

Livelli sierici di DICKKOPF-1 nei soggetti affetti da gammopatie monoclonali di significato indeterminato

R. Cardinali, D. Fiorentino, P. Capuani, L. Pappaccogli, G. Lobreglio

U.O. Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera "Cardinale G. Panico", Tricase (LE)

Riassunto

Premesse. Dickkopf-1 (DKK-1) è una proteina secreta da osteoblasti e osteociti, che agisce come modulatore negativo della via di segnalazione cellulare WNT/ β -catenina e riveste un ruolo fondamentale nella differenziazione e crescita degli osteoblasti e nella regolazione del metabolismo osseo. In alcuni soggetti con gammopatie monoclonali di significato indeterminato (MGUS) si verifica, con un meccanismo non ancora del tutto noto, un incremento del riassorbimento osseo e un'aumentata prevalenza di fratture vertebrali. Lo scopo del nostro lavoro è di valutare il potenziale ruolo svolto dal DKK-1 nello sviluppo della compromissione scheletrica in pazienti con MGUS.

Metodi. I livelli sierici di DKK-1 sono stati dosati in 128 pazienti affetti da MGUS (61 IgGk, 35 IgG λ , 9 IgAk, 13 IgA λ ; 8 IgMk; 2 IgM λ) (51 femmine, 77 maschi; età media, 77 ± 16 anni) e in 48 soggetti comparabili per sesso ed età. Il dosaggio del DKK-1 è stato eseguito con metodica immunoenzimatica a sandwich su micropiastra (Biomedica Medizinprodukte, Vienna, Austria). Nessuno

dei pazienti con MGUS e dei soggetti di controllo presentava fratture vertebrali o evidenze radiologiche di osteolisi.

Risultati. I risultati hanno evidenziato una concentrazione sierica di DKK-1 significativamente più bassa nei pazienti affetti da MGUS (11.4 ± 7.9 pmol/L) rispetto ai soggetti di controllo (22.1 ± 13.1 pmol/L; $p < 0.001$).

Conclusioni. Recenti studi suggeriscono che un aumento dell'attività osteoclastica sostenuto da vari fattori attivanti (RANK-L, parathyroid hormone-related protein, interleuchina-1 e macrophage protein 1-alpha), svolge un ruolo determinante nella compromissione scheletrica che si sviluppa in pazienti con mieloma multiplo e in alcuni soggetti con MGUS. La riduzione dei livelli sierici di DKK-1 da noi osservata nei soggetti con MGUS, potrebbe essere determinata da un meccanismo di feed-back per contrastare l'attività osteoclastica e pertanto compensare l'aumentato riassorbimento osseo con un incremento dell'attività degli osteoblasti.

Summary

DICKKOPF-1 protein levels in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance

Background. Dickkopf-1 (DKK-1) is a protein expressed by osteoblasts and osteocytes; it acts as soluble inhibitor of the WNT/ β -catenin signaling pathway. DKK-1 is a crucial regulator of osteoblast growth and differentiation and has been involved in the regulation of bone metabolism. A raised bone resorption with an increased prevalence of vertebral fractures has been reported among patients with monoclonal gammo-

pathy of undetermined significance (MGUS), but the mechanism of this bone loss is poorly understood. The aim of this study is to evaluate a possible role of DKK1, in the development of skeletal involvement in patients with MGUS.

Methods. DKK-1 serum levels were quantified in 128 patient with MGUS (61 IgGk, 35 IgG λ , 9 IgAk, 13 IgA λ ; 8 IgMk; 2 IgM λ) (51 females, 77 males; mean age, 77 ± 16 years) and in 48 normal subjects by ELISA (Biomedica Medizinprodukte, Wien, Austria). None of the patients with MGUS had vertebral fracture or apparent radiographic evidence of osteolytic lesions.

Results. The results show a significantly lower concentration of DKK-1 among patients with MGUS (11.4 ± 7.9 pmol/l) compared to normal subjects (22.1 ± 13.1 pmol/L; $P < 0.001$).

Conclusions. Osteoclast activation occurs through a variety of factors, including RANK-L, parathyroid hormone-related protein, interleukin-1 and macrophage protein 1-alpha, and has been implicated in the development of skeletal involvement in patients with mul-

tiply myeloma and MGUS. Our results suggest that the low expression of DKK-1 observed in patients with MGUS, might be determined by a feed-back loop to counteract the role of osteoclast-activating factors and thus compensate the increased bone resorption with new bone formation.

Key-words: Dickkopf-1, monoclonal gammopathy of undetermined significance, receptor activator of nuclear factor-kB ligand, osteoprotegerin.

Introduzione

Le gammopatie monoclonali di significato indeterminato (MGUS) rappresentano una condizione caratterizzata dalla presenza di una proteina monoclonale, in soggetti che non manifestano evidenza clinica di mieloma multiplo o di altri disordini linfoproliferativi come macroglobulinemia di Waldenstrom, amiloidosi, linfoma a cellule B o leucemia linfatica cronica¹.

Secondo i criteri classificativi proposti dall'International Myeloma Working Group, si definisce come MGUS, la presenza nel siero di una proteina monoclonale a concentrazioni inferiori a 3 g per decilitro, un'infiltrazione plasmacellulare midollare inferiore al 10% e l'assenza di manifestazioni cliniche correlabili ad una gammopatia monoclonale². L'incidenza delle MGUS aumenta significativamente con l'età: è pari al 3.2% nei soggetti di età inferiore a 50 anni e al 5.3% dopo 50 anni. L'età media alla diagnosi è circa 70 anni³.

La causa delle MGUS è sconosciuta. Le gammopatie monoclonali sono caratterizzate dal riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline che comporta la produzione della proteina monoclonale⁴. In pazienti con MGUS il clone plasmacellulare e la relativa proteina monoclonale rimangono stabili per anni; tuttavia, dopo un prolungato periodo di follow-up, in una bassa percentuale di casi, l'MGUS evolve in un disordine plasmacellulare⁵. Il meccanismo responsabile della progressione della MGUS verso il mieloma o altri disordini correlati non è ancora conosciuto. Il rischio di progressione del MGUS a mieloma multiplo o ad altre patologie correlate è circa dell'1% per anno³. In uno studio a lungo termine condotto su 1384 casi di MGUS diagnosticati e seguiti negli USA dalla Mayo Clinic tra il 1960 ed il 1994, la probabilità di evoluzione neoplastica è stata del 10% a 10 anni, del 21% a 20 anni, del 30% a 25 anni dalla diagnosi⁶.

In alcuni soggetti con gammopatie monoclonali di significato indeterminato si verifica, con un meccanismo non ancora del tutto definito, un incremento del riassorbimento osseo ed un'aumentata prevalenza di fratture vertebrali⁷.

L'aumento del riassorbimento osseo è strettamente associato alla progressione delle MGUS e svolge un ruolo determinante nella compromissione scheletrica

che si sviluppa in alcuni soggetti con MGUS e in pazienti con mieloma multiplo⁸.

Recentemente è stato valorizzato con convincenti evidenze sperimentali il ruolo di Dickkopf-1 (DKK-1) nella patogenesi delle lesioni osteolitiche nel mieloma multiplo^{9,10}.

Il DKK-1, una proteina di 28672 kDa secreta da osteoblasti e osteociti, riveste un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo osseo agendo da modulatore negativo della via di segnalazione cellulare WNT/ β -catenina. L'interazione delle WNT glicoproteine con uno specifico complesso recettoriale (LPR5/6-FZD), determina la stabilizzazione della β -catenina, che trasloca nel nucleo modulando l'espressione di geni coinvolti nella differenziazione e crescita degli osteoblasti. DKK-1 antagonizza il segnale WNT formando un complesso ternario con LPR5/6 e con un recettore a singolo dominio transmembrana appartenente alla famiglia Kremen (Krm1/2). Questa interazione promuove l'endocitosi del corecettore LPR5/6 riducendone la disponibilità per le proteine WNT. La conseguente mancata stabilizzazione della β -catenina e la sua successiva degradazione, blocca la via di segnalazione WNT e compromette l'omeostasi scheletrica interferendo con i processi di maturazione e differenziazione degli osteoblasti¹¹.

L'importanza del DKK-1 nella patogenesi delle alterazioni scheletriche nel mieloma multiplo è supportata dalla dimostrazione che plasmacellule midollari di pazienti con mieloma multiplo inibiscono la differenziazione *in vitro* degli osteoblasti. La somministrazione di anticorpi anti-DKK1 ripristina l'attività degli osteoblasti⁹.

Lo scopo del nostro lavoro è di valutare il potenziale ruolo svolto dal DKK-1 nello sviluppo della compromissione scheletrica in pazienti con MGUS.

Materiali e metodi

Sono stati valutati 128 pazienti affetti da MGUS, (51 femmine, 77 maschi; età media, 77 anni; range, 61-93) diagnosticata in accordo ai criteri classificativi proposti dall'International Myeloma Working Group, di cui 61 presentavano una paraproteina di tipo IgGk, 35 IgG λ , 9 IgAk, 13 IgA λ , 8 IgMk, 2 IgM λ e 48 soggetti nor-

Tabella I. Descrizione della popolazione studiata.

Caratteristiche	MGUS	CONTROLLO
No. di pazienti	128	48
% Femmine	40	38
% Maschi	60	62
Età media $\pm$ SD	71 $\pm$ 16	68 $\pm$ 14
IgG k	61	
IgG λ	35	
IgA k	13	
IgA λ	9	
IgM k	8	
IgM λ	2	

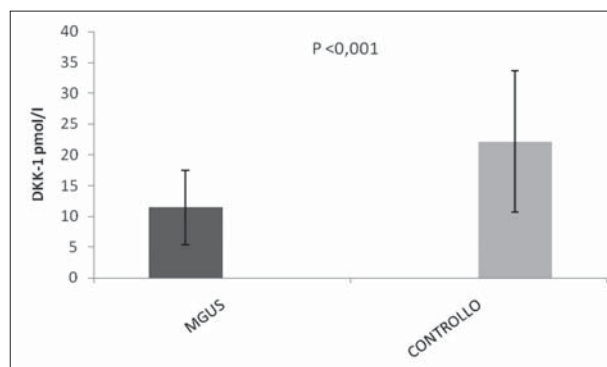
mali comparabili per sesso ed età (Tab. I). Nessuno dei pazienti con MGUS e dei soggetti di controllo presentava fratture vertebrali o evidenze radiologiche di osteolisi. I sieri dei pazienti sono stati raccolti, aliquotati, congelati a -20 °C e processati nella stessa seduta analitica per ridurre al minimo le variazioni inter-assay.

Il dosaggio del DKK-1 è stato eseguito con metodica immunoenzimatica a sandwich su micropiastra coattata con anticorpi monoclonali anti-DKK-1 (Bio-medica Medizinprodukte, Vienna, Austria) con CV intra-assay del 7%. Il siero dei pazienti preventivamente diluito, i controlli, i calibratori e anticorpi anti-DKK-1 biotinilati sono stati incubati overnight al buio a temperatura ambiente (18-26 °C). Dopo il lavaggio della fase solida è stato aggiunto il coniugato Streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) e lasciato incubare per 1 ora; il coniugato legato, non rimosso da una precedente fase di lavaggio è stato rilevato mediante una reazione colorimetrica tra la HRP e il substrato la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) bloccata dall'aggiunta di una soluzione d'arresto (acido solforico 2N). L'estinzione è misurata a 450 nm usando multiplate ELISA reader (PR 3100 Bio-Rad Laboratories, Hercules, U.S.A). L'intensità della colorazione, letta spettrofotometricamente a 450 nm, è funzione dell'enzima coniugato al complesso ed è misurata in unità d'assorbimento. La concentrazione del DKK-1 presente nel campione, viene stimata dall'interpolazione di una curva costituita con 6 calibratori a differente concentrazione (0, 3.12, 6.25, 12.5, 25 e 50 pmol/L).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata realizzata utilizzando il programma MedCalc Software per Windows.

Per la valutazione della distribuzione normale dei dati

**Figura 1.** Concentrazione sierica di DKK-1 in 128 pazienti con MGUS e in 48 soggetti di controllo. Le barre di errore rappresentano la deviazione standard (SD).

è stato utilizzato il test di Kolmogorov-Smirnov (distribuzione dei dati non normale). Per il confronto tra le mediane è stato utilizzato il Mann-Whitney U-test. E' stato considerato significativo un valore di $P < 0.05$.

Risultati

Il dosaggio mediante metodica ELISA di DKK-1 ha evidenziato una concentrazione sierica di DKK-1 significativamente più bassa nei pazienti affetti da MGUS rispetto ai soggetti di controllo.

Nei 48 soggetti di controllo la mediana della concentrazione sierica di DKK-1 è di 22,1 pmol/L (range 13.9-40.1); nei 128 pazienti con MGUS la mediana della concentrazione sierica di DKK-1 risulta pari a 11.4 pmol/L (range 0.7-16.5) (Fig. 1); la differenza tra le concentrazioni sieriche di DKK-1 tra i due gruppi oggetto di studio è risultata statisticamente significativa ($P < 0.001$) (Tab. II).

Discussione

In alcuni soggetti con gammopatie monoclonali di significato indeterminato (MGUS) si verifica, con un meccanismo non ancora del tutto definito, un incremento del riassorbimento osseo ed un'aumentata prevalenza di fratture vertebrali⁷. L'aumentata perdita ossea è verosimilmente mediata da alterazioni dell'equilibrio dei processi di riassorbimento osseo e di neoformazione. Nei pazienti affetti da mieloma multiplo è stato dimostrato un incremento della concentrazione sierica di DKK-1 rispetto a soggetti con MGUS; inoltre, i pazienti con mieloma multiplo e malattia ossea in fase attiva manifestano livelli circolanti della proteina più elevati rispetto ai pazienti senza lesioni ossee¹⁰. Tian

Tabella II. Livelli sierici di DKK-1 in pazienti con MGUS e in soggetti di controllo.

	<i>n</i>	DKK-1 media (pmol/L)	DKK-1 mediana (pmol/L)	Range	SD (pmol/L)	<i>P</i>
CONTROLLO	48	27	22.1	13.9-40.1	13.1	<0.001
MGUS	128	8.6	11.4	0.7-16.5	7.9	

et al. impiegando microarray proteici, hanno confermato un'over-espressione del DKK-1 da parte delle cellule neoplastiche di pazienti affetti da mieloma multiplo con lesioni osteolitiche rispetto alle plasmacellule di pazienti con gammopatia monoclonale di significato indeterminato e di soggetti sani; è stata inoltre documentata una positiva correlazione tra l'espressione di DKK-1 nel microambiente osteomidollare e nel sangue periferico⁹. Il DKK-1 altera la fisiologia del rimodellamento osseo inibendo il differenziamento degli osteoblasti ed stimolando la maturazione e l'attivazione degli osteoclasti. Questa duplice attività identifica nel DKK-1 il principale regolatore del processo patologico di rimodellamento osseo basato sull'interazione tra pathways anabolici e catabolici¹².

Diarra et al. hanno evidenziato una stretta interazione tra DKK-1 ed il sistema RANKL, RANK, OPG che fisiologicamente riveste un ruolo di cruciale rilevanza nel controllo della osteoclastogenesi. Il legame tra RANKL (*receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*) e il suo specifico recettore (RANK), espresso sugli osteoclasti e precursori osteoclastici, promuove la differenziazione, la proliferazione e la sopravvivenza degli osteoclasti. L'attività funzionale di RANKL nel microambiente osseo è modulata dall'osteoprotegerina (OPG) una proteina che agisce come "decoy-receptor" in grado di disattivare funzionalmente RANKL. Il rapporto RANKL/OPG regola la formazione e l'attività degli osteoclasti e rappresenta il principale determinante del numero e dell'attività degli osteoclasti¹³.

Bloccando l'espressione di DKK-1 si osserva l'inibizione della differenziazione e proliferazione degli osteoclasti ed un aumento dell'espressione di OPG; è verosimile che la produzione di OPG possa a sua volta regolare l'espressione del DKK-1 mediante un meccanismo di feed-back inibendo i processi litici nell'osso¹².

Soggetti con MGUS presentano un significativo aumento dei livelli sierici di OPG rispetto a pazienti con mieloma multiplo ed un incremento del rapporto RANKL/OPG rispetto ai soggetti di controllo¹⁴. Ciò suggerisce che il riassorbimento osseo è un evento precoce nelle gammopatie monoclonali di significato indeterminato, come supportato anche da studi istomorfometrici e dai recenti dati che documentano un'elevata incidenza di fratture vertebrali⁷. Tuttavia, i pazienti con MGUS non manifestano evidenti lesioni osteolitiche, finché l'attività osteoblastica compensa l'aumentata perdita ossea.

I soggetti con MGUS valutati nel presente lavoro non presentavano fratture vertebrali o evidenze radiologiche di osteolisi. Il dosaggio dei livelli circolanti di DKK-1 ha documentato una significativa riduzione della concentrazione sierica della proteina in pazienti con MGUS rispetto al gruppo di controllo costituito da soggetti sani.

La riduzione dei livelli sierici di DKK-1 da noi osservata in soggetti con MGUS potrebbe essere determinata da un meccanismo di feed-back, verosimilmente

mediato dall'OPG, finalizzato a contrastare l'aumento dell'attività osteoclastica con un incremento dell'attività degli osteoblasti. Pertanto, possiamo interpretare i bassi livelli sierici di DKK-1 ottenuti in pazienti con MGUS senza lesioni osteolitiche, come il risultato di un meccanismo compensatorio finalizzato a mantenere l'omeostasi scheletrica. Tuttavia, i nostri risultati evidenziano la necessità di ulteriori studi sull'argomento che possano ulteriormente approfondire il ruolo svolto dal DKK-1 nella regolazione dei processi di rimodellamento osseo nei pazienti affetti da MGUS.

Le recenti acquisizioni sul ruolo del DKK-1 nei meccanismi molecolari coinvolti nella fisiopatologia del tessuto osseo potrebbero consentire la precoce identificazione dei soggetti ad elevato turnover osseo, che risultano maggiormente esposti al rischio di sviluppare fratture vertebrali e che pertanto, potrebbero trarre beneficio da un trattamento con farmaci inibitori dell'attività osteoclastica⁸.

Inoltre, la progressiva comprensione degli aspetti molecolari del processo patogenetico di rimodellamento osseo potrà contribuire alla identificazione di nuovi bersagli terapeutici che possano agire selettivamente nel bloccare i processi responsabili dell'alterazione dell'omeostasi scheletrica.

Bibliografia

1. Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: natural history in 241 cases. *Am J Med* 1978; 64:814-26.
2. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; 121:749-57.
3. Kyle RA, Terry M, Therneau TM, Rajkumar SV, Dirks R, Larson MS, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006; 354:1362-9.
4. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004; 104:607-18.
5. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; 91:3-21.
6. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ III. Long-term follow-up of 241 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance: the original Mayo Clinic series 25 years later. *Mayo Clin Proc* 2004; 79:859-66.
7. Melton LJ III, Rajkumar V, Khosla S, Achenbach SJ, Oberg AL, Kyle RA. Fracture risk in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Bone Miner Res* 2004; 19:25-30.
8. Bataille R, Chappard D, Basle MF. Quantifiable excess of bone resorption in monoclonal gammopathy is an early symptom of malignancy: a prospective study of 87 bone biopsies. *Blood* 1996; 87:4762-9.
9. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in

- the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003; 349:2483-94.
10. Politou MC, Heath DJ, Rahemtulla A, Szydlo R, Anagnostopoulos A, Dimopoulos MA, et al. Serum concentrations of Dickkopf-1 protein are increased in patients with multiple myeloma and reduced after autologous stem cell transplantation. *Int J Cancer* 2006; 119:1728-31.
 11. Westerndorf JJ, Kahler R, Schroeder M. WNT signalling in osteoblasts and bone disease. *Gene* 2004; 341:19-39.
 12. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007; 13:156-63.
 13. Roodman GD. Mechanisms of Bone Metastasis. *N Engl J Med* 2004; 350:1655-64.
 14. Politou MC, Terpos E, Anagnostopoulos A, Szydlo R, Laffan M, Layton M, et al. Role of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), osteoprotegerin and macrophage protein 1-alpha (MIP-1a) in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Br J Haematol* 2004; 126:686-9.