



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA

SCUOLA DI DOTTORATO DI
SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

XXIV° CICLO

TITOLO DELLA TESI

*ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI RUNX-2 E DELLA
DENSITA' MINERALE OSSEA IN UNA POPOLAZIONE
DI GIOVANI E ADULTI SANI*

S.S.D MED/09

Coordinatore:

Prof. Enzo Bonora

Tutor:

Dr. Luca Dalle Carbonare

Dottorando
Dr. Mirko Zanatta

*.....a mia moglie Roberta
e ai miei figli Giovanni e Maria Chiara
per avermi sempre saputo aspettare*

SOMMARIO

1	SVILUPPO DELLO SCHELETRO	4
1.1	PERIODO FETALE E PROCESSO DI OSSIFICAZIONE	4
1.2	INFANZIA E ADOLESCENZA	6
1.3	INVECCHIAMENTO.....	7
1.4	RUOLO DELLA GENETICA, DEL SESSO E DELL'ETNIA	8
2	IL DIFFERENZIAMENTO OSTEOLASTICO	10
2.1	LE CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI.....	10
2.2	DIFFERENZIAMENTO OSTEOLASTICO	13
3	LA FAMIGLIA RUNX.....	15
3.1	RUNX-2	15
3.2	FUNZIONE BIOLOGICA	17
3.3	RUNX-2 E PATOLOGIA OSSEA	22
3.4	RUNX-2 E TURN-OVER OSSEO	23
4	SCOPO DELLA TESI.....	26
5	MATERIALI E METODI.....	27
5.1	SOGGETTI, DENSITOMETRIA.....	27
5.2	ISOLAMENTO DELLE CELLULE	28
5.3	ESTRAZIONE DELL'RNA	28
5.4	RETROTRASCRIZIONE	29
5.5	REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION	29
5.6	VALORE DEL Ct	31
6	ANALISI STATISTICA.....	31
7	RISULTATI.....	32
7.1	POPOLAZIONE DI STUDIO E BMD	32
7.2	ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI <i>Runx-2</i>	34
8	DISCUSSIONE.....	38
9	CONCLUSIONI.....	42
10	BIBLIOGRAFIA.....	43

1 SVILUPPO DELLO SCHELETRO

Lo scheletro è sottoposto nel corso della vita ad un continuo rinnovamento con caratteristiche diverse a seconda dell'età, del sesso, della razza e delle condizioni di salute dell'individuo.

1.1 PERIODO FETALE E PROCESSO DI OSSIFICAZIONE

Lo studio dello sviluppo fetale è comprensibilmente limitato dalla difficoltà di avere dati in vivo e spesso si rifà a studi su modelli animali, sebbene non tutto quello che si apprende da questo tipo di studi sia poi applicabile all'uomo. Il metabolismo minerale fetale ha come unico scopo quello di incontrare le necessità specifiche dello sviluppo dell'organismo, quali il mantenimento di livelli adeguati di calcio extracellulare e degli altri ioni necessari per la mineralizzazione completa dello scheletro prima della nascita. La mineralizzazione si verifica nell'ultima parte del periodo gestazionale quando l'80% dei 30 g di calcio ritenuti necessari viene accumulato solo nell'ultimo trimestre (1).

Sono stati studiati, invece, con molta attenzione e in modo approfondito i processi di ossificazione. Lo sviluppo dello scheletro è un processo complesso, ben coordinato e sostenuto dalle cellule staminali mesenchimali (MSCs) che possono differenziare in osteoblasti o in condrociti.

Il differenziamento osteoblastico avviene nelle aree sottoposte ad un processo di ossificazione membranosa, come il cranio, i mascellari, la mandibola e le zone subperiostali delle ossa lunghe. Il differenziamento condrocitico, invece, si verifica nelle rimanenti ossa dove si forma uno stampo cartilagineo sul quale avviene in seguito la definitiva ossificazione (ossificazione encondrale).

La scelta della direzione verso cui la cellula mesenchimale deve dirigersi (osteoblastica/osteocitica) è regolata dal gene Wnt che stimola una cascata di eventi intracellulari che hanno come target la β -catenina, che entra nel nucleo ed attiva la trascrizione di geni bersaglio (2).

Nell'ossificazione membranosa l'attivazione Wnt/ β -catenina (2) induce l'espressione di geni osteoblasto-specifici e inibisce quelli condrocito-specifici. Uno di questi, il RUNX2/Cbfa1/AML3 (3), stimola il fattore di trascrizione Osterix (OSX) (4), entrambi critici per l'osteoblastogenesi.

L'importanza della β -catenina è dimostrata dal fatto che la sua assenza impedisce il corretto differenziamento osteoblastico delle cellule MSCs (5).

L'ossificazione membranosa avviene all'interno dei nuclei di condensazione mesenchimale ricchi di vasi sanguigni, che si formano dallo sprouting dei capillari (angiogenesi) sotto lo stimolo di citochine pro-angiogenetiche (VEGF-A), il cui recettore è presente sia sulle cellule endoteliali che su quelle osteoblastiche, sincronizzando così neoformazione ossea ed angiogenesi (6).

Al contrario il differenziamento condrocitico e la formazione di cartilagine sono caratterizzati dalla bassa espressione della β -catenina e dall'aumento dei geni SOX, tra i quali riveste particolare importanza SOX9 (7). La cartilagine forma uno stampo dello scheletro finale che viene progressivamente sostituito da osso maturo. Al contrario dell'ossificazione membranosa quella encondrale avviene nei nuclei mesenchimali dai quali sono esclusi i vasi sanguigni, in quanto proprio la loro presenza inibisce la differenziazione condrocitica (8).

Inizialmente l'espressione del VEGF-A è insufficiente per garantire la proliferazione dei capillari, ma è necessaria per la sopravvivenza dei condrociti nelle epifisi. Successivamente i condrociti cessano di proliferare e si ipertrofizzano, le cellule mesenchimali del pericondrio differenziano in osteoblasti e formano un collare intorno ai condrociti ipertrofizzati che iniziano

ad esprimere alcuni geni tra i quali il CBFA1/RUNX-2, VEGF-A e il connective tissue growth factor (cTGF). Inizia, quindi, l'invasione dei vasi sanguigni, dei precursori osteoblastici e delle cellule ossee che riassorbono la cartilagine dal pericondrio e sostituiscono il tessuto cartilagineo con tessuto osseo (6).

L'espressione della β -catenina è bassa nelle fase cartilaginea avascolare. I condrociti si ipertrofizzano, iperesprimono VEGF-A favorendo l'invasione vascolare necessaria per avviare l'ossificazione. Aumenta quindi anche l'espressione della β -catenina e si forma il collare osseo pericondrale. VEGF-A si mantiene espresso a bassi livelli nelle epifisi per garantire la sopravvivenza dei condrociti.

1.2 INFANZIA E ADOLESCENZA

L'infanzia e l'adolescenza sono caratterizzate, invece, da un progressiva crescita dimensionale delle ossa e dall'aumento della massa ossea (Fig. 1).

Lo sviluppo di metodiche non invasive quali la densitometria ossea (DXA), che è in grado di misurare con precisione il contenuto minerale osseo (BMC) e la densità minerale ossea (BMD) sia nell'adulto che nella popolazione pediatrica, ha permesso oggi di comprendere con precisione l'entità di questi cambiamenti. La massa scheletrica aumenta dai circa 75-90 g della nascita ai 2400-3300 g del giovane-adulto. L'adolescenza è il periodo in cui si concentra la crescita maggiore, con un guadagno di circa il 25% della massa ossea totale solo nei 2 anni che precedono il picco di crescita. Tuttavia proprio nel momento del picco di crescita sia maschi che femmine hanno raggiunto solo il 57% del loro BMC. La percentuale sale a quasi il 90% intorno ai 18-20 anni (9).

Recenti studi indicano che la BMD è simile nei due sessi prima della pubertà, sembra superiore nella donna in determinati distretti (pelvi e colonna) dopo la maturità sessuale e

diventa decisamente maggiore nell'uomo in tutto lo scheletro nel corso della terza decade, periodo nel quale si ipotizza vi possa essere il picco di massa ossea (PMO) (Fig. 1) (10).

La crescita dei diversi segmenti scheletrici non è lineare ed uniforme, dal momento che osso trabecolare, che rappresenta il 15% dell'osso totale, e osso corticale, che rappresenta il restante 85%, sono sottoposti a stimoli ormonali e meccanici molto diversi tra loro (10). L'età esatta in cui viene raggiunto il PMO non è ancora nota ed è verosimile che possa essere diversa nel distretto trabecolare/assiale rispetto a quello corticale/appendicolare. Per lo scheletro assiale si ipotizza che il PMO si collochi al termine della seconda decade di vita e che già nel corso della terza-quarta decade vi possa essere una iniziale perdita minerale. Per quanto riguarda, invece, lo scheletro appendicolare esistono dati contrastanti, con variazioni anche molto ampie tra i 18 ai 35 anni (11).

1.3 INVECCHIAMENTO

Lo scheletro va incontro ad un processo progressivo di riduzione della BMD, una volta raggiunta la maturità (Fig. 1) (23). La donna, per esempio, nel corso della vita perde il 42% della BMD spinale e il 58% di quello femorale e curiosamente la velocità di perdita, in assenza di patologie specifiche, non varia significativamente tra l'8°-9° decade e il periodo peri-postmenopausale (12).

Alla base di questa progressiva riduzione vi è lo squilibrio del remodelling, dovuto alla riduzione netta della neoformazione ossea rispetto al riassorbimento.

Accanto al dato quantitativo si verificano dei significativi cambiamenti qualitativi, sia macroscopici che microscopici, legati al deterioramento della microarchitettura trabecolare, alle variazioni dimensionali, alla presenza di microcrack, a deficit di mineralizzazione, all'aumento del turnover osseo (12).

La presenza di patologie e di trattamenti farmacologici specifici, la malnutrizione, il deficit di vitamina D, il deficit estrogenico nella donna e androgenico nell'uomo, il fumo, variabili genetiche ed ambientali possono ulteriormente accelerare questi processi.

Lo scheletro, tuttavia, è in grado di mettere in atto meccanismi di compenso per preservare la propria resistenza, come per esempio l'ipertrofia delle trabecole residue e l'aumento dei diametri dell'osso corticale (13).

Recenti evidenze hanno anche posto l'attenzione sulla componente adiposa del midollo osseo che aumenta in maniera significativa con l'avanzare degli anni. Questo potrebbe determinare un aumento del commitment dei precursori mesenchimali lungo la linea adipocitica rispetto a quella osteoblastica, con un'ulteriore riduzione dell'attività neoformativa (14).

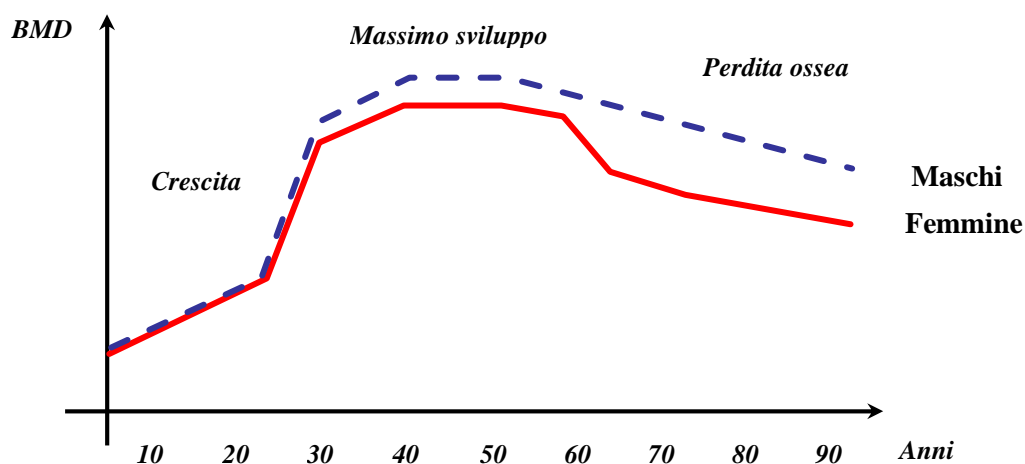


Fig. 1: rapporto tra età e BMD.

1.4 RUOLO DELLA GENETICA, DEL SESSO E DELL'ETNIA

Numerosi studi indicano che la componente genetica giochi un ruolo importante nel determinare la massa ossea. Il ruolo della genetica è diverso a seconda dell'età e del sito scheletrico considerato: maggiore nel giovane rispetto all'adulto e nella colonna rispetto agli arti. Dati comparativi su madri-figli, su gemelli, in uomini e donne con familiari di primo grado

con osteoporosi, studi su geni candidati hanno stimato che la componente ereditaria può arrivare anche all'80%.

Per esempio il gene del recettore della vitamina D (VDR) è associato in modo significativo con la massa ossea in ragazze in età puberale e pre-puberale (15).

In un nostro lavoro abbiamo dimostrato nelle donne affette da osteoporosi postmenopausale (OP) un deficit di espressione di alcuni geni coinvolti nel differenziamento osteoblastico dei precursori mesenchimali, tra i quali *Runx-2* ed *Osterix* (16).

Importanti differenze strutturali e dimensionali esistono poi tra uomini e donne (Fig.2).

L'area (CSA) e la dimensione dei corpi vertebrali nelle donne sono inferiori a quelle dell'uomo di pari età, peso ed altezza: la CSA risulta di circa l'11% inferiore nelle ragazze pre-pubere e diventa del 25% nell'adulto (10). Ciò può in parte spiegare anche la maggiore incidenza di fratture vertebrali nella donna rispetto all'uomo.

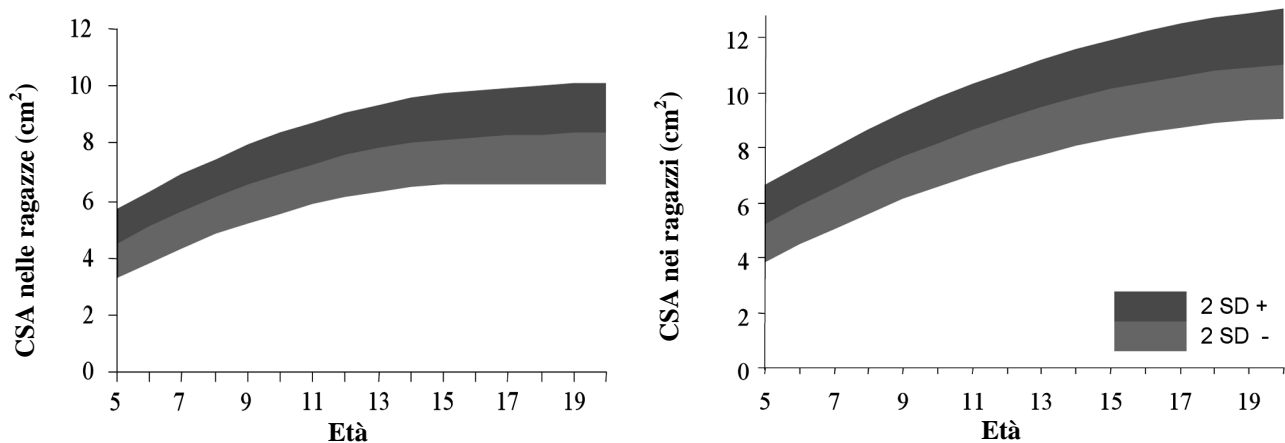


Fig. 2: CSA vertebrale nei maschi e nelle femmine (17)

Per quanto riguarda, invece, l'osso corticale non sembrano esserci differenze significative tra i sessi. A parità di età, peso ed altezza i parametri dimensionali e geometrici del femore sono simili negli uomini e nelle donne, ad indicare che in questo distretto il carico meccanico più che il sesso ne influenza la forma e la struttura (10).

Infine, significative diversità sono legate alla razza di appartenenza. Sebbene nei bambini prepuberi la BMD trabecolare è simile in tutte le razze, dopo la maturità sessuale essa aumenta in modo maggiore in quella nera rispetto alla bianca (34% vs 11%), nonostante una sostanziale similitudine dimensionale. Al contrario, nell'osso corticale la razza sembra influenzare maggiormente l'aspetto dimensionale rispetto a quello densitometrico. L'area di sezione è maggiore nella razza nera rispetto alla bianca e ciò garantisce un vantaggio notevole dal punto di vista biomeccanico (18). La razza asiatica ed ispanica, infine, hanno caratteristiche densitometriche e dimensionali simili alla bianca (19).

2 IL DIFFERENZIAMENTO OSTEOBLASTICO

2.1 LE CELLULE MESENCHIMALI STAMINALI

Le cellule staminali sono per definizione cellule pluripotenti capaci di auto-rinnovarsi e di rigenerare linee cellulari multiple.

Il midollo osseo contiene cellule con un alto potere replicativo ed elevata capacità clonogenica, le unità formanti colonie cellulari (CFU-Fs), che danno origine al tessuto osso, cartilagineo, adiposo e fibroso (Fig. 3) (19). Queste CFU-Fs vengono chiamate cellule staminali mesenchimali (MSCs) e si differenziano in modo netto dalle cellule staminali emopoietiche (HSC).

Si stima che solo una percentuale di circa il 15% abbia un potere "staminale", e tra esse vi sono quelle che possono dare origine agli osteoprogenitori (19). Cellule con caratteristiche simili alle MSCs midollari sono state isolate dal cordone ombelicale, dal fegato fetale, dalla polpa dentale e dal sangue periferico (Fig. 4). Inoltre, è stato dimostrato che anche le cellule muscolari

satelliti possiedono la capacità di proliferare e differenziare in diverse linee cellulari: miocitica, osteoblastica, adipocitica (20).

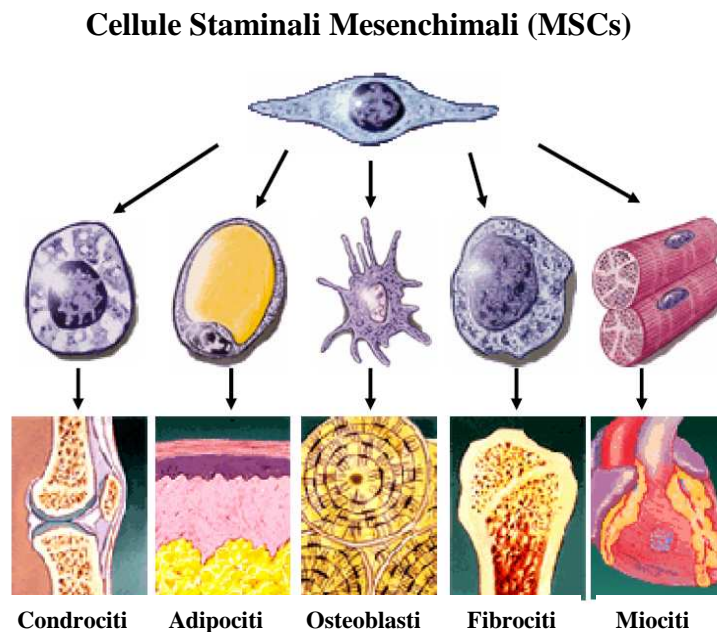


Fig. 3: rappresentazione schematica del differenziamento delle MSC lungo diverse linee cellulari

La prospettiva di poter utilizzare le MSCs nell'ingegneria dei tessuti sta spingendo la ricerca scientifica verso l'identificazione di markers specifici in grado di selezionarle e purificarle.

Unanime è il consenso che esse non esprimano CD11b (un marcatore delle cellule immunitarie), la glicoforina A (un marcatore eritroide) e il CD 45 (marcatore della linea ematopoietica). L'antigene CD 34, un marcatore delle cellule ematopoietiche, è raramente espresso sulle MSC umane, così come il CD 31 (espresso nelle cellule endoteliali ed ematopoietiche) e il CD 117 (espresso nelle cellule staminali ematopoietiche) (21).

Anticorpi verso il marcatore storico STRO-1 sono utilizzati per identificare le MSC del midollo osseo e cellule prive di Stro-1 sono incapaci di formare colonie. Stro-1 non può, tuttavia, essere

considerato markers specifico per almeno 3 ragioni: non vi è un modello murino di Stro-1, non è espresso solo nelle MSC e l'espressione in coltura si perde progressivamente (21).

CD106 o VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule -1) è espresso anche nelle cellule endoteliali e perivascolari e garantisce la localizzazione perivascolare delle MSC. CD106, infatti, agisce come molecola di adesione, di chemiotassi e di trasduzione del segnale (21).

Il CD73, o lymphocyte adhesion molecule - 2, è una nucleosidasi presente sia nelle MSC che in molte altre cellule. Tuttavia alcuni anticorpi monoclonali specifici (SH3, SH4) contro CD73 sono risultati specifici proprio per le MSC (21).

Infine, molti altri marcatori sono stati identificati. Tra essi ricordiamo gli anticorpi CD 271/NGFR, CD 105, CD90/Thy-1, CD44, CD29, CD13, Flk-1/CD309, Sca-1 e CD10 (21).

In conclusione Stro-1, CD73 e Cd106 sono attualmente i markers più specifici, sebbene la loro funzione rimanga ancora in gran parte sconosciuta (21).



Fig. 4: popolazione di cellule mesenchimali isolate da sangue periferico.

2.2 DIFFERENZIAMENTO OSTEOBLASTICO

Il commitment delle MSCs verso linee cellulari specifiche è regolato da segnali morfogenetici, trascrizionali denominati “master switches” (Fig. 5).

Il pathway Wnt/ β -catenina è lo step iniziale per il commitment delle MSCs lungo la linea osteoblastica/osteocitica (22). Specifici fattori legati al Wnt sono stati identificati, tra i quali l’LRP-5, la cui mutazione è responsabile di alterazioni specifiche dello scheletro, come la cleidocraniodisplasia (CCD) (23).

Questi dati forniscono la prova dell’importanza proprio del Wnt che regola i processi di modelling e remodelling nell’embrione, durante lo sviluppo fetale e nel giovane-adulto (22).

E’ verosimile, inoltre, che il Wnt possa avere funzioni diverse in base alla fase della scheletogenesi, per esempio mantenere le MSCs in fase replicativa o stimolarne il differenziamento selezionando tra osteoblastogenesi ed adipogenesi: nel primo caso inibendo la trascrizione di *PPAR- γ* ed inducendo quella di *Runx-2*, *Dlx-5* ed *Osterix* (24).

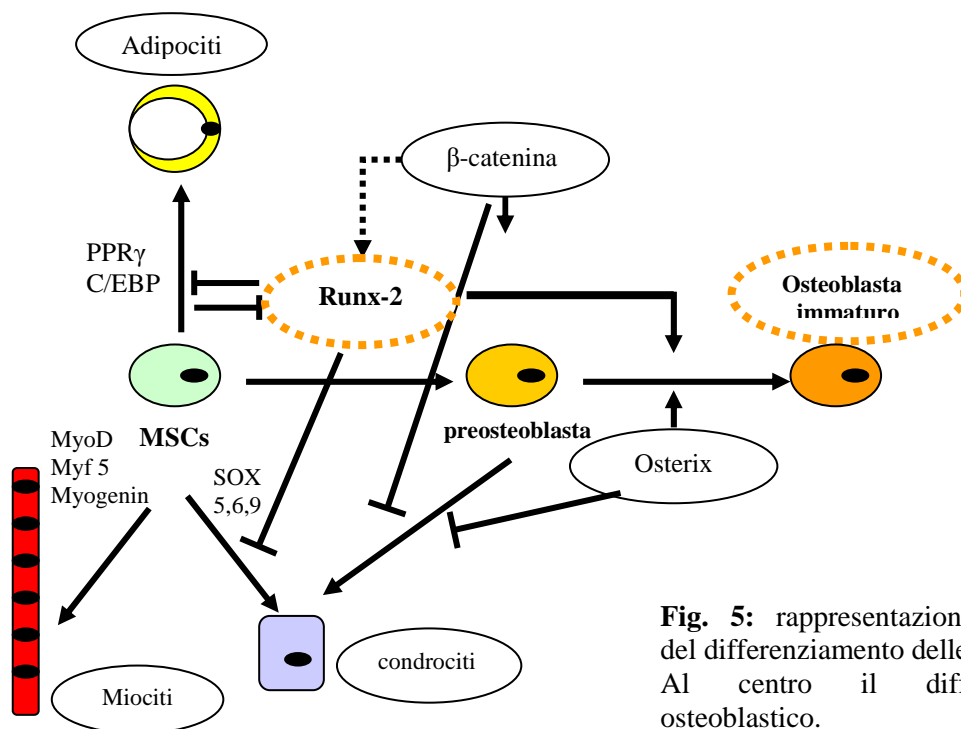


Fig. 5: rappresentazione schematica del differenziamento delle MSC. Al centro il differenziamento osteoblastico.

Le bone morphogenetic protein (membri della famiglia del TGF: BMP-2, 4, 7) sono potenti regolatori dell'espressione genica durante l'osteogenesi ed agiscono mediante il complesso recettoriale BMPRIA/BMPRII e il recettore intracellulare Smads (R-Smads). Le BMP sono modulate anche da Smads inibitrici e da alcune proteine tra cui noggin e chordin (32).

Tra i geni target delle BMP importanti per l'osteogenesi ricordiamo RUNX, le homeodomain protein (Msx2, Dlx3, Dlx2, Dlx5) ed Osterix (Fig. 5) (25).

Proprio le BMP sono oggi utilizzate in terapia per favorire e velocizzare la guarigione delle fratture (26).

Il differenziamento osteoblastico delle MSCs richiede anche la presenza di giunzioni intercellulari ed il contatto con la matrice. Le prime sono mediate da caderina, tight junction e desmosomi (34), mentre il contatto con la matrice ossea, prodotta dagli osteoblasti stessi, avviene grazie alla presenza di proteine transmembrana (Notch-1) e di adesione, come le integrine, le quali legano proteine collagene e regolano il differenziamento osteoblastico attraverso le mitogen-activated protein kinase (MAPK) (27).

Il timing di espressione dei fattori fin qui nominati ci permette di osservare ed identificare i diversi momenti del differenziamento osteoblastico (28). Si riconosce, inoltre, l'espressione progressiva di marcatori specifici come il *Runx-2*, *Osterix*, il collagene tipo I, la fosfatasi alcalina (ALP), l'osteopontina, il PTH e PTH-rp, il PTH1R. E' noto che fosfatasi alcalina e PTHR1 sono marcatori dell'osteoblastogenesi precoce e della fase di deposizione della matrice extracellulare, mentre si spengono nel momento in cui l'osteoblasta diventa osteocita. L'osteocalcina, invece, è un marcatore tardivo upregolato solo nella fase post-proliferativa e in concomitanza della formazione dell'osteide (28).

L'osteoblasta è, inoltre, responsabile della produzione della matrice extracellulare (ECM), che è indispensabile per la mineralizzazione dello scheletro. Quando l'osteoblasta cessa di proliferare si verificano alcune alterazioni morfologiche tipiche ed inizia a sintetizzare ECM. Viene,

quindi, indotta l'espressione di alcuni geni non collagenici che sono poi i marcatori degli osteoblasti maturi (osteocalcina, osteopontina, sialoproteine ossee). Queste sono proteine in grado di legare calcio e fosfato e di coordinare la formazione e la deposizione dei cristalli di idrossiapatite (28).

Tuttavia è necessario precisare che vi possono essere significative differenze in questa cascata genica legate al distretto scheletrico esaminato (trabecolare/corticale), alla presenza di patologie ossee o a terapie specifiche.

3 LA FAMIGLIA RUNX

I fattori di trascrizione RUNX (fattori di trascrizione della famiglia RUNT) sono stati isolati nel 1994 da Levavon (29).

Il dominio Runt è rimasto conservato durante l'evoluzione ed esiste un'alta omologia tra specie diverse (es. uomo-drosophila).

Sono state identificate 3 forme di RUNX coinvolte nella differenziazione di diverse linee cellulari:

- Runx1/AML1: differenziazione ematopoietica;
- Runx3/AML2: differenziazione neuronale e gastrointestinale;
- Runx-2/AML3: differenziazione osteogenica;

3.1 RUNX-2

Runx-2, noto anche come Cbfa/AML3/Pebp2alphaA, è un gene di circa 220 kb localizzato sul cromosoma 6 (6p21) che contiene 8 esoni (Fig. 6) (29,30).

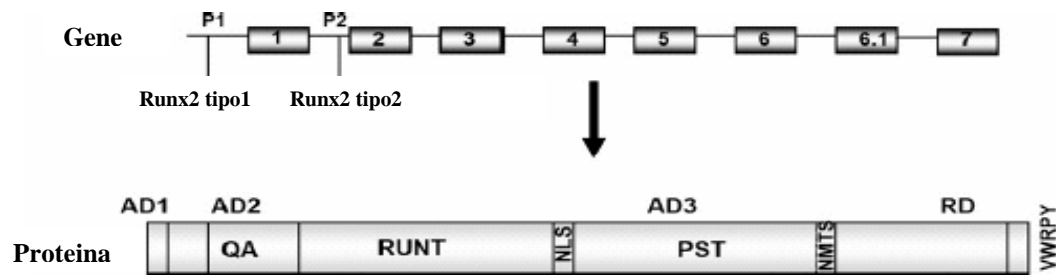


Fig. 6: struttura di RUNX-2. AD 1-3: 3 domini di attivazione; QA: dominio ricco di glutamina/alanina; RUNT: runt domain; NLS: segnale di localizzazione nucleare; PST: dominio ricco in prolina/serina/treonina; NMDS: segnale di localizzazione alla matrice nucleare; RD: dominio di repressione; VWRPY: dominio conservato RUNT di repressione.

L'espressione di *Runx-2* è controllata da 2 promotori, uno distale (P1) ed uno prossimale (P2), che generano due trascritti, denominati tipo II e I rispettivamente. Sebbene entrambi i trascritti siano espressi sia negli osteoblasti che nei condrociti nella fase ipertrofica, il tipo 1 è stato trovato anche in molti altri tessuti di natura non ossea (30,31). Esiste una terza isoforma non espressa nell'uomo e la possibilità di uno splicing alternativo, il cui significato preciso non si conosce ancora (30,31).

RUNX-2 contiene 3 domini di attivazione (AD1-3) (Fig. 6). Il principale è AD3, è localizzato in prossimità della parte C-terminale ed è ricco in prolina/serina/treonina. AD1 ed AD2 sono localizzati nella parte N-terminale e potenziano la trascrizione di RUNX-2, senza essere in grado di attivare in modo autonomo la trascrizione del gene. Gli ultimi 5 aminoacidi C-terminali (VWRPY), altamente conservati, reprimono la trascrizione anche grazie all'interazione con un enhancer della famiglia TLE/Grucho (Fig. 6). Altri co-repressori, come l'istone deacetilasi, possono contribuire a reprimere la trascrizione di RUNX-2 (30,32).

La localizzazione nucleare del gene è regolata da 9 aminoacidi (NLS) situati tra il dominio RUNT e PST. RUNX-2 può avere anche una topografia sub-nucleare mediante il legame alla matrice del nucleo con il dominio (NMDS) (Fig. 6) (30).

Esistono 3 isoforme di Runx-2: Runx-2 tipo I (nota anche come Cbfa1/p56, Cbfa1/org o PEBP2 α A), Runx-2 tipo II (nota anche come Cbfa1/p57, Cbfa1/iso o Til 1), Runx-2 tipo III (nota anche come Osf/ Cbfa1, Runx-2/osf2 o Cbfa1/Osf2). Tra queste il tipo III non esiste nell'uomo (31).

Vi è una differenza sia spazio-temporale sia specie-specifica nell'espressione di *Runx-2*. Studi su colture cellulari mostrano che *Runx-2* tipo I che II sono espresse negli osteoblasti e nei condrociti ipertrofici terminali. *Runx-2* tipo II, invece, stata osservata anche nelle cellule mesenchimali indifferenziate, nei pre-osteoblasti e nei precursori dei condrociti. Entrambe le isoforme si trovano nel cuore, nel cervello, nella milza e nel tessuto muscolare.

Per quanto riguarda la loro attività *Runx-2* tipo 1 è sufficiente per indurre l'osteoblastogenesi, mentre il tipo 2 è necessario per la maturazione terminale degli osteoblasti (31,33).

Studi di ibridazione in situ evidenziano che *Runx-2* tipo I contribuisce maggiormente nell'ossificazione membranosa mentre il tipo II in quella encondrale (31,34).

Proprio recentemente è stato dimostrato che topi omozigoti $-/-$ per *Runx-2* tipo II mancano completamente dell'ossificazione encondrale, preservano intatta quella membranosa e sebbene i condrociti si sviluppino normalmente nelle zona di accrescimento, la zona ipertrofica è maggiore e poco mineralizzata. Ulteriori studi evidenziano che topi eterozigoti $+/-$ per *Runx-2* tipo II hanno un ridotto volume trabecolare rispetto a quello corticale, a conferma della sua importanza nell'ossificazione encondrale (30,35).

3.2 FUNZIONE BIOLOGICA

Runx-2 ha un ruolo chiave nel controllo della differenziazione, della funzione degli osteoblasti e della biologia dell'osso.

Nelle fasi embrionali precoci *Runx-2* è identificabile già dopo 9,5 giorni nella notocorda, dopo 10,5 nello scheletro in formazione e permette il differenziamento osteoblastico delle cellule staminali multipotenti (35).

Runx-2 si lega ad OSE2, che si trova nella regione promoter di molti geni che controllano l'osteoblastogenesi.

Modelli murini knock-out per *Runx-2* mancano completamente dell'ossificazione sia membranosa che encondrale (Fig. 7), mentre l'eterozigosi determina un deficit simile a quello osservato nella Cleido-cranio-displasia (CCD) (35,36).

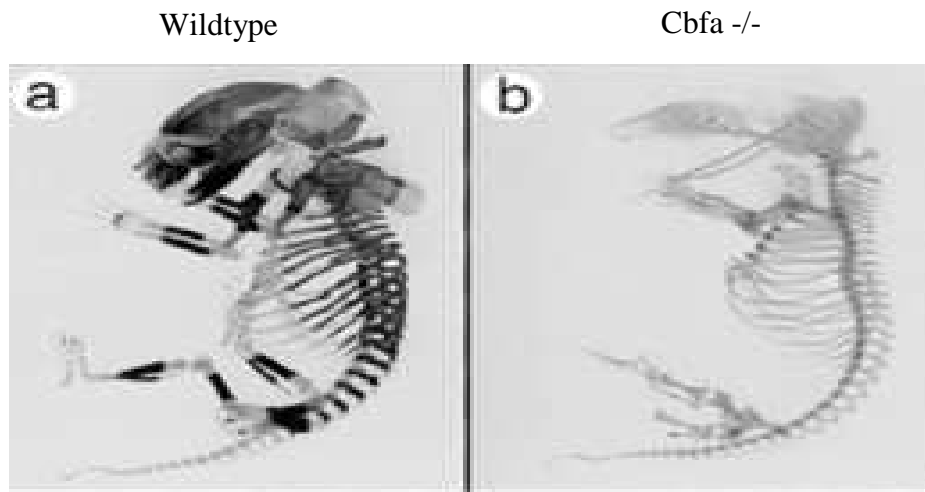


Fig. 7: deficit di ossificazione in topi *Cbfa -/-* (isoforma murina di *Runx-2*) (b) rispetto al modello wildtype (a) (36).

Runx-2 viene espresso anche nei condrociti ipertrofici ed è coinvolto nella loro differenziazione e nella successiva ossificazione encondrale (37).

Sebbene *Runx-2* sia essenziale per la formazione ossea, un'iper-espressione in topi transgenici può determinare osteopenia, ridotta mineralizzazione ossea e fratture multiple, a dimostrazione che una regolazione stretta della sua attivazione/repressione è fondamentale per la pato/fisiologia ossea (38).

Per quanto riguarda le due isoforme identificate nell'uomo, numerosi studi dimostrano che a seconda della fase del differenziamento osteoblastico e del tipo di ossificazione possono avere funzioni diverse. Il tipo 1 sembra coinvolto nell'ossificazione membranosa, mentre il 2 in quella encondrale. Nell'ossificazione membranosa il tipo 1 è espressa soprattutto negli osteoprogenitori e negli osteoblasti attivi, mentre il tipo 2 nelle lining cell (31).

I geni che vengono regolati da *Runx-2*, in quanto fattore di trascrizione, durante l'osteoblastogenesi e durante l'attività osteoblastica sono l'osteocalcina, l'osteopontina, la sialoproteina ossea, galectina, recettore I del TGF β , la dentina e la sialofosfoproteina-1; tra i geni, invece, coinvolti nel turnover ossea ricordiamo la collagenasi 3, l'osteoprotegerina e il RANKL (8).

A sua volta *Runx-2* è soggetto ad una stretta regolazione e riportiamo qui di seguito i principali meccanismi di controllo oggi conosciuti.

- Wnt/LRP5/ β -catenina: LRP5 forma un complesso con Wnt. Wnt/LRP5/ β -catenina attiva una cascata intracellulare che stabilizza la β -catenina citoplasmatica che viene trasportata nel nucleo dove lega Lef1-Tcf e regola l'espressione di molti geni necessari al differenziamento e alla proliferazione osteoblastica, tra i quali proprio *Runx-2*. Un'anomala espressione di LRP5 provoca alterazioni specifiche della massa ossea e dello scheletro (21-23). L'inibizione di Wnt, determinata per esempio dalla frizzled protein 1 (SFRP 1), destabilizza β -catenina e riduce l'attività osteoblastica. Topi null per SFRP 1 esprimono un fenotipo con un'alta BMD caratterizzato da una elevata espressione proprio di *Runx-2* (21,29,30,34).

- BMP/Smads: le bone morphogenetic protein (BMP) sono potenti fattori osteogenici capaci di indurre la differenziazione osteoblastica e la formazione di nuovo osso. Studi in vitro mostrano che le BMP si legano a 2 recettori specifici (tipo 1 e 2) e fosforilano le Smad 1,5 e 8 che a loro volta formano in complesso con Smad 4 e traslocano nel nucleo. Si legano, quindi, a geni specifici tra cui *Runx-2* aumentandone l'espressione. L'effetto stimolante è abrogato dalla

presenza di difetti delle Smad e del fattore DPC4, indicando che la via BMP-2-Smad1/5/8-DPC4-Runx-2 gioca un ruolo critico nel differenziamento osteoblastico (32,33,36-38). L'attività delle BMP-2, e quindi anche di Runx-2, è modulata a sua volta da una serie di altri fattori, tra i quali ricordiamo: Hoxa 10 (Abdominal B-related Hoxa 10 gene product) che interviene nelle fasi precoci dell'osteoblastogenesi; SWI/SNF, gene preposto al controllo dell'organizzazione della cromatina, influenza la trascrizione della fosfatasi alcalina (ALP) mediata da BMP-2 e la fase tardiva del differenziamento osteoblastico mediato da Runx-2 (30,31).

- 1,25 (OH)₂ vitamina D₃/VDR/VDRE: 1,25 (OH)₂ vitamina D₃ (VD₃) è un importante regolatore dell'attività di Runx-2 inducendone l'espressione nelle cellule ossee ed incrementa, anche, l'espressione dell'osteoclastina nel ratto mediante il suo recettore (VDR). Tuttavia alcuni studi su colture cellulari hanno evidenziato che l'attività del promotore di Runx-2 è downregolata da VD₃ indicando in primo luogo che, almeno in vitro, VDR gioca un ruolo inibitorio sulla differenziazione degli osteoblasti ed in secondo luogo che devono esistere in vivo altri meccanismi che coadiuvano VD₃ nella modulazione della differenziazione osteoblastica (30,31).

- Msx2 e Dlx5: sono due geni che regolano e coordinano lo sviluppo dello scheletro in stretto rapporto con Runx-2. Msx2 (mesh-less 2) gioca un ruolo cardine nella chiusura delle suture. Studi su colture cellulari mostrano che Msx2 stimola la proliferazione degli osteoblasti, mentre inibisce la loro differenziazione mediata da Runx-2. Mutazioni di Msx2 compromettono l'ossificazione del cranio e sono responsabili della Boston-craniosinostosi (30,31). Dlx5 (Distal-less 5), invece, orchestra l'interazione tra Runx-2 e BMP-2. Dlx5 stimola *Runx-2*, mentre influenza negativamente Msx2. Pertanto Dlx5 favorisce il differenziamento osteoblastico interferendo con l'interazione tra Runx-2 e Msx5. L'iperespressione di Dlx5 determina un netto incremento dei markers osteoblastici (es ALP, OC) (29,30,34).

- Twist: Twist-1 (in precedenza solo Twist) e Twist-2 (in precedenza Dermo-1) sono dei fattori di trascrizione helix-loop-helix altamente conservati nel corso dell'evoluzione. Sono importanti per la corretta chiusura delle suture, per lo sviluppo dorso-ventrale e per la formazione del mesoderma. Modelli knockout per Twist presentano morte embrionale, mentre l'eterozigosi determina la sindrome di Saethre-Chotzen (SCS). La SCS è caratterizzata da un incremento dell'espressione dei geni osteoblasto-specifici (ALP, collagene tipo 1) e da un quantitativo ridotto dell'RNA per *Runx-2*. Proprio studi in vitro nella SCS hanno mostrato che mutazioni specifiche di Twist possono determinare una riduzione dell'espressione di markers osteospecifici, quali *Fgfr2*, *Runx-2*, sialoproteina ossea, osteocalcina. Deficit analoghi di Twist potrebbero essere presenti anche in molte altre e più comune patologie fragilizzanti dello scheletro (30,31).

- Carico meccanico: la quantità di proteina *Runx-2* e la affinità di legame per il DNA aumentano dopo opportuno carico meccanico. Ciò è mediato da MAPK (mitogen-activated protein kinase) e da ERK 1/2 . Il deficit di ERK 1/2 elimina, infatti, l'aumento di affinità di legame tra *Runx-2* e il DNA dopo stress meccanico. Inoltre, è stato dimostrato che l'eterozigosi per *Runx* (*Runx+/-*), sebbene non abbia conseguenze significative in condizioni fisiologiche, determina una accelerata perdita di massa ossea in topi non sottoposti a carico (unloading). Questo ci indica che nell'ottica delle modificazioni ossee carico-mediate l'espressione piena di *Runx-2* è necessaria (30,31).

- Paratormone (PTH), ormone della crescita (GH), fibroblast growth factor (FGF-2): contribuiscono a modulare la fosforilazione/attivazione di *Runx-2* e la sua interazione con alcuni attivatori della trascrizione (AP1: activator protein 1; Smad), repressori e co-repressori (istone acetilasi, istone deacetilasi) (30,31).

3.3 RUNX-2 E PATOLOGIA OSSEA

La Cleidocranio displasia (CCD) è una sindrome autosomica dominante caratterizzata da ipoplasia della clavicole, precoce ed incompleta chiusura delle fontanelle, bassa statura, valgismo alle ginocchia, brachicefalia, ipertelorismo, bassa statura, deficit della dentatura con malocclusione, osteopenia/osteoporosi (Fig. 8) (36). CCD è strettamente legata a mutazioni a carico di *Runx-2*. Traslocazioni, delezioni, inserzioni, mutazioni non-senso, missenso o di splicing sono state identificate. La maggior parte riguardano mutazioni missenso a carico del dominio che lega OSE2 e del dominio C-terminale che lega Smads (36).



Fig. 8: fenotipo e aspetto radiologico di un bambino affetto da Cleido-Cranio-Displasia

Runx-2 è coinvolto anche nel controllo di alcuni geni che intervengono nel processo metastatico delle cellule tumorali: metalloproteinasi (MMP; MMP9 e 13), osteopontina (OPN), sialoproteine ossee. Tutte queste proteine sono bersagli usuali in condizioni fisiologiche, ma l'overespressione di *Runx-2* osservata in specifici tumori (prostata e mammella) potrebbe conferire a queste cellule il potere di metastatizzare (34).

Nell'osteoporosi postmenopausale (OP) esiste un deficit di espressione del gene *Runx-2* responsabile di un ridotto differenziamento delle MSCs verso la linea osteoblastica (Fig. 9).

Questo si traduce in una riduzione del differenziamento dei precursori osteoblastici in osteoblasti maturi con conseguente deficit minerale osseo ed aumento del rischio di frattura da fragilità (16).

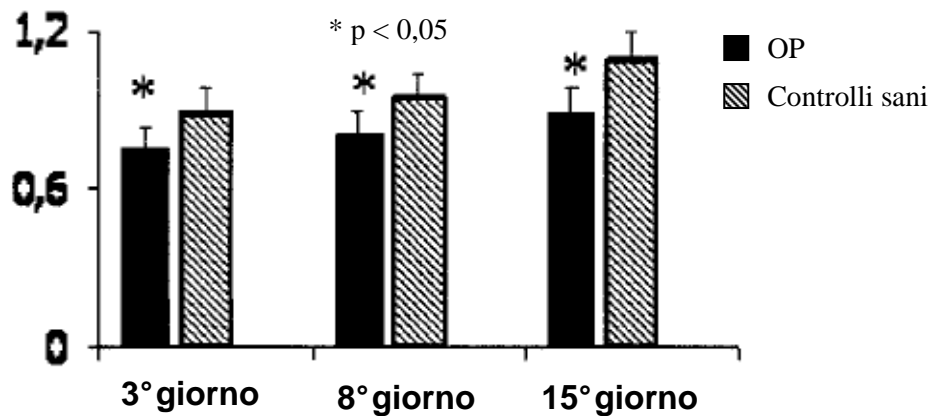


Fig 9: espressione di Runx-2 durante il differenziamento osteoblastico delle MSCs in donne con OP e nei controlli sani (16).

Infine, uno studio sulla popolazione ispanica ha osservato una stretta relazione tra polimorfismi naturali del gene *Runx-2*, la BMD femorale e il rischio di frattura da fragilità (40)

3.4 RUNX-2 E TURN-OVER OSSEO

Runx-2 agisce come fattore di trascrizione su numerosi importanti geni osteoblasto-specifici (per esempio osteocalcina, osteopontina, sialoproteina ossea, recettore I del TGF β) compreso il sistema OPG/RANKL, indicando che direttamente o indirettamente può influenzare anche l'attività osteoclastica e il remodelling osseo durante la crescita e l'invecchiamento. Inoltre alcuni studi sui modelli murini hanno dimostrato che il turnover osseo dipende dai livelli funzionali di Runx-2 (40).

I processi di modelling e il remodelling, noti più comunemente anche con il nome di turnover osseo, sono necessari per garantire rispettivamente la crescita e il mantenimento della corretta

omeostasi dello scheletro. Alterazioni del turnover osseo sono alla base di numerose patologie metaboliche dell'osso (41).

La struttura morfologica dinamica del rimodellamento è la "basic multicellular unit (BMU)". (42,43).

Il processo riassorbitivo inizia con la proliferazione e la differenziazione dei precursori midollari degli osteoclasti che hanno la stessa origine dei macrofagi e come essi necessitano dell'M-CSF (macrophage colony stimulating factor) per poter sopravvivere. Tuttavia l'osteoclastogenesi richiede dei fattori specifici, il contatto con le cellule stromali e gli osteoblasti che producono il RANKL (RANK ligand) e l'osteoprotegerina (OPG). Il primo stimola la proliferazione e la differenziazione osteoclastica, la seconda invece le blocca (44).

Una volta maturo l'osteoclasta va incontro ad attivazione: si fonde per formare la cellula plurinucleata, aderisce alle superfici ossee mediante integrine (42), polarizza gli organi intracellulari per formare l'area specializzata, definita ruffled border, ed attiva un pacchetto di geni coinvolti nel riassorbimento. Questi geni codificano per la pompa protonica ATPasi vacuolare, il proto-oncogene src e gli enzimi proteolitici (TRACP, catepsina K, metalloproteasi MMP-9, collagenasi e gelatinasi), tutti richiesti per la distruzione della matrice ossea. La fase finale è rappresentata dall'apoptosi dell'osteoclasta (42).

Successivamente intervengono gli osteoblasti per ricoprire la parte erosa, richiamati da fattori locali, TGF-beta, IGF-I e II, bone morphogenetic protein (BMP-2), platelets derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF) e collagene, liberati durante il precedente riassorbimento (45,46).

Anche in queste cellule si susseguono una serie di eventi ben definiti: la chemiotassi, la proliferazione e la differenziazione, la produzione di matrice ossea che viene in seguito mineralizzata, la cessazione dell'attività osteoblastica. Il processo netto del remodelling è la formazione di nuovi osteoni

Durante il processo di ossificazione, gli osteoblasti rimangono sepolti nella matrice mineralizzata e si trasformano in osteociti, che tuttavia si mantengono in stretta connessione attraverso delle gap junction caratterizzate da lunghi prolungamenti canalicolari che si estendono nell'osso mineralizzato. Essi fanno parte di un complesso sistema 3D che funge da sensore per carichi meccanici, i traumi e trasmette segnali in superficie in grado di attivare i processi di modelling e remodelling (47).

La stretta connessione tra il processo distruttivo e ricostruttivo sottolinea l'importanza dell'iniziale riassorbimento come elemento scatenante.

Quando il complesso si spegne, l'unità morfologica neoformata è definita "bone structural unit (BSU)". Il tempo necessario per completare la BSU è di circa 3-5 mesi (41).

Normalmente la quantità di osso neoformato è uguale a quello distrutto, in modo tale che il bilancio complessivo sia zero.

E' possibile oggi quantificare l'entità del turnover attraverso l'uso di indici di laboratorio: fosfatasi alcalina ossea ed osteocalcina per la neoformazione; porzione C-terminale o N-terminale del collagene tipo 1 (CTX-NTX), porzione N-terminale del pro-collagene tipo 1 P1NP, desossipiridolina (DPD) per il riassorbimento.

Precise e informazioni strutturali sulla microarchitettura ossea e sul turnover si possono ottenere attraverso analisi istomorfometriche su biopsia ossea da cresta iliaca. La metodica è sicuramente più invasiva rispetto al semplice prelievo di sangue periferico, ma può costituire un'ottimo ausilio nella diagnosi e cura delle malattie metaboliche dello scheletro (48).

4 SCOPO DELLA TESI

La densità minerale ossea (BMD) e il picco di massa ossea (PMO) sono determinanti importanti per la resistenza scheletrica. Lo sviluppo di metodiche quali la densitometria ossea hanno permesso di studiare con precisione la BMD il suo andamento nel tempo.

I fattori ereditari rappresentano un elemento critico per la BMD e la resistenza dello scheletro e tra questi vi è anche *Runx-2*, noto essere un importante fattore di trascrizione per la formazione ossea e il differenziamento osteoblastico delle cellule mesenchimali staminali.

Lo scopo del nostro studio è quello di valutare il comportamento di *Runx-2* durante la crescita e lo sviluppo in una popolazione sana di giovani ed adulti e di confrontarlo con l'andamento della massa ossea.

Dal punto di vista metodologico lo studio si è proposto, inoltre, di introdurre un nuovo approccio metodologico, studiando il profilo di espressione di un gene osteoblasto-specifico nelle cellule mesenchimali circolanti e nelle cellule mononucleate partendo da un prelievo di sangue periferico.

5 MATERIALI E METODI

5.1 SOGGETTI, DENSITOMETRIA

Abbiamo programmato uno studio trasversale per studiare la relazione tra i livelli di espressione di *Runx-2*, la massa ossea, l'età ed il sesso.

Abbiamo selezionato 153 volontari sani (98 donne e 55 uomini) compresi tra i 15 e i 50 anni.

I criteri di inclusione prevedevano un'età compresa tra i 15 e i 50 anni e la presenza di regolare ciclo mestruale nelle donne (periodo post-puberale e pre-menopausale). I criteri di esclusione, invece, sono stati la presenza di patologie dello scheletro, farmaci in grado di influenzare il metabolismo osseo, patologie infettive/infiammatorie in corso, neoplasie, recente gravidanza o allattamento, la presenza di fratture negli ultimi 12 mesi, oligomenorrea, intolleranze alimentari. Tre pazienti riferivano patologie tiroidee (2 ipotiroidismi ed un ipertiroidismo), ma in compenso metabolico al momento del prelievo.

L'introito di calcio quotidiano è stato quantificato mediante un specifico questionario e i pazienti con storia di una riduzione media-severa dell'introito di calcio con la dieta sono stati esclusi (almeno 600-800 mg/die).

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a studio densitometrico della colonna (L2-L4) e del femore (femore totale) utilizzando in tutti i casi il medesimo apparecchio Hologic Discovery disponibile nel policlinico di B.go Roma. Il controllo di qualità dello strumento è stato garantito dalle verifiche previste quotidianamente per l'attività diagnostica di routine ed il coefficiente medio di variazione è stato dell'1.2%.

Tutti i volontari hanno letto e firmato il consenso informato e per i soggetti minorenni, il consenso informato è stato firmato da almeno un genitore. Il protocollo è stato approvato dal comitato etico locale.

5.2 ISOLAMENTO DELLE CELLULE

Abbiamo selezionato 55 maschi e 85 femmine con caratteristiche antropometriche e densitometriche simili a quelle della relativa totale popolazione maschile e femminile generale (153 soggetti) al fine di studiare il profilo di espressione di gene *Runx-2*.

Da tutti questi sono state estratte le cellule mononucleate circolanti (PBMC) partendo da un prelievo di 25 ml in siringa eparinata ed utilizzando successivamente la selezione mediante stratificazione con Ficoll-Pacque.

Da un ulteriore sottogruppo di 28 volontari (2 maschi e 2 femmine tra i 15-20 anni e 4 maschi e 4 femmine per le decadi successive) le MSCs circolanti sono state selezionate partendo da ulteriori 25 ml di sangue prelevati sempre in siringa eparinata e utilizzando la procedura con Fycoll-Pacque, che prevedeva tuttavia una doppia stratificazione e, prima del secondo passaggio, l'incubazione con cocktail di anticorpi per la selezione e l'eliminazione delle cellule ematopoietiche e delle cellule circolanti indesiderate (49).

Dopo l'isolamento, le cellule sono state centrifugate a 1000 g per 10 min a 4 °C ed il pellet ottenuto congelato a -80°C.

5.3 ESTRAZIONE DELL'RNA

L'estrazione dell'RNA è stata eseguita utilizzando RNeasy minikit (Qiagen) in associazione a trattamento con DNAsi.

Il campione di cellule è stato lisato utilizzando una soluzione di Buffer RTL addizionato con β -mercaptoetanololo (10 μ /L per ogni 1 ml di RTL). La soluzione è stata posta su colonna QIAshredder e centrifugata. Al filtrato è stato aggiunto etanolo 70% in rapporto 1:1 ed il campione è stato centrifugato nuovamente su colonna RNeasy spin. Si è eseguito, quindi,

lavaggio del filtro su colonna con Buffer RW1 e successivamente si è proceduto con trattamento con DNase per 12 min. In successione l'estrazione prevedeva nuovo lavaggio con Buffer RW1, due lavaggi con Buffer RPE e raccolta finale dell'RNA mediante eluizione con 50 μ L di acqua RNase-free. L'RNA estratto è stato quantificato mediante misurazione dell'assorbanza a 260 nm. La purezza dell'eluato è stata valutata attraverso il rapporto tra l'assorbanza a 260 e quella a 280 ed il range ottimale è stato fissato tra 1.8-2.0.

5.4 RETROTRASCRIZIONE

Il c-DNA a singolo filamento è stato ottenuto utilizzando il First Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare) come da protocollo.

Il procedimento prevedeva l'incubazione di 8 μ L di RNA (500 ng di RNA per le PBMC e 250 ng per le MSCs) per 10 minuti a 65°C e quindi mantenimento a 4°C. Successivamente all'RNA veniva addizionata miscela formata da 5 μ L di "Bulk first-strand cDNA reaction mixes" (contenente transcriptasi inversa murina FPLCpure, RNAGuard, RNase/DNase free BSA, dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 μ L di soluzione di esameri random ed 1 μ L di soluzione tampone (DTT).

Il campione veniva nuovamente incubato per la retrotrascrizione a 37°C per un ora.

Il cDNA ottenuto è stato stoccato a -80°C.

5.5 REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata eseguita con metodo quantitativo (real time) su un volume totale di 20 μ L costituito da una soluzione formata da 1 \times Premix Ex Taq TM (2X), 1 x Rox Reference Dye (50x) (Takara Bio Inc.) e 20 ng di cDNA. Il Primer specifico

per il gene di interesse (*Runx-2*) è stato ottenuto da Assay-on-Demand Gene Expression Products (Applied Biosystems).

La PCR è stata eseguita in multiplex e prevedeva 30 secondi a 95 °C (denaturazione iniziale), seguiti da 40 cicli a 95 °C per 5 secondi (denaturazione) e a 60 °C per 31 secondi (annealing/extension).

La termociclazione e l'analisi della fluorescenza sono state effettuate utilizzando ABI Prism Sequence Detector 7300 (Applied Biosystems) come da protocollo. La tecnica permette di identificare con precisione il Threshold cycle (Ct value), ovvero il ciclo dove il prodotto della PCR è visibile grazie all'emissione della fluorescenza, che correla con la quantità iniziale di RNA. Il valore di Ct è stato analizzato con il software Taqman SDS e per ogni campione abbiamo utilizzato il valore medio del Ct ottenuto da due replicati per ogni campione. La tecnica permette l'identificazione del ciclo soglia (Ct) in cui il prodotto di replicazione è visibile attraverso l'emissione di fluorescenza. Poiché il Ct varia in modo lineare con il logaritmo della quantità dell'RNA, il dato calcolato è il risultato di una media geometrica e il Ct osservato correla con la quantità iniziale di RNA nel nostro campione (50).

L'espressione di *Runx-2* è stata eseguita prima usando l'RNA estratto dalle MSCs e quindi dalle PBMC. In entrambi i casi abbiamo creato un pool di sieri per ogni sottogruppo di età e sesso al fine di ridurre al minimo la variabilità interpersonale e per ogni paziente è stato utilizzato un uguale quantità di RNA.

Tuttavia in un sottogruppo di persone *Runx-2* è stato studiato anche in ogni singolo soggetto, ma solo nelle PBMC.

Al fine di normalizzare l'espressione genica nei nostri campioni e correggere gli errori derivanti dai processi di estrazione dell'RNA, lettura spettrofotometrica e dalla variabile efficienza della retro-trascrizione, insieme al gene candidato sono stati amplificati altri 3 geni housekeeping per di ridurre anche la variabilità età correlata degli stessi geni controllo (51,52). Abbiamo scelto

geni appartenenti a 3 diverse categorie: beta-actina (gene strutturale), GAPDH (gene coinvolto nel metabolismo cellulare) e Beta 2 microglobulina (52).

I livelli di espressione genica sono stati calcolati mediante relativo fold di differenza di espressione ($\Delta\Delta Ct$) (53).

5.6 VALORE DEL Ct

I valori di Ct sono stati calcolati usando uno specifico software TaqMan SDS. Per ogni duplicato relative al singolo campione la media aritmetica è stata considerata. Poiché i valori di Ct variano in maniera lineare con il logaritmo della quantità di RNA iniziale, il valore finale è rappresentato da una media geometrica. Al fine di confrontare il profilo di espressione genica tra i diversi gruppi, la media dei diversi gruppi è stata messa in relazione con la media dei livelli di espressione dei geni housekeeping usando la seguente equazione: $relative\ expression = 2^{-[Ct(target) - Ct(reference\ gene)]} \times 100$ (53).

6 ANALISI STATISTICA

Le caratteristiche cliniche ed antropometriche della popolazione di studio così come i dati ottenuti nella nostra analisi sono stati espressi come media e deviazione standard (DS).

Le differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante test T di student. L'analisi della varianza è stata eseguita mediante ANOVA seguita da un'analisi post hoc con test di Bonferroni.

Le analisi della correlazione e della regressione lineare sono state condotte dove opportuno e l'andamento della BMD in relazione con l'età è stato rappresentato mediante un modello quadratico.

L'analisi multivariata è stata eseguita per valutare le variazioni di *Runx-2* in relazione all'età, altezza, peso e BMI.

In tutte le analisi condotte una *p* inferiore a 0.05 è stata considerata significativa.

L'analisi statistica è stata eseguita con SPSS per Windows versione 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

7 RISULTATI

7.1 POPOLAZIONE DI STUDIO E BMD

Le caratteristiche cliniche ed antropometriche della nostra popolazione di studio sono riassunte nella tabella 1. Le stesse caratteristiche sono divise per età e sesso nella tabella 2.

Come atteso nella popolazione generale gli uomini sono più alti e pesano di più rispetto alle donne, ma la BMI è comparabile tra i due sessi. Tra le donne l'età del menarca è sovrapponibile in tutti i gruppi e nessuna donna era in menopausa, essendo questa un criterio di esclusione.

La densitometria della colonna e del femore è stata eseguita in tutti i soggetti. Una correlazione diretta e significativa è stata rilevata tra BMD e le caratteristiche fisiche della popolazione (altezza: r 0,42 $p < 0,001$; peso r 0,48 $p < 0,001$, BMI r 0,24 $p < 0,01$). Come possiamo apprezzare nella figura 10, la BMD è comparabile tra i sessi nella tarda adolescenza in tutti i distretti scheletrici. La stessa figura mostra che nelle decadi successive la BMD negli uomini è superiore sia alla colonna che al femore e presenta un maggiore incremento, soprattutto per quanto riguarda l'osso corticale. Si osserva, inoltre, che la curva della BMD della colonna rimane sempre maggiore negli uomini rispetto alle donne, sebbene non raggiunga mai una differenza significativa nella comparazione dei gruppi di pari età (Fig. 10 A-B). L'entità dell'incremento dell'osso corticale è ancora una volta maggiore nei maschi rispetto alle donne a partire dalla

terza decade (p=0,01 nel gruppo 20-30; p =0,001 nel gruppo 30-40; p=0,03 nel gruppo 40-50;

Fig. 10C), fattore che è meglio rappresentato dalla divergenza delle due curve nella figura 10D.

Variabile	Popolazione	Maschi	Femmine	p
N°	153	55	98	ns
Età (anni)	31.88±10.33	30.08±10.45	32.95±10.16	ns
Altezza (cm)	167.62±0,085	175.48±0.07	162.95±0.05	*
Peso (Kg)	65.49±10.82	72.41±10.36	61.39±8,86	*
BMI (Kg/m ²)	23.26±3.14	23.47±2.85	23.13±3.30	ns
Menarca (anni)	12.71±1.41		12.71±1.41	ns
N° PBMC	5.83*10 ⁶ ±3.12*10 ⁶	5.04*10 ⁶ ±1.87*10 ⁶	6.92*10 ⁶ ±3.89*10 ⁶	ns
N° MSC	3.55*10 ⁵ ±1.65*10 ⁵	3.96*10 ⁵ ±1.57*10 ⁵	3.13*10 ⁵ ±1.68*10 ⁵	ns

Tab. 1: caratteristiche antropometriche di tutta la popolazione di studio e conta cellulare. I valori sono espressi come media ± DS. * p < 0,05 fra i gruppi.

Gruppi Età/sesso	N°	Età (anni)	Altezza (cm)	Peso (Kg)	BMI (Kg/m ²)	Menarca (anni)
15-20/M	12	16.33±1.15	172.83±8.92	66.42±12.63	22.18±3.64	
15-20/F	13	18.08±2.06	162.31±5.04	56.62±8.30	21.43±2.51	12.00±1.47
21-30/M	15	25.27±2.84	176.40±0.05	71.50±7.93	22.95±2.00	
21-30/F	23	25.52±2.81	164.57±5.39	62.28±8.99	22.99±3.10	12.30±1.66
31-40/M	14	34.25±3.22	174.79±5.57	74.38±8.36	24.33±2.38	
31-40/F	24	34.79±2.63	163.88±6.57	62.08±9.24	23.13±3.32	11.96±1.48
41-50/M	14	44.08±2.66	176.14±3.71	76.35±10.76	24.40±2.86	
41-20/F	25	45.48±2.87	160.80±4.36	62.38±8.55	24.17±3.66	12.12±1.48
P		*	*	*	ns	ns

Tab. 2: caratteristiche antropometriche dei sottogruppi suddivisi per età e sesso nei quali il profilo di espressione di Runx-2 è stato studiato nelle PBMC (M: maschi; F: femmine). Valori espressi come media ± DS. * p < 0,05 fra i gruppi.

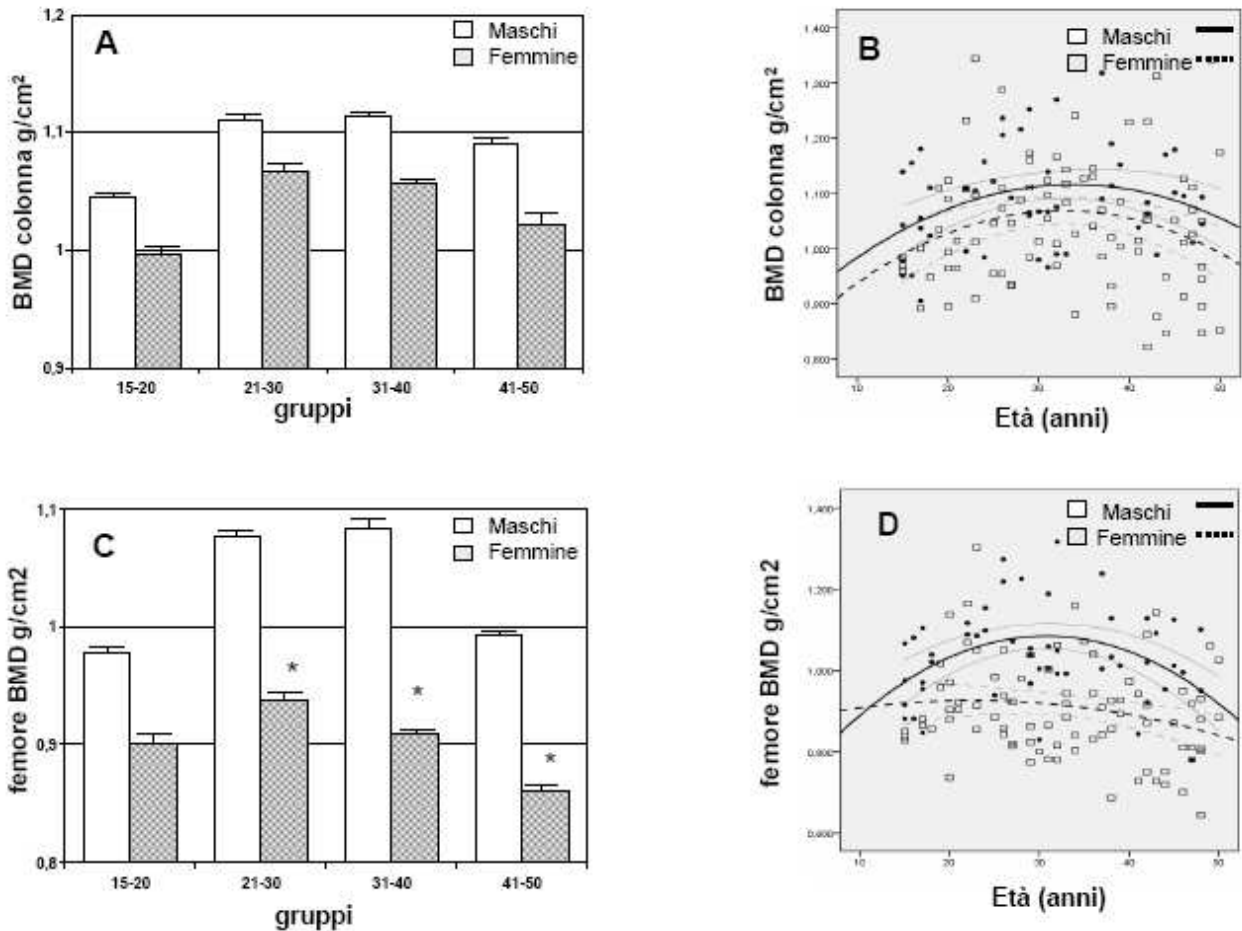


Fig. 10: variazioni età correlate della BMD a livello della colonna lombare (A-B) e del femore totale (C-D). I valori della BMD sono raffigurati in colonne (A-C; indicati come media \pm DS) e nelle rispettive curve età correlate (B-D). (* $p < 0,05$ fra i sessi).

7.2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI *RUNX-2*

L'analisi di espressione di *Runx-2* è stata valutata in primo luogo nelle MSCs e quindi nelle PBMC come descritto in precedenza, al fine di validare l'uso delle PBMC in sostituzione delle MSCs.

La correlazione di *Runx-2* tra MSCs e PBMC è stata alta e significativa ($R=0.92$; $p=0.001$).

Nella figura 11 A è stata, inoltre, raffigurata l'espressione età correlata di *Runx-2* nei due tipi di cellule. Nello specifico *Runx-2* aumenta durante la seconda e terza decade e si reduce successivamente.

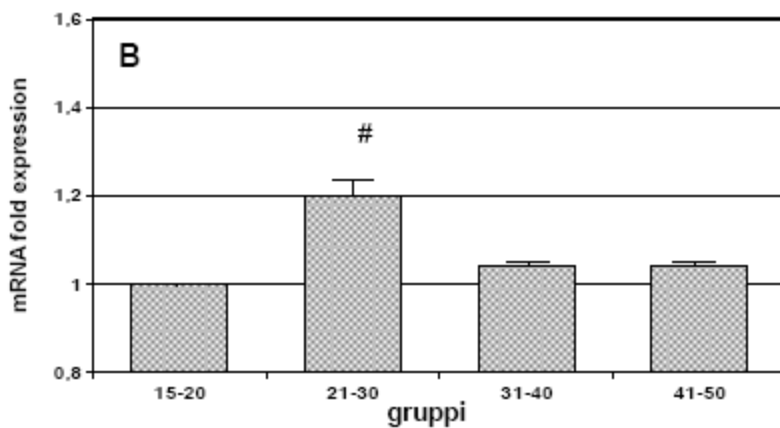
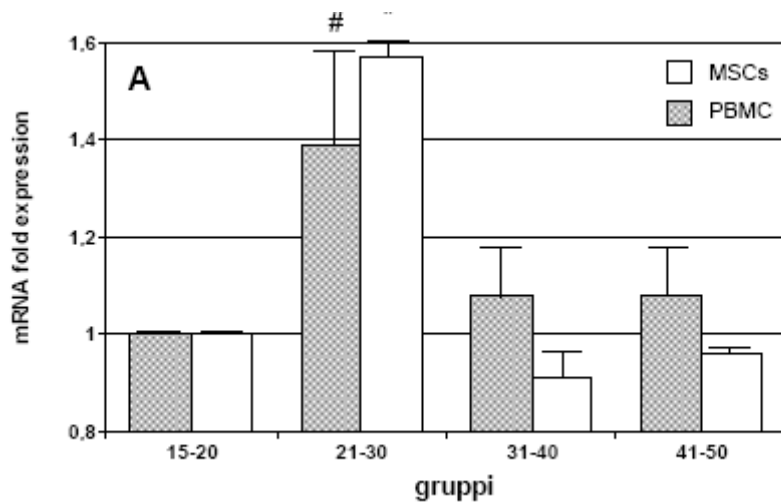


Fig 11: 11A: espressione di *Runx-2* nelle MSCs e nelle PBMC (* $p < 0,05$ vs il gruppo 15-20 per le MSCs; # $p < 0,05$ il gruppo 15-20 per le PBMC). Un'elevata correlazione è presente tra le due popolazioni cellulari ($R=0,92$, $p=0,001$); 11B: analisi dell'espressione di *Runx-2* in sottogruppi di PBMC (# $p < 0,05$ vs il gruppo 15-20).

Una volta dimostrata questa significativa correlazione abbiamo deciso di proseguire con l'analisi di *Runx-2* solo nelle PBMC.

Suddividendo le PBMC per sesso abbiamo osservato importanti differenze. Nelle femmine l'aumento di *Runx-2* nel tempo è più lieve e raggiunge il suo massimo nel corso della terza decade, quando lentamente inizia a ridursi (Fig. 12). Negli uomini l'aumento di *Runx-2* è significativo nel corso della terza ($p < 0,01$) e quarta decade ($p < 0,01$), rispetto alla seconda, quindi diminuisce (Fig. 12). Inoltre, confrontando l'espressione genica tra i sessi abbiamo osservato che *Runx-2* diventa significativamente superiore nei maschi nel corso della terza decade e rimane tale nella quarta, mentre torna ad essere simile nella quinta (Fig. 12).

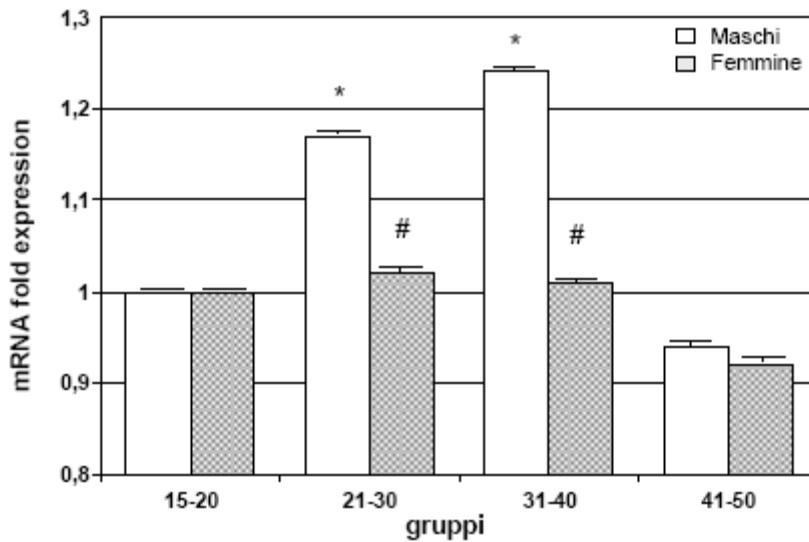


Fig 12: profilo dell'espressione genica età correlata di *Runx-2* nelle PBMC negli uomini e nelle donne (* $p < 0,01$ vs il gruppo 15-20; # $p < 0,01$ vs il gruppo età di pari età).

Confrontando la BMD e l'espressione di *Runx-2* è sorprendente notare che il loro andamento nel tempo è molto simile in entrambi i sessi (Fig. 13). Una stretta correlazione è stata trovata nei maschi tra *Runx-2* e BMD di tutti i distretti scheletrici (colonna: $R\ 0,74$, $p < 0,01$; femore totale: $R\ 0,88$, $p < 0,01$), mentre nelle donne la correlazione è stata evidenziata solo con il femore ($R\ 0,84$, $p < 0,01$)

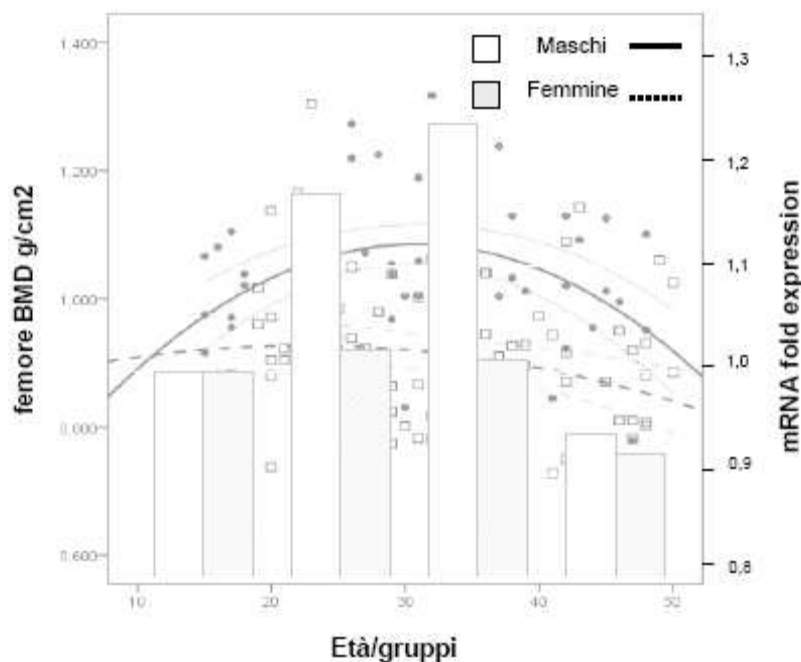


Fig 13: rappresentazione grafica della correlazione tra l'espressione genica di *Runx-2* (colonne) con le variazioni età correlate della BMD del femore totale (curve) - (uomini: $R\ 0,88$, $p < 0,01$; donne: $R\ 0,84$, $p < 0,01$).

La correlazione persiste anche in una sub-analisi eseguita in un numero inferiore di pazienti (12 uomini e 12 donne) dove abbiamo confrontato direttamente l'espressione di *Runx-2* con la BMD del paziente stesso (R 0,71, $p < 0,01$) (Fig. 14).

Questi risultati sono rimasti tali dopo analisi multivariata mediante correzione per età, peso, altezza, BMI ($p < 0,001$).

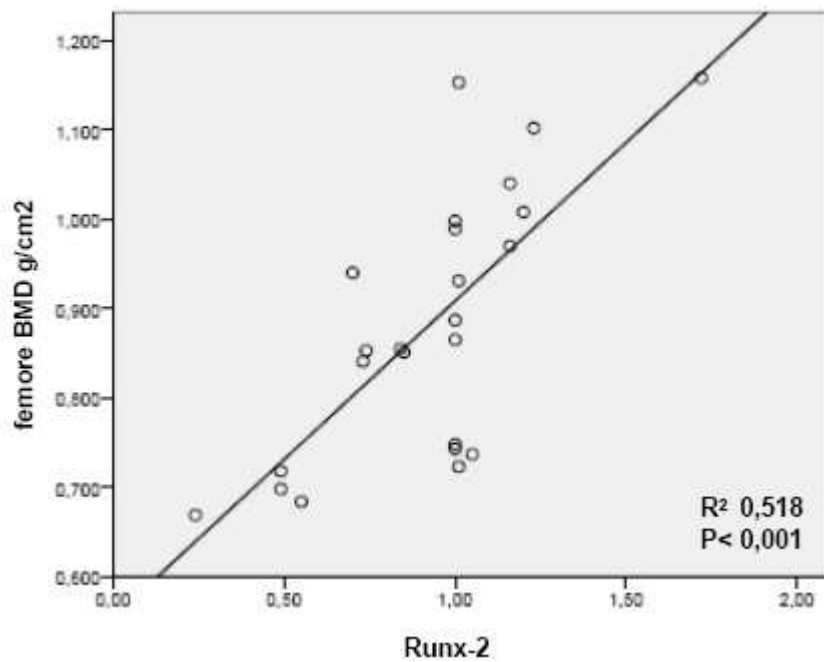


Fig 14: correlazione diretta tra l'espressione genica di *Runx-2* di ogni singolo soggetto e la BMD del soggetto stesso.

8 DISCUSSIONE

Nel nostro studio abbiamo studiato per la prima volta il profilo di espressione di *Runx-2* mettendolo in relazione all'andamento della BMD in una popolazione giovane-adulta sana.

La densità minerale ossea è uno dei determinanti più importanti della resistenza dello scheletro e viene accumulata progressivamente e continuamente durante la crescita di un individuo fino a raggiungere il PMO. Secondo la maggior parte degli studi, la BMD è simile nei maschi e nelle femmine prima della pubertà, ma diventa progressivamente maggiore nei maschi rispetto alle femmine successivamente (9-11,18). Il PMO è raggiunto probabilmente prima nelle femmine rispetto ai maschi e nello scheletro assiale rispetto a quello appendicolare (9-11,18).

Nel nostro studio tutti i soggetti sono stati sottoposti a studio densitometrico sia della colonna lombare sia del femore ed i cambiamenti della BMD osservati sono in accordo con quanto riportato in letteratura (Fig. 1 e 10) (17). La BMD è stata simile nella tarda pubertà nei due sessi, mentre è diventata in seguito progressivamente maggiore nei maschi, come mostra chiaramente la figura 10. L'aumento della BMD è proseguito fino alle terza decade nelle femmine e alla quarta per i maschi, così come l'entità dell'aumento è stato maggiore nei maschi. Come in precedenza ipotizzato, il PMO è stato raggiunto prima nelle donne, mentre negli uomini è stato più tardivo, ma con contenuto minerale complessivo maggiore (9-11,18).

Un interesse particolare è rivolto oggi all'identificazione dei fattori responsabili delle fisiologiche e patologiche variazioni della crescita dello scheletro. In merito, la genetica gioca un ruolo chiave ed è stimato che possa influenzare la massa ossea fino al 60-80% (9-11,18). Un deficit minerale è stato osservato nelle figlie di donne con osteoporosi e in uomini e donne con parenti di primo grado con osteoporosi (9-11,18). Anche nella nostra esperienza abbiamo potuto osservare un legame stretto tra l'espressione di alcuni geni osteoblasto-specifici e la fragilità ossea (16).

Utilizzando lo stesso approccio metodologico del nostro precedente studio abbiamo voluto studiare l'espressione genica di *Runx-2* durante il fisiologico sviluppo ed invecchiamento dell'osso.

Runx-2 è noto essere un fattore di trascrizione fondamentale per il differenziamento delle MSCs in osteoblasti maturi, per la formazione ossea, la regolazione dell'attività osteoblastica e la sua attività regolatoria è evidente su numerosi geni osteoblasto-specifici (30,36). La sua espressione risulta ridotta in donne affette da osteoporosi postmenopausale (16; Figura 9), è mutata nella CCD (36; Figura 8) e polimorfismi di *Runx-2* sono stati associati all'incidenza di fratture di fragilità e alla BMD femorale in un popolazione femminile di origine ispanica (39). Topi knock-out per il gene *Runx-2* mancano completamente del differenziamento osteoblastico e presentano un deficit completo della mineralizzazione ossea (30,36; Figura 7), mentre l'iper-espressione di *Runx-2* nei topi determina ugualmente osteopenia, a dimostrazione che una regolazione stretta ed attenta del gene è necessaria per garantire un corretto sviluppo dello scheletro (38).

Dal momento che *Runx-2* è strettamente connesso con il metabolismo osseo, abbiamo ipotizzato che la sua espressione debba essere correlata con la BMD. A questo proposito il nostro lavoro è unico ed originale dal momento l'espressione di un gene osteoblasto-specifico è stato studiato partendo da un prelievo di sangue periferico ed è stato correlato con la BMD. Abbiamo per questo isolato sia la componente mesenchimale staminale circolante sia le cellule mononucleate le quali, sono considerate sentinelle di malattia: nello specifico le continue interazioni tra sangue e tessuti portano a supporre che le alterazioni che coinvolgono proprio i tessuti portino inevitabilmente a condizionare anche il profilo di espressione genica delle cellule circolanti nel sangue periferico (54).

Il risultato ottenuto è sorprendente, poiché l'espressione di *Runx-2* è estremamente sovrapponibile all'andamento della BMD sia negli uomini che nelle donne, in particolar modo per quanto riguarda la densità minerale ossea femorale (Figura 13, 14).

Dai nostri dati sembra evidente, quindi, che il PMO sia raggiunto dalle donne nel corso della terza decade e nella quarta dai maschi. Inoltre, è chiaro che uomini e donne abbiamo valori densitometrici analoghi nel tardo periodo puberale, mentre questi aumentino successivamente in misura maggiore nei maschi sia nello scheletro appendicolare che assiale.

La migliore concordanza tra *Runx-2* e BMD femorale, rispetto a quella della colonna lombare, può essere spiegato dalla maggiore variabilità insita a livello della colonna dovuta a fenomeni degenerativi quali cifo-scoliosi, addensamenti artrosici, sclerosi delle limitanti somatiche in corso di discopatie, fratture vertebrali. Questo riveste un ruolo ancora più marcato in una popolazione molto eterogenea in termini di età come la nostra.

Come in precedenza indicato l'attività di *Runx-2* influenza numerosi geni osteoblasto-specifici coinvolti nella regolazione del turn-over (40). Numerose osservazioni mostrano che il markers di turnover osseo sono più elevati nei bambini rispetto agli adulti e questo è particolarmente evidente nel primo anno di vita e alla pubertà, quando si verificano i cambiamenti morfologici più rapidi e più importanti a carico dello scheletro. Dopo la pubertà essi si riducono progressivamente e si mantengono sostanzialmente stabili fino alla terza/quarta decade di vita, periodo in cui comunque rimangono maggiori nei maschi rispetto alle donne. (55,56).

Possiamo ipotizzare, quindi, che la BMD e il turn-over osseo rappresentino il fenotipo dell'espressione genica di *Runx-2* sia in condizioni patologiche (16,39), sia in condizioni fisiologiche

I nostri risultati sono importanti anche dal punto di vista terapeutico. E' estremamente utile conoscere i tempi del fisiologico sviluppo dello scheletro al fine di adattare e migliorare gli approcci terapeutico/farmacologici in coloro che presentano bassa statura o ritardato sviluppo.

Infine abbiamo introdotto con il nostro lavoro alcune interessanti novità metodologiche.

In primo luogo è noto che le MSCs esprimono ad alti livelli geni osteoblasto-specifici nel loro differenziamento lungo la linea osteoblastica (19,20,22). La loro identificazione e raccolta è

difficile, nonostante la possibilità di isolarle dal sangue periferiche da noi introdotta ed utilizzata. (49). Le MSCs circolanti appartengono al totale delle PBMC e nel nostro lavoro abbiamo dimostrato che il profilo di espressione di *Runx-2* nelle due popolazioni cellulari è altamente correlato. Dal momento che la raccolta e la lavorazione delle PBMC è più facile, meno costosa e più veloce, crediamo che possano essere utilizzate in futuro per lo studio dell'espressione di geni osteoblasto-specifici sia in condizioni patologiche che fisiologiche.

Inoltre, abbiamo amplificato 3 diversi geni housekeeping per normalizzare l'espressione del nostro gene di studio. I geni housekeeping sono regolatori endogeni essenziali coinvolti in varie attività cellulari, quali il metabolismo, la struttura cellulare, la trascrizione genica e sono espressi in maniera costitutiva. Molti ricercatori hanno tuttavia dimostrato che essi sono influenzati dal tipo di tessuto considerato (57), da condizioni di ipossia (58), stress fisico, (59) o da altre condizioni sperimentali (60). Tuttavia è critico riuscire a ridurre questa variabilità specialmente quando si deve studiare una popolazione disomogenea in termini di età come la nostra.

I 3 geni housekeeping scelti appartengono a 3 diverse categorie: actina (gene strutturale), GAPDH (gene del metabolismo) and Beta 2 microglobulina (52). L'utilizzo di solo uno di questi geni aveva determinato un'alta variabilità dei nostri risultati nei primi esperimenti eseguiti. La combinazione dei 3 geni ha superato questo problema e abbiamo ottenuto dati più stabili e riproducibili anche quando abbiamo confrontato l'intera popolazione con sottogruppi. L'uso, inoltre, di geni coinvolti in diversi processi o attività cellulari può contribuire ulteriormente a rendere più efficiente l'analisi.

9 CONCLUSIONI

Runx-2 è fondamentale per il metabolismo osseo, non solo nelle prime fasi della vita, ma anche successivamente, nella crescita e nell'invecchiamento.

La relazione tra la sua espressione e la densità minerale ossea indica che è probabilmente responsabile della genesi di numerose patologie dello scheletro.

La possibilità di studiare i geni coinvolti nel metabolismo osseo sia in condizioni fisiologiche che patologiche può diventare più semplice utilizzando il nostro approccio metodologico.

10 BIBLIOGRAFIA

- 1- Kovacs CS 2003 Fetal mineral homeostasis. In: Glorieux FH, Pettifor JM, Juppner H (eds.) *Pediatric Bone: Biology and Diseases*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 271–302.
- 2- Hu H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F 2005 Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 132:49–60.
- 3- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G 1997 *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747–754
- 4- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B 2002 The novel zinc finger-containing transcription factor *osterix* is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17–29.
- 5- Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y 2005 Wnt/beta catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8:739–750.
- 6- Zelzer E, Olsen BR 2005 Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Curr Topics Dev Biol* 65:169–187.
- 7- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B 2002 The transcription factor *Sox9* has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of *Sox5* and *Sox6*. *Genes Dev* 16:2813–2828.
- 8- Yin M, Pacifici M 2001 Vascular regression is required for mesenchymal condensation and chondrogenesis in the developing limb. *Dev Dyn* 222:522–533.
- 9- Bailey DA, McKay HA, Mirwald RL, Crocker PR, Faulkner RA 1999 A six-year longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual in

- growing children: The University of Saskatchewan bone mineral accrual study. *J Bone Miner Res* 14:1672–1679.
- 10- Nguyen TV, Maynard LM, Towne B, Roche AF, Wisemandle W, Li J, Guo SS, Chumlea WC, Siervogel RM 2001 Sex differences in bone mass acquisition during growth. *J Clin Densitom* 4:147–157.
- 11- Bonjour JP, Theintz G, Buchs B, Slosman B, Rizzoli R 1991 Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 73:555–563.
- 12- Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, Offord KP, Dunn WL, Mazess RB, Johnson KA, Melton LJ III 1982 Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. *J Clin Invest* 70:716–723.
- 13- Ahlborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, Karlsson MK 2003 Bone loss and bone size after menopause. *N Engl J Med* 349:327–334.
- 14- Wehrli FW, Hopkins JA, Hwang SN, Song HK, Snyder PJ, Haddad JG 2000 Cross-sectional study of osteopenia with quantitative MR imaging and bone densitometry. *Radiology* 217:527–538.
- 15- Ferrari SL, Rizzoli R, Slosman DO, Bonjour JP 1998 Do dietary calcium and age explain the controversy surrounding the relationship between bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphism? *J Bone Miner Res* 13:363–370.
- 16- Dalle Carbonare L, Valenti MT, Zanatta M, Donatelli L, Lo Cascio V (2009) Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis. *Arthritis Rheum* 60:3356-3365.
- 17- Rosen CJ, Compston JE, Lian JB (2008) Childhood and adolescence. In: Clifford Rosen (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* 7thed.

American Society for Bone and Mineral Research. Lippincott Williams and Wilkins Publishers.

- 18- Gilsanz V, Skaggs DL, Kovanlikaya A, Sayre J, Loro ML, Kaufman F, Korenman SG 1998 Differential effect of race on the axial and appendicular skeletons of children. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1420–1427.
- 19- Friedenstein AJ 1990 Osteogenic stem cells in the bone marrow. In: Heersche JNM, Kanis JA (eds.) *Bone Miner Research*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 243–270.
- 20- Asakura A, Komaki M, Rudnicki M 2001 Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 68:245–253.
- 21- Kolf CM, Cho E, Tuan RS 2007 Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. Arthritis Res Ther ;9(1):204.
- 22- Logan CY, Nusse R 2004 The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781–810.
- 23- Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L 2002 Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157:303–314.
- 24- Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PVN, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB 2005 Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating RUNX2 gene expression. *J Biol Chem* 280:33132–33140.

- 25- Balint E, Lapointe D, Drissi H, van der Meijden C, Young DW, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB 2003 Phenotype discovery by gene expression profiling: Mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 89:401–426.
- 26- Seeherman H, Wozney JM 2005 Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:329–345.
- 27- Shin CS, Lecanda F, Sheikh S, Weitzmann L, Cheng SL, Civitelli R 2000 Relative abundance of different cadherins defines differentiation of mesenchymal precursors into osteogenic, myogenic, or adipogenic pathways. *J Cell Biochem* 78:566–577.
- 28- Liu F, Malaval L, Aubin JE 2003 Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. *J Cell Sci* 116:1787–1796.
- 29- Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y 1994 AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics*, 23, 425–432.
- 30- Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG 2008 Runx2: of bone and stretch. *Int J Biochem Cell Biol*;40(9):1659-63. Epub 2007 Jun 26.
- 31- Li YL, Xiao ZS 2007 Advances in Runx2 regulation and its isoforms. *Med. Hypotheses*, 68, 169–175.
- 32- Westendorf JJ 2006 Transcriptional co-repressors of Runx2. *J. Cell. Biochem*, 98, 54–64.
- 33- Xiao ZS, Hjelmeland AB, Quarles LD 2004 Selective deficiency of the “bone-related” Runx2-II unexpectedly preserves osteoblast-mediated skeletogenesis. *J Biol Chem*; 279(19):20307–13.

- 34- Choi KY, Lee SW, Park MH, et al. 2002 Spatio-temporal expression patterns of Runx2 isoforms in early skeletogenesis. *Exp Mol Med*;34(6):426–33.
- 35- Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V et al. 1999 A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev.*, 13, 1025–1036.
- 36- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR et al. 1997 Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89, 765–771.
- 37- Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S 1999 Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech. Dev.*, 80, 159–170.
- 38- Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A, Matthias P 2002 High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. *Mol.Cell. Biol.*, 22, 6222–6233.
- 39- Pineda B, Hermenegildo C, Laporta P, Tarin JJ, Cano A, Garcia-Perez MA (2010) Common polymorphisms rather than rare genetic variants of the Runx-2 gene are associated with femoral neck BMD in Spanish women. *J Bone Miner Metab* 28:696-705.
- 40- Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizuka N, Ito M, Fukuyama R, Miyazaki T, Kitaura H, Nakamura K, Fujita T, Kanatani N, Moriishi T, Yamana K, Liu W, Kawaguchi H, Nakamura K, Komori T (2007) Runx-2 determines bone maturity and turnover rate on postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Developmental Dynamics* 236:1876-1890.
- 41- Melton LJ III, Khosla S, Atkinson EJ, O’Fallon WM, Riggs BL (1997) Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *J Bone Miner Res* 12:1083–1091.

- 42- Dempster DW 2002 Bone remodeling. In: Coe FL, Favus MJ (eds.) Disorders of Bone Miner Metabolism, 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, pp. 315–343.
- 43- Fleish H: Bone and mineral metabolism 2000 In: Bisphosphonates in bone disease. Eds Academic Press, San Diego, California, USA, pp 1-26.
- 44- Roodman, GD 1999 Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 27: 1229–1241; Simonet WS, Lacey DL 2003 Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337–342.
- 45- Bonewald LF, Mundy GR 1990 Role of transforming growth factor beta in bone remodeling. *Clin Orthop Rel Res* 250:261–276. 33.
- 46- Fiedler J, Roderer G, Gunther KP, Brenner RE 2002 BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 87:306–312.
- 47- Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH 2003 Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodeling osteon—a proposal. *J Biomech* 36:1452–1459.
- 48- Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, Lo Cascio V, Giannini S (2005) Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron* 36:609-616.
- 49- Valenti MT, Dalle Carbonare L, Donatelli L, Bertoldo F, Zanatta M, Lo Cascio V (2008) Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone* 43:1084-1092.
- 50- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986–994.

- 51- Touchberry CD, Wacker MJ, Richmond SR, Whitman SA, Godard MP (2006) Age-Related Changes in Relative Expression of Real-Time PCR Housekeeping Genes in Human Skeletal Muscle. *J Biomol Tech* 17:157–162.
- 52- Radonic A, Thulke S, Mackay I M, Landt O, Siergert W, Nitsche A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 856-862.
- 53- Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (delta delta Ct) method. *Methods*; 25:402–8.
- 54- Liew CC (2006) The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J Lab Clin Med* 147:126-132.
- 55- Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 11(Suppl 6) 2000;S2–S17.
- 56- Fatayerji D, Eastell R. Age-Related Changes in Bone Turnover in Men. *J Bone Miner Res* 1999;14:1203-10.
- 57- Hsiao LL, Dangond F, Yoshida T, Hong R, Jensen RV, J. Misra J et al. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol Genomics* 2001;7:97–104.
- 58- Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:523–26.
- 59- Jemiolo B, Trappe S. Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: validation of internal control with exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:1043–50.

60- Valenti MT, Bertoldo F, Dalle Carbonare L, Azzarello G, Zenari S, Zanatta M et al. The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? BMC Cancer 2006;6:49.