non è ridotta in modo significativo dall'assenza di DCR

(Figura 5A). In contrasto, l'espressione di RANKL è ridotta di circa il 40% nel timo e milza di topi DCR^{-/-}. All'età di 5 mesi comunque l'espressione di RANKL in topi knock out è ridotta di circa 40% nel tessuto osseo e 25% nella milza (Figura 5B). Il timo non è stato esaminato nei topi di 5 mesi, essendo già andato in contro ad atrofia a quell'età. Come controllo abbiamo quantificato l'espressione di AKAP11, un gene collocato immediatamente a monte di *rankl* sul cromosoma 14. Trascritti di questo gene non presentano differenze tra i due genotipi.

Questi risultati dimostrano che DCR contribuisce all'espressione di RANKL nell'osso e tessuti linfoidei.

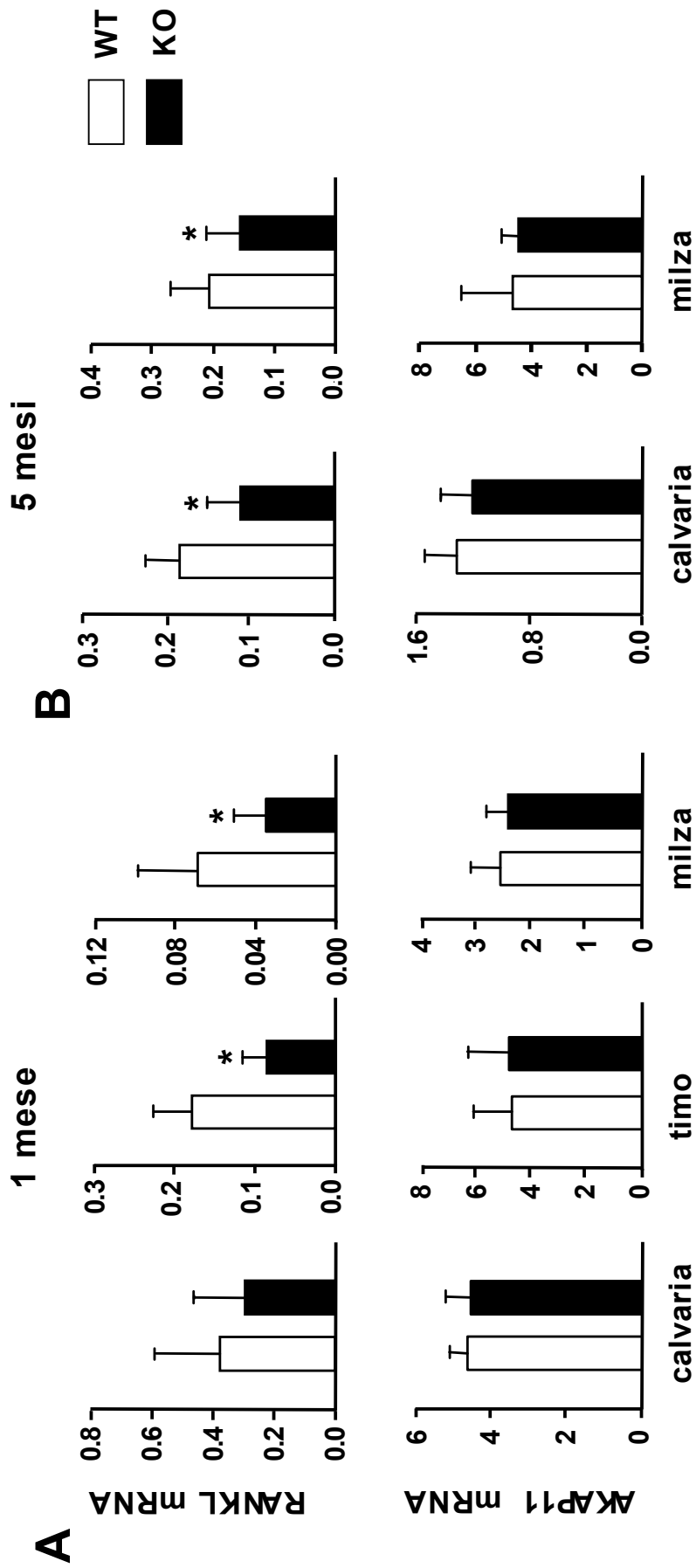


Figura 5. La delezione di DCR riduce l'espressione di RANKL nel tessuto osseo e nei tessuti linfoidi. Analisi RT-PCR quantitativa di RANKL e AKAP11 in calvaria, milza e timo di animali wild type e DCR^{-/-} a (A) 1 o (B) 5 mesi di età. I valori sono la media di 9-18 topi/gruppo \pm DS. * $P < 0.05$ vs wild type.

La massa e la resistenza ossea sono elevate nei topi *DCR^{-/-}*

Per determinare se la riduzione dell'espressione di RANKL nei topi *DCR^{-/-}* risulti in cambiamenti della massa ossea, è stata misurata la densità ossea miner-

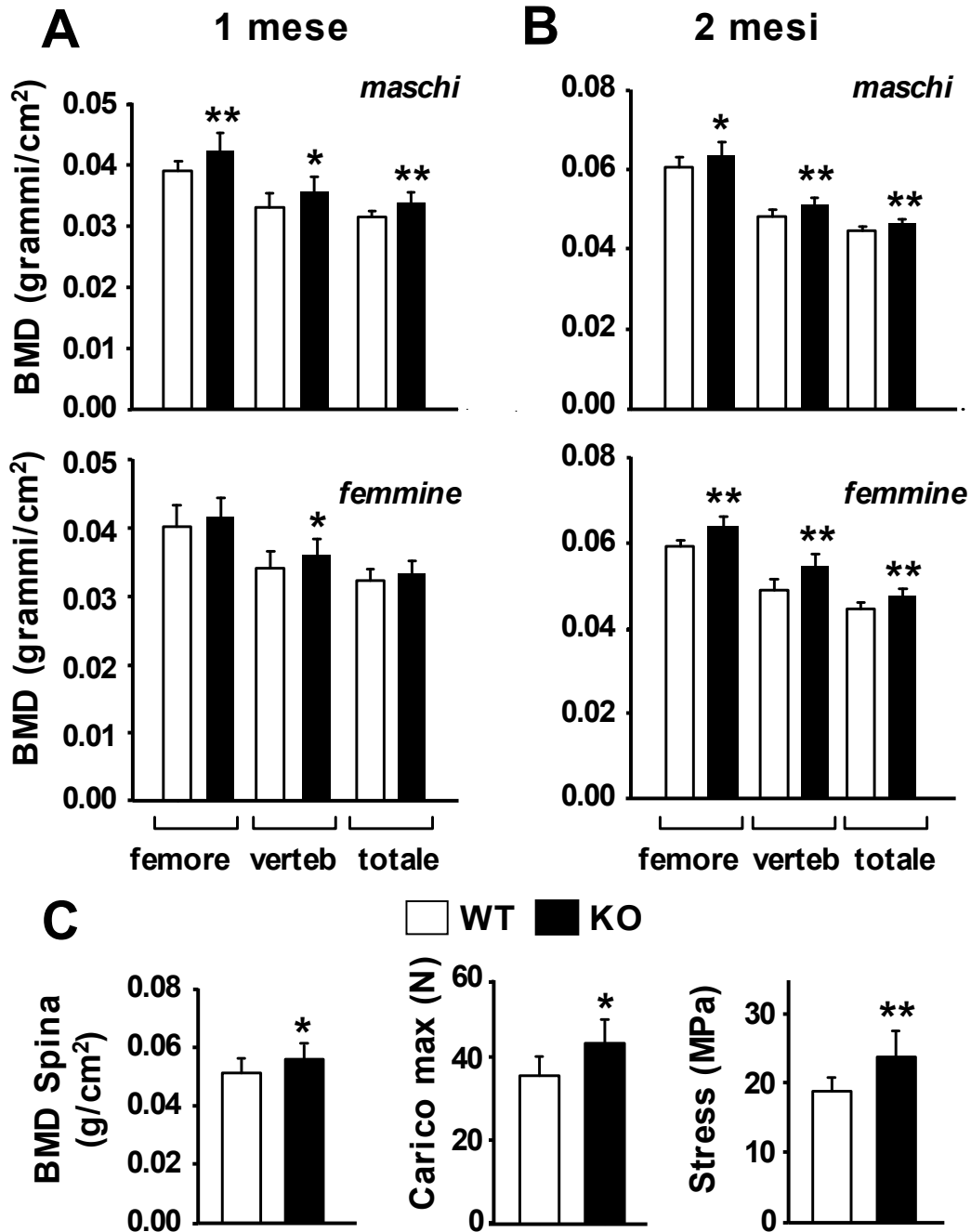


Figura 6. BMD e resistenza meccanica sono aumentate in topi privi di DCR.

(A) BMD femorale, vertebrale e total body di topi 1 mese di età wild type e *DCR^{-/-}*. (B) BMD della medesima coorte di animali a 2 mesi di età. (C) BMD vertebrale e proprietà meccaniche della vertebra lombare L6 (carico massimo e stress) di animali maschi wild type e *DCR^{-/-}*. I valori sono la media di 10-16 topi/gruppo \pm DS. * $P < 0.01$ vs wild type.

ale (BMD). BMD è elevata in topi DCR^{-/-} maschi di 1 mese di età in tutti i siti ossei, sebbene sia elevata solo a livello vertebrale nelle femmine (Figura 6A). A 2 mesi di età, BMD è elevata in tutti i siti in entrambi i sessi, con un incremento del 9% nelle femmine a livello vertebrale (Figura 6B). In accordo con l'aumento della BMD, la vertebra lombare L6 di topi DCR^{-/-} maschi di 6 mesi di età mostra un incremento del 26% nella resistenza meccanica alla compressione, presente anche quando normalizzata per la dimensione ossea (Figure 6C). Perciò l'ablazione di DCR aumenta non solo la massa ossea, ma anche le proprietà biomeccaniche dell'osso stesso.

Il rimodellamento osseo è ridotto in topi DCR^{-/-}.

Infine, per stabilire la base cellulare dell'aumento della massa ossea osservato nei topi DCR^{-/-}, abbiamo effettuato istomorfometria sul tessuto osseo trabecolare vertebrale in topi di 5 mesi di età. In accordo con l'analisi della BMD, l'area ossea trabecolare è significativamente elevata in topi privi di DCR (Figure 7A, I e J). L'ampiezza trabecolare ed il numero di trabecole è aumentato, mentre si osserva una diminuzione della separazione tra le trabecole (Figura 6B-D). Il perimetro osteoclastico ed osteoblastico sono ridotti, così come il tasso di formazione ossea e la frequenza di attivazione (Figura 7E-H). L'ampiezza corticale non è differente tra topi wild type e DCR^{-/-} (Figura 7K). In accordo con i cambiamenti nel perimetro osteoclastico i livelli di deossipiridinolina urinaria (DPD), un marker di riassorbimento osseo, sono ridotti in modo significativo in topi DCR^{-/-} (Figura 7L). In contrasto, non vi è differenza nei

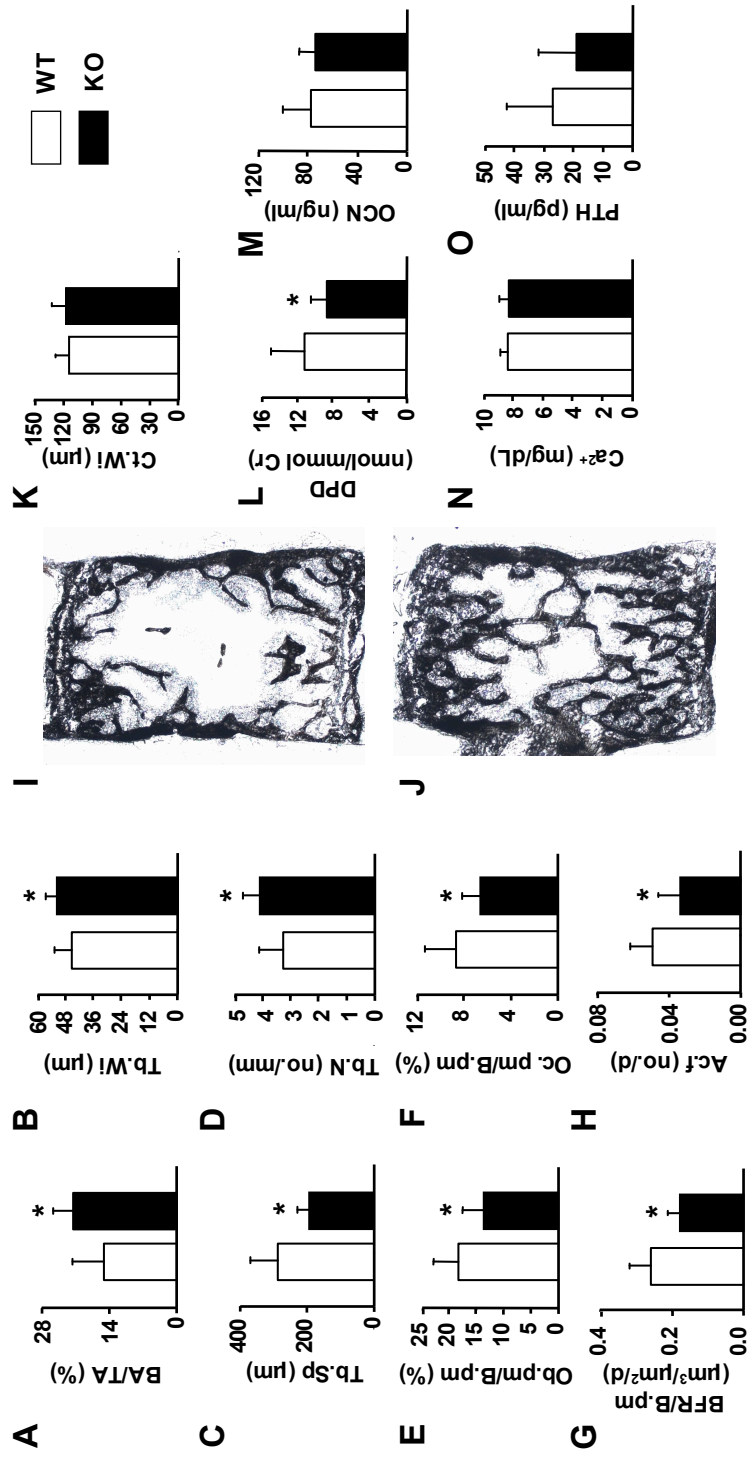


Figura 7. La delezione di DCR riduce il rimodellamento osseo.

Sezioni vertebrali (L1-4) di topi femmine di 5 mesi di età, wild type e DCR^{-/-}: (A) volume osseo per volume totale (BV/TV), (B) Spessore trabecolare (Tb.Th), (C) separazione tra le trabecole (Tb.Sp), (D) numero di trabecole (Tb.N), (E) perimetro osteoblastico (Ob.S/BS), (F) perimetro osteoclastico (Oc.S/BS), (G) frequenza di attivazione (Ac.F), (H) tasso di formazione ossea per superficie ossea (BFR/BS), e (K) spessore corticale (Ct.Wi).

Sezioni longitudinali non decalcificate di topi (I) wild type e (J) DCR^{-/-} (sezioni non colorate osservate senza coverslip a 25x). (L) DPD urinario. (M) Osteocalcina sierica, (N) calcio e (O) livelli di PTH. I valori rappresentano la media di 12-18 topi/gruppo \pm DS. * $P < 0.05$ vs wild type.

livelli di osteocalcina circolante, un marker di formazione ossea (Figura 7M).

L'omeostasi del calcio non è alterata nei topi DCR^{-/-}, essendo la calcemia e i livelli di PTH comparabili in entrambi i genotipi (Figura 7N e O).

In conclusione, questi risultati dimostrano che la delezione di DCR riduce il turnover osseo nei topi adulti.

DISCUSSIONE

I risultati qui presentati mostrano che la perdita di DCR diminuisce la risposta del gene *rankl* a PTH e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e risulta in un ridotto rimodellamento osseo, un effetto che è associato a sua volta con un aumento della massa e resistenza meccanica del tessuto osseo. L'aumento della massa ossea è limitato all'osso trabecolare, considerando che lo spessore corticale non risulta alterato in questo modello, e avviene nonostante la riduzione del riassorbimento e formazione ossea. L'aumento nel numero e l'ampiezza delle trabecole e la riduzione dello spazio che le separa, indica che la massa ossea è elevata, per lo meno in parte, per il mancato riassorbimento di colonne di spongiosa primaria durante lo sviluppo e la crescita dei topi $\text{DCR}^{-/-}$.

Se l'aumento della massa ossea fosse dovuto ad un rimodellamento osseo non più bilanciato in favore della formazione ossea, la differenza in massa ossea causata dalla mancanza di DCR dovrebbe aumentare nel tempo. La differenza in BMD tra wild type e $\text{DCR}^{-/-}$ rimane però relativamente costante tra 2 e 6 mesi di età (Figura 5), indicando che il rimodellamento osseo rimane in equilibrio, nonostante la riduzione dei processi di formazione e rimodellamento. I risultati del nostro studio sono in accordo con l'idea che DCR medi gli effetti del PTH sul rimodellamento osseo. I cambiamenti nel turnover osseo nei topi $\text{DCR}^{-/-}$ sono simili a quelli osservati nei topi $\text{PTH}^{-/-}$ (3), così come quelli in ratti paratiroidectomizzati (4) e in pazienti affetti da ipoparatiroidismo (2).

Se RANKL è ridotto in topi $\text{DCR}^{-/-}$ poiché tale enhancer media gli effetti di PTH, allora RANKL dovrebbe essere ridotto anche in queste situazioni. Sebbene l'espressione di RANKL non sia stata misurata in pazienti con ipopa-

ratiroidismo, la quantità di mRNA per RANKL nel tessuto osseo è ridotto dopo paratiroidectomia nei ratti (4), ma non nei topi PTH^{-/-} (29). In quest'ultimo frangente il mantenimento di normali livelli di RANKL pare esser causato da una compensazione da parte di PTHrP, considerando che l'aploinsufficienza di PTHrP combinata con il deficit di PTH riduce drammaticamente i livelli di RANKL (29). Dato che DCR media alcuni degli effetti esercitati da 1,25(OH)₂D₃ su RANKL, è possibile che anche gli effetti di quest'ormone sul rimodellamento osseo siano mediati da DCR. È comunque noto che una dieta che riporti la calcemia a valori normali in topi privi di VDR, porta anche ad un numero normale di osteoclasti ed osteoblasti su osso trabecolare (30) e ciò suggerisce che VDR, e quindi la sua azione su DCR, non sia richiesto per il rimodellamento osseo basale.

L'ablazione di DCR riduce sia il perimetro degli osteoblasti sia degli osteoclasti. Questi risultati dimostrano che il normale coordinamento tra riassorbimento e formazione ossea, denominato coupling, rimane intatto in topi DCR^{-/-}. Mentre i meccanismi che sono responsabili di questo coordinamento non sono noti, due diverse teorie sono state proposte. Secondo la prima il rilascio di fattori, come TGFβ, dalla matrice ossea come conseguenza dell'attività osteoclastica porta al reclutamento dei progenitori degli osteoblasti e promuove il loro differenziamento (31). L'osteoblastogenesi pertanto, in questo modello "in serie", è una conseguenza dell'osteoclastogenesi (32).

Considerate le prove che l'osteoclastogenesi dipenda da cellule della linea osteoblastica, è stato in precedenza anche proposta l'esistenza di un secondo modello "in parallelo", in cui il coupling risulti dalla combinazione di osteoblastogenesi e osteoclastogenesi (32). Data l'abbondanza di evidenza scientifica che dimostra che RANKL controlla il differenziamento e la funzione osteoclastica, ma è privo di effetti sugli osteoblasti (33), la diminuzione del numero di osteoblasti e della formazione ossea riscontrata in topi *DCR^{-/-}* è da addebitarsi con ogni probabilità alla diminuzione degli osteoclasti, del riassorbimento osseo, o entrambi e dunque ciò sembra fornire un supporto a favore del modello in serie. Come alternativa la riduzione in osteoblasti potrebbe essere il risultato di diminuiti livelli di un fattore sconosciuto prodotto dagli osteoclasti che promuova l'osteoblastogenesi (34).

Dato che la delezione di *DCR* riduce la risposta di *rankl* a ormoni calciotropici in colture di cellule midollari stromali, è verosimile che i ridotti livelli di RANKL riscontrati nel tessuto osseo siano dovuti alla medesima popolazione cellulare. Comunque la nostra osservazione che i livelli di mRNA di RANKL sono ridotti anche nei tessuti linfoidei, unitamente a studi precedenti che mostrano che linfociti T attivato esprimono quantitativi significativi di RANKL (35), lascia aperta la possibilità che *DCR* contribuisca all'espressione di RANKL in questo tipo cellulare. Inoltre il reperto che l'espressione di RANKL nel midollo osseo non viene alterata dalla perdita di linfociti T indica che, almeno in condizioni basali, questo tipo cellulare non rappresenta una delle fonti principali di RANKL nel tessuto osseo (36).

Sebbene la delezione di DCR sembri avere un effetto simile sulla stimolazione di *rankl* da parte di PTH e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, la formazione di osteoclasti in vitro in risposta a PTH e' soppressa in misura maggiore di quanto non lo sia quella indotta da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La ragione di questa differenza non e' chiara, ma potrebbe essere dovuta al diverso timeframe degli endpoint considerati.

Il saggio osteoclastogenico infatti richiede 6 giorni di esposizione continua a questi ormoni, mentre l'analisi dell'espressione genica in vitro arriva al massimo a 24 ore. Dunque e' possibile che a timepoints piu' tardivi, quali quelli considerati per l'osteoclastogenesi, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sia più efficace di PTH a stimolare l'espressione di *rankl* in assenza di DCR, forse attraverso i VDRE prossimali identificati precedentemente (21).

E' importante notare come la calcemia sia normale nei topi $\text{DCR}^{-/-}$, il che indica che il controllo di *rankl* da parte di PTH non e' necessario per l'omeostasi del calcio in condizioni basali. Sebbene il ridotto riassorbimento osseo causato dall'ablazione di DCR debba aver ridotto il contributo dello scheletro ai livelli di calcio nel circolo ematico, il contributo dall'assorbimento intestinale e riassorbimento renale non dovrebbero essere stati diminuiti. Inoltre e' verosimile che i livelli di calcio nel plasma non siano diminuiti e PTH non sia elevato nei topi $\text{DCR}^{-/-}$ poiche' anche il fabbisogno di calcio e' ridotto come risultato della ridotta formazione ossea, mantenendo pertanto l'omeostasi, per lo meno in condizioni basali. Dato che l'allattamento aumenta il riassorbimento, verosimilmente attraverso PTHrP (37), sarebbe ragionevole prevedere una diminuzione della capacita' di allattamento in topi $\text{DCR}^{-/-}$. Topi $\text{DCR}^{-/-}$ partoriscono

però animali simili al momento dello svezzamento per taglia e peso agli animali wild type . Va notato comunque che la dimensione dell'animale non è necessariamente alterata da una ridotta abilità di riassorbimento osseo nelle madri poiché ciò non accade con delezione specifica di PThrP dalla ghiandola mammaria, manovra che riduce il riassorbimento osseo (37).

La resistenza meccanica ossea è aumentata in topi DCR^{-/-} all'età di 6 mesi. Assumendo che uno degli scopi del rimodellamento osseo sia il mantenimento della resistenza meccanica, ci si potrebbe aspettare che riducendo il rimodellamento osseo si ottenga ad un accumulo del danno da usura, con riduzione delle proprietà meccaniche nel tempo. Se danno da usura è presente nei topi di 6 mesi analizzati nel nostro studio, questo deve essere stato efficacemente compensato dall'aumento in massa ossea. Studi ulteriori saranno comunque richiesti per stabilire la presenza e l'estensione di microdamage in topi DCR^{-/-} e se le proprietà meccaniche peggiorino con l'età.

Nonostante i risultati ottenuti, è probabile che ulteriori response element esistano, poiché la delezione di DCR non ha completamente abolito la risposta agli ormoni calciotropici. È possibile che tali elementi includano i response elements a cAMP e VDRE localizzati nel promoter prossimale (14-16,38), ma è più probabile che la risposta residua sia mediata dai siti multipli, ed altamente conservati per CREB e i VDR identificati recentemente tramite analisi ChIP-on Chip e studi ChIP diretti (21,39). Ulteriori delezioni selettive di questi enhancers saranno necessarie per rispondere a questa domanda in modo definitivo.

In conclusione i nostri risultati dimostrano che l'enhancer DCR integra segnali da diversi ormoni ed e' un elemento regolatore chiave del rimodellamento osseo. L'aumento della massa ossea e delle proprieta' meccaniche in topi DCR^{-/-} indica che i meccanismi molecolari tramite i quali DCR opera possono rappresentare un target terapeutico potenziale per ridurre il turnover osseo. Comunque, come nel caso di altre terapie anti-riassorbitive, sarà importante determinare le conseguenze della soppressione del rimodellamento a lungo termine. Ulteriori studi saranno inoltre necessari per determinare il ruolo di DCR nella perdita ossea nell'iperparatiroidismo. Per concludere, e' stato proposto che una risposta ottimale alle terapie anaboliche con PTH intermittente richieda stimolazione del riassorbimento osseo (34); topi DCR^{-/-} rappresentano un tool unico con il quale testare questa idea.

BIBLIOGRAFIA

1. Parfitt AM 2005 Modeling and Remodeling: How Bone Cells Work Together. In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FH, eds. Vitamin D. 2nd Edition ed. San Diego: Academic Press Inc.; 497-513
2. Langdahl BL, Mortensen L, Vesterby A, Eriksen EF, Charles P 1996 Bone histomorphometry in hypoparathyroid patients treated with vitamin D. *Bone* 18:103-108
3. Miao DS, He B, Lanske B, Bai XY, Tong XK, Hendy GN, Goltzman D, Karaplis AC 2004 Skeletal abnormalities in Pth-null mice are influenced by dietary calcium. *Endocrinology* 145:2046- 2053
4. Ueno Y, Shinki T, Nagai Y, Murayama H, Fujii K, Suda T 2003 In vivo administration of 1,25- dihydroxyvitamin D-3 suppresses the expression of RANKL mRNA in bone of thyroparathyroidectomized rats constantly infused with PTH. *J Cell Biochem* 90:267-277
5. Parfitt AM 2003 Renal bone disease: a new conceptual framework for the interpretation of bone histomorphometry. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:387-403
6. Lee SK, Lorenzo JA 1999 Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone

marrow cultures: Correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 140:3552-3561

7. Fu Q, Jilka RL, Manolagas SC, O'Brien CA 2002 Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NFkappa B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 277:48868-48875

8. Clowes JA, Riggs BL, Khosla S 2005 The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *Immunol Rev* 208:207-227

9. Fraher LJ, Avram R, Watson PH, Hendy GN, Henderson JE, Chong KL, Goltzman D, Morley P, Willick GE, Whitfield JF, Hodsman AB 1999 Comparison of the biochemical responses to human parathyroid hormone-(1-31)NH₂ and hPTH-(1-34) in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2739-2743

10. Horiuchi N, Suda T, Takahashi H, Shimazawa E, Ogata E 1977 In vivo evidence for the intermediary role of 3',5'-cyclic AMP in parathyroid hormone-induced stimulation of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis in rats. *Endocrinology* 101:969-974

11. Shen V, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Dempster DW 1995 Short-term changes in histomorphometric and biochemical turnover markers and bone mineral density in estrogen-and/or dietary calcium-deficient rats. *Bone* 16:149-156

12. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio, Udagawa N, Takahashi N, Suda T 1998 Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3597-3602
13. Mori K, Kitazawa R, Kondo T, Maeda S, Yamaguchi A, Kitazawa S 2006 Modulation of mouse RANKL gene expression by Runx2 and PKA pathway. *J Cell Biochem* 98:1629-1644
14. Kitazawa R, Kitazawa S 2002 Vitamin D-3 augments osteoclastogenesis via vitamin D-responsive element of mouse RANKL gene promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 290:650-655
15. Kitazawa S, Kajimoto K, Kondo T, Kitazawa R 2003 Vitamin D-3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter. *J Cell Biochem* 89:771-777
16. O'Brien CA, Kern B, Gubrij I, Karsenty G, Manolagas SC 2002 Cbfa1 does not regulate RANKL gene activity in stromal/osteoblastic cells. *Bone* 30:453-462
17. Fan X, Roy EM, Murphy TC, Nanes MS, Kim ST, Pike JW, Rubin J 2004 Regulation of RANKL promoter activity is associated with histone remodeling in murine bone stromal cells. *J Cell Biochem* 93:807-818

18. Kabe Y, Yamada J, Uga H, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H 2005 NF-Y is essential for the recruitment of RNA polymerase II and inducible transcription of several CCAAT box-containing genes. *Mol Cell Biol* 25:512-522
19. Fu Q, Manolagas SC, O'Brien CA 2006 Parathyroid Hormone Controls Receptor Activator of NF- κ B Ligand Gene Expression via a Distant Transcriptional Enhancer. *Mol Cell Biol* 26:6453-6468
20. Kim S, Yamazaki M, Zella LA, Shevde NK, Pike JW 2006 Activation of Receptor Activator of NF- κ B Ligand Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is Mediated through Multiple Long-Range Enhancers. *Mol Cell Biol* 26:6469-6486
21. Zella LA, Kim S, Shevde NK, Pike JW 2006 Enhancers Located within Two Introns of the Vitamin D Receptor Gene Mediate Transcriptional Autoregulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D3. *Mol Endocrinol* 20:1231-1247
22. O'Brien CA, Jilka RL, Fu Q, Stewart S, Weinstein RS, Manolagas SC 2005 IL-6 is not required for parathyroid hormone stimulation of RANKL expression, osteoclast formation, and bone loss in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E784-E793
23. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC 1998 Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by

glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102:274-282

24. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR 1987 Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2:595-610

25. Miao D, Li J, Xue Y, Su H, Karaplis AC, Goltzman D 2004 Parathyroid hormone-related peptide is required for increased trabecular bone volume in parathyroid hormone-null mice. *Endocrinology* 145:3554-3562

26. Amling M, Priemel M, Holzmann T, Chapin K, Rueger JM, Baron R, Demay MB 1999 Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* 140:4982-4987

27. Bonewald LF, Mundy GR 1990 Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res* 250:261-276

28. Manolagas SC, Jilka RL, Bellido T, O'Brien CA, Parfitt AM 1996 Interleukin-6-type cytokines and their receptors. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of bone biology*. Academic Press, Inc.; 701-713

29. Mori K, Le GB, Berreur M, Riet A, Moreau A, Blanchard F, Chevalier C, Guisle-Marsollier I, Leger J, Guicheux J, Masson M, Gouin F, Redini F, Hey-

mann D 2007 Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B. *J Pathol* 211:555-562

30. Martin TJ, Quinn JM, Gillespie MT, Ng KW, Karsdal MA, Sims NA 2006 Mechanisms involved in skeletal anabolic therapies. *Ann N Y Acad Sci* 1068:458-470

31. VanHouten JN, Dann P, Stewart AF, Watson CJ, Pollak M, Karaplis AC, Wysolmerski JJ 2003 Mammary-specific deletion of parathyroid hormone-related protein preserves bone mass during lactation. *J Clin Invest* 112:1429-1436

32. Kanematsu M, Yoshimura K, Takaoki M, Sato A 2002 Vector-averaged gravity regulates gene expression of receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand and osteoprotegerin in bone marrow stromal cells via cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Bone* 30:553-558

33. Kim S, Yamazaki M, Shevde NK, Pike JW 2007 Transcriptional control of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand by the protein kinase A activator forskolin and the transmembrane glycoprotein 130-activating cytokine, oncostatin M, is exerted through multiple distal enhancers. *Mol Endocrinol* 21:197-214

INDICE

Introduzione.....	5
Materiali e Metodi.....	10
Risultati.....	15
Discussione.....	28
Bibliografia.....	35

