

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ RANKL ΣΕ

ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΝΕΩΝ

ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΦΩΤΕΙΝΗ ΒΙΟΛΙΤΖΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΝΗ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2013

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ RANKL ΣΕ

ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΝΕΩΝ

ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΦΩΤΕΙΝΗ ΒΙΟΛΙΤΖΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΕΛΕΝΗ ΝΤΟΥΝΗ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2013

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΜΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ RANKL ΣΕ

ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΝΕΩΝ

ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΦΩΤΕΙΝΗ ΒΙΟΛΙΤΖΗ

Επιβλέπουσα

Ελένη Ντούνη, Επίκουρος Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Μέλη

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ιωάννης Κλώνης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Στην 13^η Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύγκλησης (Γ.Σ.Ε.Σ.) που πραγματοποιήθηκε στις 07-06-2013 ορίστηκε η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:

Επίκουρη Καθηγήτρια Ε. Ντούνη (Επιβλέπουσα)

Καθηγητής Η. Ηλιόπουλος (Μέλος)

Καθηγητής Ι. Κλώνης (Μέλος)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια κυρία Ε. Ντούνη, τον Καθηγητή κύριο Η. Ηλιόπουλο και τον Καθηγητή κύριο Ι. Κλώνη ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής που επέβλεψαν την μεταπτυχιακή μου μελέτη.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο καθηγήτρια κυρία Ελένη Ντούνη για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την μεταπτυχιακή μου διατριβή στην ερευνητική της ομάδα τόσο για την συνεχή επίβλεψη, την καθοριστική βοήθεια, τις πολύτιμες γνώσεις πάνω στο αντικείμενο της έρευνας, την μεγάλη υπομονή που επέδειξε καθ' όλη την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο αλλά και για τις διορθώσεις και την επιμέλεια στο κείμενο της μεταπτυχιακής διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ε.Κ.Ε.Β.Ε. Φλέμινγκ και το Εργαστήριο Γενετικής Γ.Π.Α. για την διάθεση των υποδομών στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Βαγγέλη Ρηνώτα για την πολύτιμη βοήθειά του στον χειρισμό και εξοικείωση των μηχανημάτων, τις συμβουλές τους και της μεθόδους που με βοήθησαν ιδιαίτερα κατά την εκτέλεση των πειραμάτων. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα του καθηγητή κύριου Η. Ηλιόπουλου (Εργαστήριο Γενετικής, Γ.Π.Α) για τον σχεδιασμό των αναλόγων του SPD-304, την ομάδα του καθηγητή κύριο Η. Κουλαδούρου (Εργαστήριο Χημείας, Γ.Π.Α.) και την Pharmaten/Proactina για την σύνθεσή τους, την ομάδα του αναπληρωτή καθηγητή κύριο Γ. Κοντοπίδη (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) για τις δοκιμές πρόσδεσης και τέλος, το πρόγραμμα Συνεργασία με τίτλο «From Targets to Leads: Innovative therapeutics for arthritis» που συνέβαλλε για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στους γονείς μου, στην αδερφή μου Αριστέα, τον Νίκο και όλους μου τους φίλους χωρίς την βοήθεια και την υποστήριξη των οποίων δεν θα κατάφερα να ολοκληρώσω την διατριβή μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοπόρωση είναι μία μεταβολική ασθένεια των οστών που πλήττει μεγάλο μέρος του πληθυσμού παγκοσμίως, κυρίως γυναικών μετά την εμμηνόπαυση. Στους ασθενείς που πάσχουν από οστεοπόρωση παρατηρείται μείωση της ποσότητας και ποιότητας της οστικής τους μάζας, με συνέπεια τα οστά τους να είναι πιο εύθραυστα και να αυξάνεται ο κίνδυνος καταγμάτων. Οι μελέτες για τα αίτια που προκαλούν την ασθένεια, οδήγησε στο μεταβολικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη RANKL και τον υποδοχέα RANK. Η πρωτεΐνη RANKL, ελέγχει την δράση ειδικών κυττάρων στον οργανισμό, τους οστεοκλάστες, οι οποίοι προκαλούν οστική απορρόφηση και συμμετέχουν στην φυσιολογική διαδικασία της οστικής αναδόμησης. Αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης RANKL οδηγούν σε αύξηση της δράσης των οστεοκλαστών με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ισορροπία της οστικής αναδόμησης και να προκαλείται οστική απώλεια. Ο κεντρικός ρόλος του RANKL στην οστική απώλεια επισφραγίστηκε από τα θεαματικά αποτελέσματα κλινικών δοκιμών ενός μονοκλωνικού αντισώματος, το denosumab, έναντι του RANKL σε οστεοπορωτικές εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Το denosumab αναστέλλει την πρόσδεσή του RANKL στον υποδοχέα RANK και έχει εγκριθεί πλέον για την θεραπεία της οστεοπόρωσης παγκοσμίως.

Σε μια προσπάθεια εύρεσης νέων αναστολέων του RANKL, επικεντρωθήκαμε στο μικρό μόριο SPD-304 που αναστέλλει τον τριμερισμό της πρωτεΐνης TNF και μελέτες μας έδειξαν ότι η δράση του RANKL αναστέλλεται επίσης από το μόριο αυτό το οποίο όμως προκαλεί υψηλή κυτταροτοξικότητα. Με σκοπό την βελτίωση των χαρακτηριστικών του SPD-304 και την αποφυγή κυτταροτοξικότητας, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν δομικά ανάλογά του τα οποία στοχεύουν την περιοχή του τριμερισμού του RANKL. Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης αξιολογήθηκαν 9 ανάλογα του SPD-304 σε λειτουργικές δοκιμές RANKL-επαγόμενης οστεοκλαστογένεσης και κυτταροτοξικότητας. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι δύο από τα μόρια (PRA2.2.3, PRA2.2.2) δρουν παρόμοια με το SPD-304, δύο μόρια (PRA2.2.4, PRA9.2.8) είναι ελάχιστα λιγότερο τοξικά από το αρχικό μόριο ενώ μειώνεται λίγο και η δραστηκότητά τους, δύο μόρια (PRA6.2.12, PRA6.3.12) είναι λιγότερο τοξικά και εξαιρετικά δραστικά σε σχέση με το SPD-304, ενώ σε τρία μόρια (PRA2.2.1, PRA5.2.8, PRA8.2.8) μειώθηκε δραματικά η κυτταροτοξικότητα επιδεικνύοντας πολύ καλά χαρακτηριστικά πρόσδεσης και αναστολής της δράσης του

RANKL. Επίσης, για την ανίχνευση του τρόπου δράσης των αναλόγων του SPD-304, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διασταυρούμενης σύνδεσης, τα οποία φανέρωσαν αύξηση των μονομερών της πρωτεΐνης παρουσία των αναστολέων, δηλαδή, ένα μηχανισμό δράσης παρόμοιο με το αρχικό μόριο. Από τα SPD-304 ανάλογα, το PRA8.2.8. επέδειξε τα καλύτερα χαρακτηριστικά και επιλέχθηκε για *in vivo* δοκιμή σε RANKL-επαγόμενα διαγονιδιακά μοντέλα οστεοπόρωσης που δημιουργήθηκαν πρόσφατα στο εργαστήριό μας.

ABSTRACT

Osteoporosis is a degenerative bone disease that affects a wide range of the elderly population worldwide, especially women after menopause. Patients suffering from osteoporosis exhibit reduction in bone mass, leading to fragile bones and increased incidence of fractures. Studies to identify the cause of the disease indicated that the metabolic pathway activated by RANKL protein and its receptor RANK plays a vital role in bone loss. RANKL regulates the function of specific cells in the organism, the osteoclasts that absorb bone during the normal process of bone remodeling. Increased levels of RANKL result in enhanced osteoclast activity leading to bone loss. The central role of RANKL in bone loss has been verified by the remarkable efficacy of a monoclonal antibody against human RANKL, denosumab, in postmenopausal osteoporosis. Denosumab inhibits RANKL binding to RANK and has been approved for the treatment of osteoporosis worldwide.

In an attempt to discover new inhibitors of human RANKL, we focused on the small molecule SPD-304, that inhibits the trimerization of TNF. Our previous studies showed that it can also inhibit RANKL, but is very toxic. In order to improve the characteristics of SPD-304 and to decrease its toxicity, structural analogues of the SPD-304 molecule were designed and synthesized that target the trimerization region of RANKL. In this study, 9 analogues of SPD-304 have been evaluated in functional assays of RANKL-induced osteoclastogenesis and cell toxicity. The results showed that two molecules (PRA2.2.3, PRA2.2.2) had the same effect as SPD-304, two molecules (PRA2.2.4, PRA9.2.8) were subtly less toxic than the original, but also less active, two molecules (PRA6.2.12, PRA6.3.12) were less toxic and incredibly active compared to SPD-304, while in three molecules (PRA2.2.1, PRA5.2.8, PRA8.2.8) the toxicity was dramatically decreased, exhibiting great capacity for binding and inhibition of RANKL function. Furthermore, in order to detect how SPD-304 analogues operate, cross-linking experiments were conducted showing an increase in protein monomers, suggesting a similar mechanism of action with the original molecule. From these molecules, PRA8.2.8 showed the best characteristics and was chosen for *in vivo* evaluation in the RANKL-induced transgenic mouse models of osteoporosis developed in our lab recently.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1 Η ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF).....	11
1.1.1. Ιστορική αναδρομή.....	11
1.1.2. Αναγνωρισμένα μέλη της TNF υπεροικογένειας	12
1.1.3. Η Υπεροικογένεια των TNF υποδοχέων (TNFR)	14
1.1.4. Ο ρόλος των πρωτεϊνών της TNF υπεροικογένειας στα αυτοάνοσα νοσήματα....	17
1.2 ΠΡΟΣΔΕΤΗΣ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ-κΒ (RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR-κΒ LIGAND – RANKL).....	18
1.2.1. Η δομή της πρωτεΐνης RANKL.....	19
1.2.2 Η πρωτεΐνη RANKL και οι υποδοχείς της RANK και OPG.....	21
1.2.3 Η επίδραση της πρωτεΐνης RANKL στην οστεοκλαστογένεση.....	24
1.2.4. Η επίδραση της πρωτεΐνης RANKL στο ανοσοποιητικό σύστημα.....	28
1.3 ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΔΟΜΗΣΗ.....	29
1.3.1 Φυσιολογική οστική αναδόμηση.....	29
1.3.2. Ασθένειες που συνδέονται με την πρωτεΐνη RANKL.....	31
1.4 ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ.....	32
1.4.1. Παθοφυσιολογία της ασθένειας.....	33
1.4.2. Θεραπεία.....	34
1.4.3 Το φαρμακευτικό προϊόν Denosumab.....	36
1.5 ΕΥΡΕΣΗ ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΟΥ-ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ TNF	40
1.5.1 Αξιολόγηση του μορίου SPD-304 ως αναστολέα της πρωτεΐνης RANKL	43
1.5.2 Τοξικότητα του μορίου SPD-304	45
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΠΟ ΜΑΚΡΑ ΟΣΤΑ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ.....	47

2.2 ΔΟΚΙΜΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΜΕΣΩ RANKL ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ TRAP (RANKL INDUCED OSTEOCLASTOGENESIS WITH TRAP STAINING)	49
2.3 ΔΟΚΙΜΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΩΝ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ TRAP (TRAP ACTIVITY ASSAY).....	51
2.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης στα λυμένα κύτταρα με τη μέθοδο Bradford.....	52
2.4 ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ MTT (MTT TOXICITY ASSAY)	53
2.5 CROSS LINKING – WESTERN BLOTTING	55
2.5.1 Cross linking – Ηλεκτροφόρηση	55
2.5.2 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	57
2.5.3. Western Blotting.....	57
2.5.4. Εμφάνιση της μεμβράνης	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	60
3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ SPD-304	60
3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΙΚΑΝΟΝΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ	62
3.3 RANKL-ΕΠΑΓΩΜΕΝΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ	63
3.3.1. Λειτουργική δοκιμή οστεοκλαστογένεσης.....	63
3.3.2. Δοκιμή δραστηριότητας όξινης φωσφατάσης (TRAP)	65
3.3.3. Αναστολή δοκιμής οστεοκλαστογένεσης.....	65
3.4 ΔΟΚΙΜΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ/ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ MTT (MTT TOXICITY ASSAY).....	66
3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ.....	67
3.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ SPD-304 ΑΝΑΛΟΓΩΝ.....	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)

1.1.1. Ιστορική αναδρομή

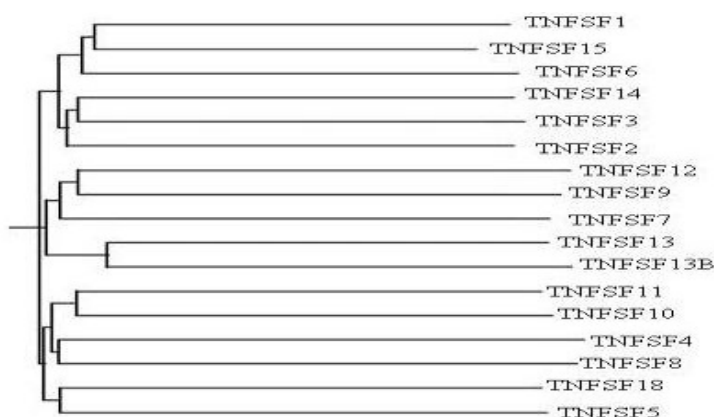
Οι πρώτες αναφορές για την ύπαρξη κάποιου βιολογικού παράγοντα ο οποίος προκαλεί νέκρωση σε όγκους χρονολογούνται από τις αρχές του 18^{ου} αιώνα, μετά από παρατηρήσεις συρρίκνωσης των όγκων σε ορισμένους καρκινοπαθείς ασθενείς οι οποίοι εκτίθονταν σε σοβαρή μικροβιακή μόλυνση. Το 1968, ο Dr. Gale A. Granger από το πανεπιστήμιο της California, ανέφερε μια πρωτεΐνη με κυτταροτοξικές ιδιότητες η οποία παραγόταν από τα λεμφοκύτταρα και την ονόμασε λεμφοτοξίνη (Williams et al., 1968). Λίγα χρόνια αργότερα, το 1975, ο Dr. Lloyd Old στο Sloan-Kettering Memorial Cancer Center της Νέας Υόρκης, ανέφερε μια άλλη πρωτεΐνη με κυτταροτοξικές δραστηριότητες η οποία πιθανώς παραγόταν από μακροφάγα (Carswell et al., 1975). Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε “Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων” ή “Tumor Necrosis Factor” (TNF) και δείχθηκε ότι απελευθεωνόταν στην κυκλοφορία και προκαλούσε ταχεία νέκρωση και μείωση στο μέγεθος ορισμένων όγκων. Η νεκρωτική ικανότητα του TNF δεν είχε τα ίδια αποτελέσματα σε όλα τα είδη όγκων και οι θεραπευτικές προοπτικές που παρουσιάζονταν δεν μπορούσαν να υλοποιηθούν λόγω της συστηματικής τοξικότητας που προκαλούσε σε δραστικές συγκεντρώσεις. Σήμερα, ο TNF έχει καθιερωθεί για τις προφλεγμονώδεις ιδιότητές του και όχι για την νέκρωση των όγκων.

Η ανακάλυψη του TNF και της λεμφοτοξίνης (ή TNF-β) καθώς και η δομική και λειτουργική ομολογία τους οδήγησε τους ερευνητές στα να δώσουν αυτή την κοινή ονομασία σε μια πολύ μεγαλύτερη οικογένεια κυτταροκινών που πλέον ονομάζεται **TNF υπεροικογένεια**. Μέχρι τώρα έχουν αναγνωριστεί 18 μέλη της υπεροικογένειας αυτής και αρκετά από αυτά έχει φανεί ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής απόπτωσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης καθώς και στη διαφοροποίηση των κυττάρων, με διαδικασίες που δεν έχουν επακριβώς ξεκαθαριστεί ακόμη. Οι περισσότερες από τις κυτταροκίνες της υπεροικογένειας του TNF παράγονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κάτι που υποδεικνύει το ρόλο τους στην ανοσολογική ρύθμιση (Ursana et al., 2003).

Ο TNF και η λεμφοτοξίνη αποτελούν δύο δομικά και λειτουργικά όμοιες πρωτεΐνες, οι οποίες απομονώθηκαν το 1984 από ενεργοποιημένα μακροφάγα και T-λεμφοκύτταρα αντίστοιχα (Pennica et al., 1984; Aggarwal et al., 1984). Η αποκάλυψη με ακτίνες X της δομής της λεμφοτοξίνης σαν σύμπλοκο με τον υποδοχέα TNFR-1 αποτέλεσε σταθμό για την μοριακή κατανόηση για το πώς λειτουργεί ο TNF (Sedgwick et al, 1999). Το τριμερές του TNF δένεται σε τρία μόρια του υποδοχέα, ένα για το κάθε μονομερές. Η εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα είναι ένα επίμηκες μόριο το οποίο αποτελείται από 4 υπομονάδες που περιέχουν δισουλφιδικές γέφυρες.

1.1.2. Αναγνωρισμένα μέλη της TNF υπερικογένειας

Η TNF υπερικογένεια σήμερα αποτελείται από 18 μέλη που μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 1.1). Ορισμένες από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες της οικογένειας είναι οι: TNF, RANKL, BAFF, APRIL, 4-1BBL, CD30L, CD40L, CD70, CD95L, OX40L, LTa, LTb, NGF και TRAIL.

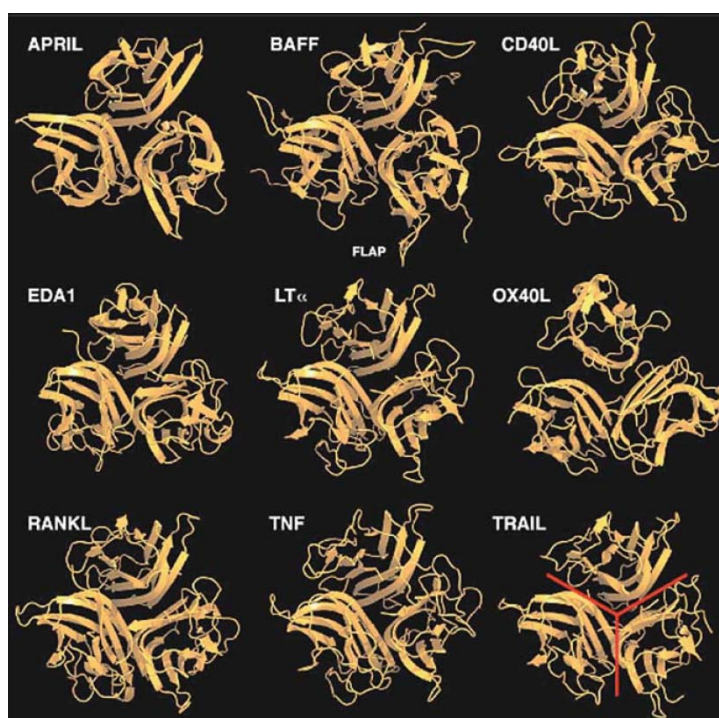


TNF Superfamily Member	Original Name	Other Name	Chromosome	Protein ID
TNFSF1	Lymphotoxin α	TNF β	6p21.3	NP_000586
TNFSF2	TNF α	Cachectin	6p21.3	NP_000585
TNFSF3	Lymphotoxin β	TNFC	6p21.3	NP_002332
TNFSF3L	TAG7	PGRP, P23	19	NP_005082
TNFSF4	OX40L	GP34, CD134L	1q25	NP_003317
TNFSF5	CD40L	CD154, TRAP	Xq26	NP_000065
TNFSF6	FasL	CD95L, CD178	1q23	NP_000630
TNFSF7	CD27L	CD70	19p13	NP_001243
TNFSF8	CD30L	CD153	9q33	NP_001233
TNFSF9	4-1BB-L		19p13.3	NP_003802
TNFSF10	APO2-L	TRAIL	3q26	NP_003810
TNFSF11	RANK1	Osteoprotegerin ligand TRANCE	13q14	NP_003692
TNFSF12	TWEAK		17p13.3	NP_003800
TNFSF13	APRIL	TALL2	17p13.1	NP_003808
TNFSF13B	BAFF	TALL1, THANK	13q32-34	NP_006564
TNFSF14	LIGHT	HVEM1	19p13.3	NP_003798
TNFSF15	TL1	VEGI	9q33	NP_005109
TNFSF18	AITRL	GITRL	1q23	NP_005083

Εικόνα 1.1: Ομαδοποίηση των μελών της TNF υπερικογένειας βάση της ομοιότητά τους, ονοματολογία και γενετικές πληροφορίες Πάνω φαίνονται οι σχέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών της υπερικογένειας TNF σε μορφή δένδρογράμματος. Κάτω φαίνονται οι πρωτεΐνες της υπερικογένειας, το αρχικό τους όνομα καθώς και άλλες ονομασίες που τους έχουν δοθεί, το χρωμόσωμα στο οποίο βρίσκονται και ο κωδικός των πρωτεϊνών τους στο NCBI (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology).

Στην πλειοψηφία τους, τα μέλη της TNF υπερικογένειας συντίθενται ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου II, δηλαδή το αμινοτελικό άκρο τους βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Gruss et al., 1995). Επίσης, περιέχουν μία μικρή κυτταροπλασματική περιοχή και ένα σχετικά μεγάλο εξωκυτταρικό τμήμα που μπορεί να διασπαστεί με τη δράση ειδικών πρωτεασών για την απελευθέρωση της εκκριτικής μορφής της πρωτεΐνης. Γενικά, και οι εκκριτικές και οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι ενεργές ως ομοτριμερή, παρότι ορισμένα μέλη μπορούν επίσης να υπάρχουν ως ετεροτριμερή.

Τα μέλη της TNF υπερικογένειας μοιράζονται μία ομόλογη περιοχή (Tumor Necrosis Factor Homology Domain – THD) 150 αμινοξέων στην εξωκυτταρική περιοχή που αποτελείται από μία σειρά συντηρημένων αρωματικών και υδροφοβικών καταλοίπων. Η THD περιοχή όλων των πρωτεϊνών αποκτά την ίδια τεταρτοταγή δομή και είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό των τριμερών. Η THD περιοχή έχει δομή β-σάντουιτς αποτελούμενη από δύο παράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, που η κάθε μία από αυτές περιέχει πέντε αντι-παράλληλες β-έλικες, οι οποίες παίρνουν την διαμόρφωση jelly-roll. Στην εσωτερική πλευρά των επιφανειών βρίσκονται τα συντηρημένα αμινοξέα που ευθύνονται για τον σχηματισμό των τριμερών, ενώ στην εξωτερική πλευρά των επιφανειών ανάμεσα στα γειτονικά μονομερή γίνεται η πρόσδεση των υποδοχέων (Bodmer et al., 2002) (Εικόνα 1.2).

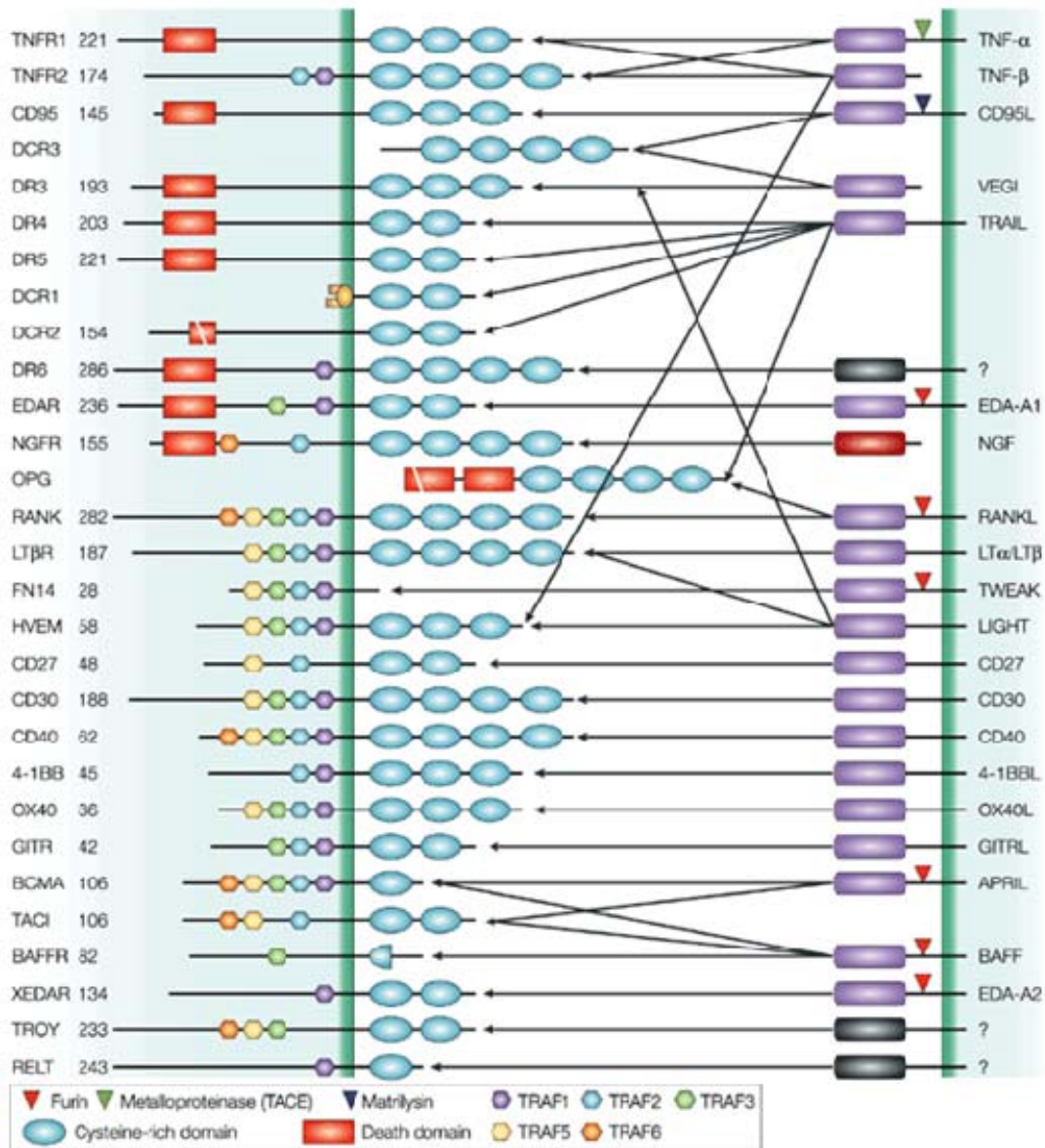


Εικόνα 1.2: Δομική ομολογία και τριμερισμός στην TNF υπερικογένεια. Άποψη των πρωτεϊνών από επάνω. Η αναπαράσταση γίνεται με μορφή κορδέλας και οι δομές απεικονίζονται σε άξονα συμμετρίας όπως φαίνεται στην πρωτεΐνη TRAIL (Cancro, 2010).

1.1.3. Η Υπερικογένεια των TNF υποδοχέων (TNFR)

Περίπου 30 υποδοχείς για τις πρωτεΐνες της TNF υπερικογένειας έχουν αναγνωρισθεί στον άνθρωπο και το ποντίκι, αποτελώντας την **υπερικογένεια των TNF υποδοχέων** (TNF receptor superfamily). Αυτοί οι υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I και χαρακτηρίζονται από την παρουσία χαρακτηριστικών περιοχών πλούσιων σε κυστεΐνες στο εξωκυτταρικό τμήμα τους (Aggarwal, 2003). Κάθε μέλος της TNF υπερικογένειας δένεται σε έναν ή περισσότερους εξειδικευμένους υποδοχείς με μεγάλη συγγένεια (Εικόνα 1.3). Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη TRAIL είναι γνωστό ότι δεσμεύεται σε πέντε υποδοχείς (DR4, DR5, DcR1, DcR2 και OPG). Οι υποδοχείς της TNF οικογένειας μεταφέρουν σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω ειδικών ακολουθιών στην κυτταροπλασματική περιοχή τους. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων επιτυγχάνεται με

την πρόσδεση τριμερών προσδέτη που επάγουν τον ολιγομερισμό των υποδοχέων, επιφέροντας δομικές αλλαγές στην κυτταροπλασματική περιοχή που σηματοδοτούν την έναρξη του κυτταρικού μηνύματος.



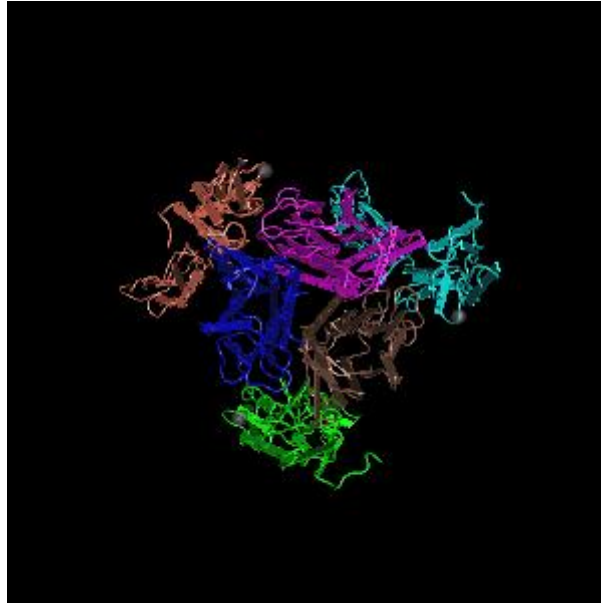
Nature Reviews | Immunology

Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση των μελών της TNF υπερικογένειας και των υποδοχέων τους. Αριστερά βρίσκονται οι υποδοχείς και δεξιά οι προσδέτες (Aggarwal, 2003).

Βασιζόμενοι σε αυτές τις κυτταροπλασματικές ακολουθίες οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να καταταχθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει υποδοχείς οι οποίοι περιέχουν μια χαρακτηριστική δομή θανάτου (death domain-DD) στην κυτταροπλασματική περιοχή τους. Σε αυτούς τους υποδοχείς περιλαμβάνονται οι CD95, TNFR1, DR3, DR4, DR5 και DR6. Δέσμευση των αντίστοιχων πρωτεϊνών της TNF υπεροικογένειας στους υποδοχείς αυτούς οδηγεί σε ενεργοποίηση ειδικών πρωτεασών, των κασπασών, που είναι υπεύθυνες για την απόπτωση του κυττάρου.

Οι υποδοχείς της δεύτερης κατηγορίας περιέχουν μία ή περισσότερες δομές αλληλεπίδρασης με παράγοντες που σχετίζονται με την TNFR υπεροικογένεια. (TRAF interacting motifs) στις κυτταροπλασματικές ουρές τους. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι υποδοχείς BAFFR, TACI, TNFR2, RANKL CD40, CD30, CD27, LT-βR, OX40, 4-1BB, και BCMA. Σύνδεση των αντίστοιχων πρωτεϊνών στους υποδοχείς αυτούς έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των TRAF πρωτεϊνών, που ενεργοποιούν διάφορα κυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος.

Οι υποδοχείς της τρίτης κατηγορίας της υπεροικογένειας των TNF υποδοχέων είτε δεν περιέχουν κάποιο λειτουργικό κομμάτι στο κυτταροπλασματικό τμήμα τους (DcR1, DcR2) είτε δεν είναι διαμεμβρανικοί αλλά διαλυτοί (OPG, DcR3) και δρουν άμεσα ανταγωνιζόμενοι τη δέσμευση των προσδετών στους υποδοχείς των δύο παραπάνω κατηγοριών εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μεταγωγή του σήματος. Η πρόσδεση των υποδοχέων στα τριμερή των μελών της TNF υπεροικογένειας γίνεται στις αύλακες μεταξύ των μονομερών σε περιοχές που δεν είναι συντηρημένες μεταξύ των μελών της TNF οικογένειας, εξασφαλίζοντας ειδικότητα μεταξύ υποδοχέα και προσδέτη (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου TNF-TNFR2 (Mukai, 2010).

1.1.4. Ο ρόλος των πρωτεϊνών της TNF υπεροικογένειας στα αυτοάνοσα νοσήματα

Τα μέλη της TNF υπεροικογένειας δρουν κυρίως στο ανοσοποιητικό σύστημα. Στις μέρες μας είναι ξεκάθαρο πως το ανοσοποιητικό σύστημα ρυθμίζεται όχι μόνο από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση αλλά και από την κυτταρική απόπτωση η οποία ελέγχεται από πρωτεΐνες της υπεροικογένειας TNF. Επιπλέον μέλη της υπεροικογένειας αυτής συμμετέχουν στην απόκτηση έμφυτης και επίκτητης ανοσίας όπως άμυνα εναντίον παθογόνων, αλλά και στην κανονική ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις και στην παθογένεση αυτοάνοσων νοσημάτων. Οι πρωτεΐνες TNF, LT α , LT β και RANKL παρουσιάζουν ζωτικής σημασίας δράση στην ανάπτυξη δευτερογενών λεμφικών οργάνων. Οι πρωτεΐνες TNF, CD95L και TRAIL συνεισφέρουν στην αναγνώριση και εξάλειψη των κυττάρων που έχουν μολυνθεί. Βασιζόμενοι στον προφανή ρόλο της TNF υπεροικογένειας σε πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών ιδιαίτερα συνδεδεμένων με το ανοσοποιητικό σύστημα δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός πως όλα τα μέλη της μελετούνται για πιθανούς θεραπευτικούς σκοπούς (Grewal, 2009).

1.2 ΠΡΟΣΔΕΤΗΣ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ-κΒ (RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR-κΒ LIGAND – RANKL)

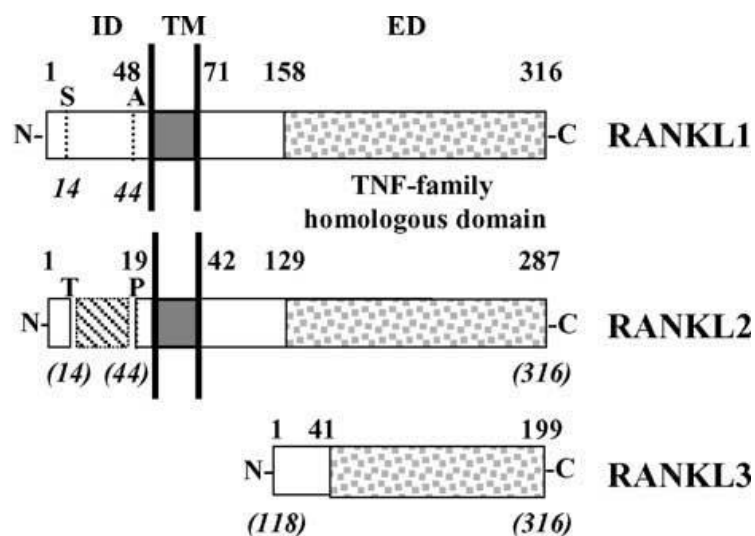
Ο προσδέτης του ενεργοποιητή του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα-κΒ, RANKL, ανήκει στην TNF υπεροικογένεια και ελέγχει την αναδόμηση των οστών ρυθμίζοντας την διαφοροποίηση, ωρίμανση και επιβίωση οστεοκλαστών, των κυττάρων που ευθύνονται για την οστική αποδόμηση (Wong et al., 1997). Η πρωτεΐνη RANKL εκφράζεται από τα δενδριτικά κύτταρα, τα CD4+ T κύτταρα, ινοβλάστες (Anderson et al., 1997), κύτταρα στρώματος του μυελού των οστών, κύτταρα του ενδοθήλιου και του επιθηλίου, οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα (Yasuda et al., 1998). Ανάλυση της έκφρασης της πρωτεΐνης σε διάφορους ιστούς έδειξε πως εκφράζεται κυρίως στα σπογγώδη οστά, τους λεμφαδένες, τον θύμο τους πνεύμονες και τους γαλακτικούς αδένες κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης, ενώ σε μικρότερο βαθμό στην σπλήνα και τον μυελό των οστών (Lacey et al., 1998).

Μελέτες σε knockout ποντίκια αποδεικνύουν πως γενετικές ανωμαλίες της πρωτεΐνης RANKL και του υποδοχέα της οδηγούν σε οστεοπέτρωση λόγω πλήρους έλλειψης ώριμων οστεοκλαστών (Kong et al., 1998, Dougall et al., 1999). Αντίθετα, έλλειψη του αναστολέα OPG σε knockout ποντίκια προκαλεί αύξηση των επιπέδων του δραστικού RANKL προκαλώντας την ανάπτυξη πληθώρας οστεοκλαστών και φαινότυπο που μοιάζει με την οστεοπόρωση (Bucay et al., 1998).

Πέρα από την αναδόμηση των οστών, η πρωτεΐνη RANKL φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς συμμετέχει στην ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων (Anderson et al., 1997). Επίσης, τελευταίες έρευνες υποδεικνύουν συμμετοχή της πρωτεΐνης RANKL στην μετάσταση του καρκίνου καθώς και στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού και του προστάτη (Clohisy et al., 1996, Jones et al., 2006, Armstrong et al., 2008). Τέλος, έχει αποδειχθεί αύξηση της πρωτεΐνης RANKL κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η οποία συνδυάζεται με την ανάπτυξη των γαλακτοφόρων αδένων (Fata et al., 2000).

1.2.1. Η δομή της πρωτεΐνης RANKL

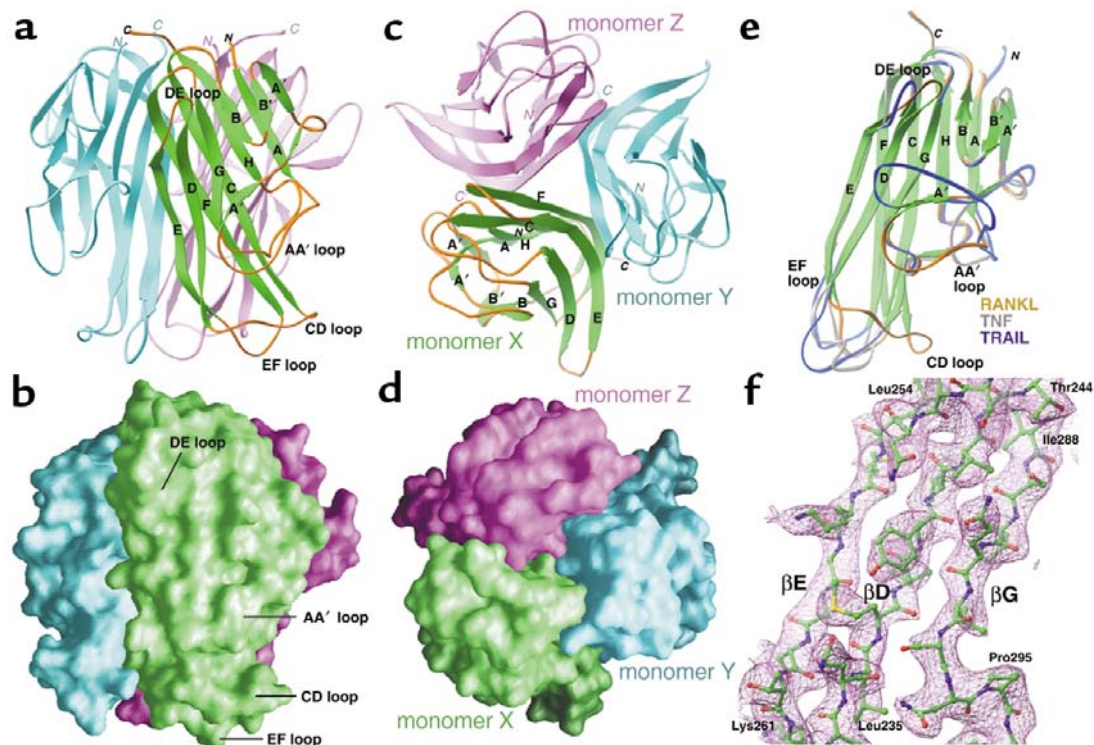
Η πρωτεΐνη RANKL του ανθρώπου εκφράζεται ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II, όπου το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και το καρβοξυτελικό στην εξωκυττάρια περιοχή, στην οποία και έχουν αναγνωρισθεί 3 ισομορφές (Εικόνα 1.8). Η RANKL1 είναι η διαμεμβρανική μορφή της πρωτεΐνης, μήκους 317 αμινοξέων. Η RANKL2 είναι επίσης διαμεμβρανική μορφή της πρωτεΐνης, από την οποία όμως, λείπει ένα μικρό ενδοκυττάριο τμήμα, μήκους 244 αμινοξέων. Τέλος, υπάρχει η RANKL3, η οποία είναι η εκκριτική μορφή της πρωτεΐνης, μήκους 172 αμινοξέων. Η πρωτεΐνη RANKL ελευθερώνεται από την μεμβράνη ύστερα από πρωτεολυτική πέψη ή εναλλακτικό μάτισμα (Ikeda et al., 2001). Αρκετές πρωτεάσες έχουν προταθεί πως πραγματοποιούν την συγκεκριμένη πέψη όπως το ένζυμο tumor necrosis factor converting enzyme (TACE), η μεμβρανική μεταλλοπρωτεάση MT1-MMP και πρόσφατα η disintegrin και μεταλλοπρωτεάση 19 (ADAM19) (Chesneau et al., 2003). Παρόλο που όλες οι ισομορφές είναι βιολογικά ενεργές, ο ρόλος της καθεμίας στην παθοφυσιολογία παραμένει ασαφής.



Εικόνα 1.8: Οι 3 ισομορφές της πρωτεΐνης RANKL που συναντώνται στον άνθρωπο. Οι RANKL1 και RANKL2 είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, ενώ η RANKL3 αποτελεί την εκκριτική μορφή της πρωτεΐνης.

Κάθε μόριο RANKL που παράγεται αλληλεπιδρά αυθόρμητα με άλλα δύο σχηματίζοντας τριμερή τα οποία είναι απαραίτητα για την δραστικότητα του RANKL. Καθένα από τα μονομερή της πρωτεΐνης RANKL, αποτελείται από μία δομή β-σάντουιτς η οποία περιέχει δύο επίπεδες, αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες. Το πρώτο φύλο σχηματίζεται από τους β-επιφάνειες A', A, H, C, και F, ενώ το δεύτερο από τους B', B, G, D, and E. Εσωτερική είναι η β-επιφάνεια A''AHCF, ενώ η B'BGDE συνεισφέρει κυρίως στην εξωτερική επιφάνεια (Lam et al., 2001).

Το τμήμα της πρωτεΐνης που βρίσκεται έξω από το κύτταρο, αποκτά την χαρακτηριστική διαμόρφωση τριμερούς των μελών της TNF υπεροικογένειας. Το σύμπλοκο του τριμερούς μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία πυραμίδα (Εικόνα 1.9). Το τριμερές σχηματίζεται ώστε στην άκρη του β-σάντουιτς κάθε μονομερούς, τα μέλη E και F διπλώνουν προς την εσωτερική υδρόφοβη πλευρά AHCF της β-πτυχωτής επιφάνειας του απέναντι μονομερούς. Προς το παρόν, έχουν ανιχνευθεί μόνο ομοτριμερή, καθώς δεν έχει παρατηρηθεί τριμερισμός της πρωτεΐνης RANKL με κάποιο άλλο μέλος της υπεροικογένειας TNF (Lam et al., 2001).



Εικόνα 1.9: Μοριακή απεικόνιση της πρωτεΐνης RANKL. Αναπαριστάται το τριμερές της πρωτεΐνης RANKL με κορδέλες (a, c) και επιφάνειες (b, d) είτε από το πλάι (b, d) είτε από πάνω (a, c). (e) Σύγκριση των δομών της πρωτεΐνης RANKL με τις TNF και TRAIL που

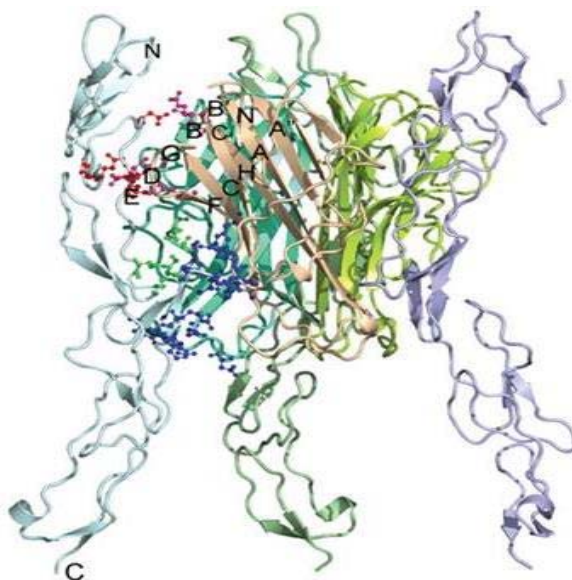
ανήκουν στην ίδια υπεροικογένεια με χρήση κορδέλων. (f) Απεικόνιση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας των E,D και G β-πτυχωτών επιφανειών (Lam et al., 2001)

1.2.2 Η πρωτεΐνη RANKL και οι υποδοχείς της RANK και OPG

Την χρονική περίοδο 1997-1998 αναγνωρίστηκε από δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες ένα καινούργιο μόριο της TNFR υπεροικογένειας, το οποίο όταν υπερεκφραζόταν σε μοντέλα ποντικών προκαλούσε οστεοπέτρωση στα ζώα. Το μόριο ονομάστηκε οστεοπροτεγερίνη (osteoprotegerin, OPG) (Simonet et al., 1997) ή παράγοντας αναστολής οστεοκλαστογένεσης (osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF) (Yasuda et al., 1998). Αμέσως μετά την ανακάλυψη του OPG, η ομάδα της εταιρείας Amgen και οι Yasuda et al. στην Ιαπωνία, χρησιμοποίησαν τον υποδοχέα ως ανιχνευτή και αναγνώρισαν τον προσδέτη του ο οποίος αρχικά ονομάστηκε προσδέτης του OPG (OPG ligand – OPGL) (Lacey et al., 1998) και παράγοντας διαφοροποίησης οστεοκλαστών (osteoclast differentiation factor, ODF) αντίστοιχα (Yasuda et al., 1998). Οι πρωτεΐνες αυτές αποδείχθηκε τελικά πως ήταν ίδιες με τις πρωτεΐνες TNF-related activation induced cytokine – TRANCE (Wong et al., 1997) και receptor activator of NF-κB ligand – RANKL (Anderson et al., 1997) που είχαν αναγνωρισθεί παλαιότερα. Καθώς οι Anderson et al. είχαν ήδη ανακαλύψει το μόριο RANK από το 1997, δεν άργησε να γίνει η σύνδεση και να αναγνωρισθεί ως ο υποδοχέας της πρωτεΐνης RANKL.

Ο υποδοχέας RANK είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I που στον άνθρωπο συντίθεται από 616 αμινοξικά κατάλοιπα (Anderson et al., 1997). Η πρωτεΐνη RANK αποτελεί το φυσικό υποδοχέα του RANKL και εκφράζεται από κύτταρα της σειράς των μονοκυττάρων/μακροφάγων, συμπεριλαμβανομένων των πρόδρομων οστεοκλαστών, από B- και T-κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και ινοβλάστες. Η εξωκυτταρική περιοχή της πρωτεΐνης (αμινοξέα 30-194) διαμορφώνεται από τέσσερις συνεχόμενες περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες (cysteine-rich domains – CRDs), που είναι χαρακτηριστικές της οικογένειας των TNF υποδοχέων (Marsters et al., 1992). Όπως παρατηρείται και σε άλλα μέλη της οικογένειας αυτής, ο υποδοχέας RANK δεν διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα, επομένως, μεταφέρει τα σήματα στο εσωτερικό του κυττάρου, χρησιμοποιώντας άλλες πρωτεΐνες-παράγοντες που σχετίζονται με την TNFR υπεροικογένεια (TRAF proteins).

Η πρωτεΐνη RANKL σχηματίζει ένα ετερο-εξαμερές σύμπλοκο με τον υποδοχέα RANK. Συγκεκριμένα, ένα μόριο υποδοχέα δεσμεύεται στη σχισμή που δημιουργείται ανάμεσα στα γειτονικά μονομερή του τριμερούς του προσδέτη (Εικόνα 1.10). Η πλειοψηφία των αμινοξέων που παίρνουν μέρος στην πρόσδεση του υποδοχέα, είναι υδρόφιλα. Στην σύνδεση του υποδοχέα στο τριμερές, όπως αναμένεται από τη λύση των δομών του TNF-b-TNFRSF1A και TRAIL-DR5, υπεύθυνοι είναι κυρίως οι επιφανειακοί βρόγχοι και συγκεκριμένα στο σύμπλοκο RANKL-RANK έχουν αναγνωριστεί τρεις περιοχές (ο βρόγχος AA'' που αλληλεπιδρά με τον βρόγχο β2β3, η περιοχή της Ιστιδίνης 224 του προσδέτη και η περιοχή της Λευκίνης 89 του υποδοχέα) οι οποίες διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα ζεύγη υποδοχέα-προσδέτη, υποδηλώνοντας την κρισιμότητά τους για εξειδίκευση της σύνδεσης (Liu et al., 2010).

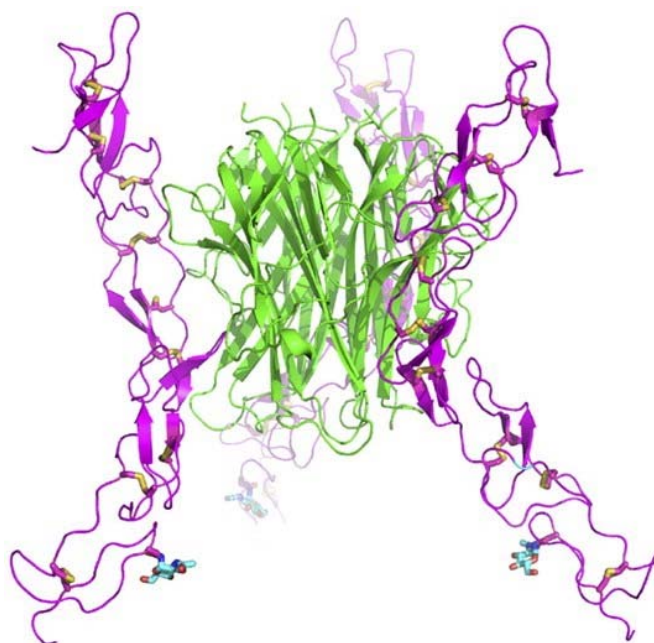


Εικόνα 1.10: Απεικόνιση του συμπλόκου RANKL-RANK με την μορφή κορδέλας. Τρία μόρια υποδοχέα RANK (σιέλ, μωβ, πράσινη λεπτή κορδέλα) προσδένονται σε ένα τριμερές πρωτεΐνης RANKL (καφέ, λεμονή, κυανή παχιά κορδέλα). Οι κόκκινες, μπλε και πράσινες τελείες υποδεικνύουν τα κρίσιμα αμινοξέα για την σύνδεση του υποδοχέα στο μονομερές (Ta et al., 2010).

Ο υποδοχέας OPG είναι ένα άτυπο μέλος της TNFR οικογένειας, καθώς δεν διαθέτει διαμεμβρανική περιοχή και εκφράζεται μόνο ως διαλυτή πρωτεΐνη. Ο OPG παράγεται από κύτταρα του υποστρώματος του μυελού των οστών, οστεοβλάστες, δενδριτικά, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, μονοκύτταρα, B- και T-λεμφοκύτταρα και μεγακαρυοκύτταρα. Περιέχει τέσσερις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες στο αμινο-

τελικό άκρο, ενώ στο καρβοξυ-τελικό περιέχει δύο περιοχές με δομή θανάτου, μία περιοχή πρόσδεσης της ηπαρίνης και ένα αμινοξικό κατάλοιπο κυστεΐνης η οποία είναι απαραίτητη για την δημιουργία των διμερών του OPG.

Η ανάλυση της δομής του συμπλόκου RANKL-OPG, υποδεικνύει πως οι τέσσερις περιοχές του αμινοτελικού άκρου είναι υπεύθυνες για την σύνδεση του υποδοχέα στον RANKL. Ο υποδοχέας OPG μπορεί να συνδέεται στην πρωτεΐνη RANKL είτε ως μονομερές, είτε με την μορφή διμερούς, η οποία ανταγωνίζεται τον υποδοχέα RANK πιο αποτελεσματικά (Εικόνα 1.11). Η ερευνητική ομάδα που ανέλυσε τη δομή, προτείνει πως το διμερές του OPG σχηματίζει μία δομή που μοιάζει με «Υ», με τα καρβοξυτελικά άκρα των μονομερών, ενωμένα και τα αμινοτελικά τους άκρα ελεύθερα. Ο υποδοχέας προσδένεται στο τριμερές της πρωτεΐνης, καταλαμβάνοντας τις δύο από τις τρεις σχισμές που σχηματίζει κάθε μονομερές με το γειτονικό του. Για την αναστολή της πρόσδεσης του υποδοχέα RANK στον RANKL, είναι απαραίτητο ο υποδοχέας OPG να βρίσκεται με τη μορφή διμερούς (Schneeweis et al., 2005).



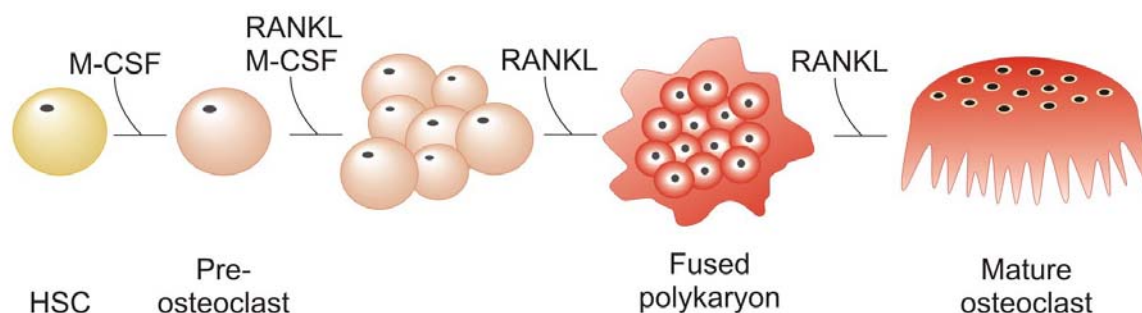
Εικόνα 1.11: Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου OPG-RANKL με μορφή κορδέλων. Το τριμερές της πρωτεΐνης RANKL (πράσινο) συνδεδεμένο με τρία διμερή του υποδοχέα OPG. Στην εικόνα παρατηρείται και η χαρακτηριστική δομή «Υ» που διαμορφώνουν τα διμερή του OPG για να συνδεθούν στο τριμερές (Luan et al., 2012).

1.2.3 Η επίδραση της πρωτεΐνης RANKL στην οστεοκλαστογένεση

Οι οστεοκλάστες είναι μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα (10-20 πυρήνες) τα οποία προέρχονται από κύτταρα της μυελικής σειράς (Suda et al., 1992). Πρόκειται για υψηλής εξειδίκευσης κύτταρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την οστική απορρόφηση. Συνήθως βρίσκονται σε επαφή με οστεοποιημένα τμήματα των οστών και μέσα σε λακκίσκους (Howship's lacunae) ως αποτέλεσμα της απορροφητικής τους δράσης. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των οστεοκλαστών είναι η «πτυχωτή επιφάνεια» που φέρουν στην κυτταρική μεμβράνη τους στο σημείο που βρίσκεται σε στενή επαφή με την προς απορρόφηση οστική επιφάνεια (Tilman et al., 2001). Στην πτυχωτή επιφάνεια βρίσκονται κενοτοπιώδους τύπου H^+ ATPases που απελευθερώνουν πρωτόνια και είναι υπεύθυνες για την πτώση του pH στη περιοχή, η οποία συμβάλει στη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη και ενισχύει την δράση των πρωτεασών (Vaananen et al., 2000). Εκτός αυτού στην περιοχή αυτή απαντώνται διάλυτοι χλωρίου, αντλίες πρωτονίων, καρβονική ανυδράση και πρωτεολυτικά ένζυμα. Πλέον γνωρίζουμε πως η διαλυτοποίηση του ανόργανου μέρους τους οστού γίνεται από HCl το οποίο διοχετεύεται από τη πτυχωτή επιφάνεια των οστεοκλαστών στον λακκίσκο (Blair et al., 1989). Στο εσωτερικό των κυττάρων περιέχονται συμπλέγματα Golgi, μιτοχόνδρια και κυστίδια που μεταφέρουν λυσοσωματικά ένζυμα τα οποία συντίθενται από τους οστεοκλάστες σε μεγάλη ποσότητα για την αποδόμηση του οργανικού μέρους του οστού (Väänänen et al., 2000). Το 90% της οργανικής μάζας των οστών αποτελείται από τύπου I κολλαγόνο που έχει την δομή τριπλής έλικας. Τα άκρα της έλικας, που ονομάζονται τελοπεπτίδια, ενώνονται μεταξύ τους και αποτελούν το δυσκολότερο κομμάτι για την διάσπαση του κολλαγόνου. Η καθεψίνη K είναι η μοναδική πρωτεάση ικανή να αποδομεί την τριπλή έλικα και τα τελοπεπτίδια, δημιουργώντας κομμάτια μεγέθους 70-80kDa (Inaoka et al., 1995). Η τριπλή έλικα και τα μονομερή που δημιουργούνται αποδομούνται περαιτέρω με τη δράση πληθώρας πρωτεασών (πρωτεάσες κυστεΐνης και μεταλλοπρωτεάσες) που παράγονται από τους οστεοκλάστες.

Το μονοπάτι διαφοροποίησής τους είναι κοινό με αυτό των μακροφάγων και των δενδριτικών κυττάρων με τα οποία μοιράζονται κοινά λειτουργικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως την υψηλή έκφραση λυσοσωματικών ενζύμων και την ικανότητα φαγοκυττάρωσης (Sakiyama et al., 2001). Η διαφοροποίηση των οστεοκλαστών από τα αδιαφοροποίητα αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών

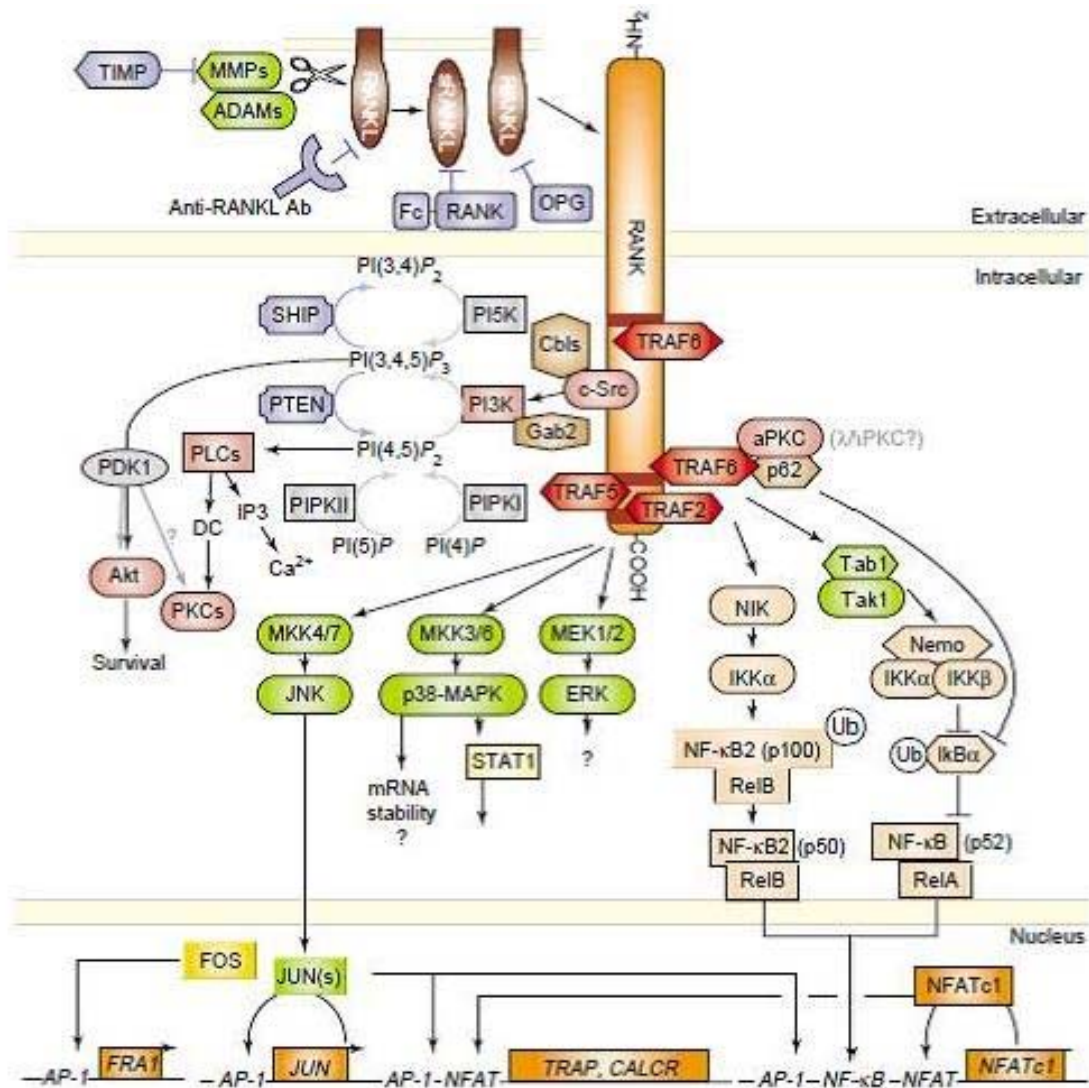
απαιτεί την απελευθέρωση ορμονικών παραγόντων και κυτταροκινών από τους οστεοβλάστες ή κύτταρα του στρώματος του οστού (Εικόνα 1.12). Μεταξύ των παραγόντων αυτών, απαραίτητες είναι οι κυτταροκίνες M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) και RANKL (Teitelbaum et al., 2000). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες, είναι απαραίτητες για να προάγουν την έκφραση γονιδίων που χαρακτηρίζουν τους ώριμους οστεοκλάστες (Teitelbaum et al., 2003).



Εικόνα 1.12: Διαγραμματική απεικόνιση της πορείας διαφοροποίησης των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων σε ώριμους οστεοκλάστες. Η κυτταροκίνη M-CSF προκαλεί διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε πρόδρομους οστεοκλάστες. Στη συνέχεια, με την συνεργασία της RANKL τα πρόδρομα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και με σήματα που μεταδίδονται από την πρωτεΐνη RANKL συντήκονται σχηματίζοντας πολυπύρρηνα κύτταρα τα οποία ύστερα από ένα τελικό στάδιο διαφοροποίησης λειτουργούν ως ώριμοι οστεοκλάστες, που προκαλούν οστική απορρόφηση (Biomedical Tissue Research, <http://www.york.ac.uk/res/btr/imagelibrary.html>).

Γνωρίζοντας πως η δέσμευση της πρωτεΐνης RANKL στον υποδοχέα RANK είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό οστεοκλαστών, έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια ώστε να αναγνωρισθούν τα μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται (Εικόνα 1.13). Το αρχικό βήμα της σηματοδότησης είναι η δέσμευση πρωτεϊνών της οικογένειας TRAF (TNF receptor associated factor) στην κυτταροπλασματική περιοχή του RANK. Οι πρωτεΐνες TRAF2, TRAF5 και TRAF6 έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται στην RANK πρωτεΐνη, όμως μόνο η TRAF6 φαίνεται να μετέχει στη διαδικασία της οστοκλαστογένεσης, καθώς μόνο τα TRAF6 knockout ποντίκια εμφανίζουν οστεοπέτρωση. Τουλάχιστον επτά μονοπάτια σηματοδότησης

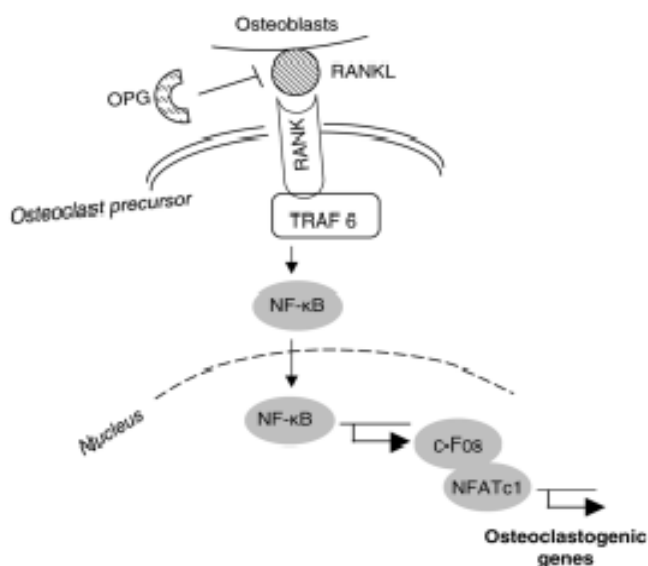
ενεργοποιούνται από την πρωτεΐνη RANKL, τα τέσσερα ενεργοποιούν άμεσα την δημιουργία οστεοκλαστών (NF-κB, c-Jun αμινοτελική κινάση, c-Myc και NFATc1) και τα άλλα τρία την ενεργοποίηση και επιβίωση αυτών (src κινάση, MAPKs κινάσες και κινάσες που σχετίζονται με εξωκυτταρική σηματοδότηση).



Εικόνα 1.13: Γραφική απεικόνιση των μονοπατιών σηματοδότησης που εμπλέκεται η πρωτεΐνη RANKL (Wada et al., 2006).

Εκτός από τις πρωτεΐνες TRAF οι οποίες έχουν μελετηθεί διεξοδικά για την δράση τους στην οστεοκλαστογένεση, πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν πως ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στη διαδικασία σχηματισμού οστεοκλαστών είναι ο NFATc1 (Nucleas factor of activated T-cells, cytoplasmic 1), (Εικόνα 1.14). Ο ιδιαίτερος ρόλος του NFATc1 στην μεταγωγή του σήματος για την δημιουργία των οστεοκλαστών, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε ποντίκια στα

οποία είχαν διαγραφεί γενετικά οι υπομονάδες p50 και p52 της πρωτεΐνης NF-κB και το ογκογονίδιο c-Fos (Karsenty et al., 2002). Προσπάθειες για διάσωση του φαινοτύπου απέδειξαν πως εξωγενής χορήγηση NFATc1 αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων στα ζώα αυτά, οδήγησε στην δημιουργία οστεοκλαστών. (Takayanagi et al., 2002). Επιπλέον, υπερέκφραση της πρωτεΐνης στα συγκεκριμένα ζώα από μία συνεχώς ενεργή μορφή της NFATc1 επάγει την δημιουργία οστεοκλαστών από την πρωτεΐνη M-CSF, ακόμα και απουσία της πρωτεΐνης RANKL (Yao et al., 2005), υποδηλώνοντας πως βρίσκεται παρακάτω από τις πρωτεΐνες NF-κB και το ογκογονίδιο c-Fos στο μονοπάτι σηματοδότησης. Η πρωτεΐνη NFATc1 ενεργοποιείται από την αποφωσφορυλίωση της ασβεστιο-εξαρτώμενης πρωτεΐνης καλσινευρίνη. Η κυκλοσπορίνη A, ένας αναστολέας της καλσινευρίνης, εμποδίζει την ενεργοποίηση της NFATc1 χρησιμοποιήθηκε ως ανοσοκατασταλτικό σε ασθενείς όμως παρατηρήθηκε απώλεια οστικής μάζας (Thiebaud et al., 1996). Μία πιθανή εξήγηση για το αποτέλεσμα αυτό είναι η NFATc1 να ρυθμίζει θετικά την έκφραση της οστερίξης (osterix), μίας πρωτεΐνης που ρυθμίζει την λειτουργία των οστεοβλαστών (Nakashima et al., 2002), και το συνδυασμένο αποτέλεσμα των δύο λειτουργιών είναι μειωμένος σχηματισμός οστού και οστεοπόρωση (Koga et al., 2005).



Εικόνα 1.14: Το RANKL-επαγόμενο μονοπάτι μεταγωγής σήματος κατά την οστεοκλαστογένεση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο RANKL που παράγεται από τους οστεοβλάστες δεσμεύεται στην επιφάνεια των πρόδρομων οστεοκλαστών και επάγει την ενεργοποίηση της TRAF6 πρωτεΐνης, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του NF-κB και τη μεταφορά του στον πυρήνα. Ο NF-κB αυξάνει την έκφραση της c-Fos, η οποία αλληλεπιδρά με την NFATc1 προκειμένου να αρχίσει η μεταγραφή των γονιδίων που σχετίζονται με την

οστεοκλαστογένεση. Ο υποδοχέας OPG μπορεί να αναστείλει τη διαδικασία εάν δεσμευτεί στην πρωτεΐνη RANKL. (Boyce et al., 2007)

Άλλοι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την οστεοκλαστογένεση είναι κάποιες πρωτεΐνες προσαρμογείς. Μεταξύ αυτών είναι η Grb-2 (Growth factor receptor-bound protein 2), η οποία φωσφορυλιώνεται στα αμινοξικά κατάλοιπα της τυροσίνης και αλληλεπιδρά με πληθώρα μορίων σηματοδότησης. Απώλεια της πρωτεΐνης σε μοντέλα ποντικών προκάλεσε ήπια οστεοπέτρωση, υποδεικνύοντας πως είναι απαραίτητη για την οστεοκλαστογένεση, αλλά όχι επαρκής (Wada et al., 2005).

1.2.4. Η επίδραση της πρωτεΐνης RANKL στο ανοσοποιητικό σύστημα

Η πρώτη αναφορά της πρωτεΐνης όταν είχε ανακαλυφθεί, ήταν ως παράγοντας επιβίωσης των δενδριτικών κυττάρων (Anderson et al., 1997). Αξιοσημείωτο είναι πως τα δενδριτικά κύτταρα δεν φάνηκαν να επηρεάζονται σε ποντίκια στα οποία δεν εκφράζεται η πρωτεΐνη RANKL. Ωστόσο, τα ποντίκια αυτά παρουσίαζαν άλλες ανοσολογικές δυσλειτουργίες οι οποίες όμως ενδέχεται να οφείλονται στο γενετικό τους υπόβαθρο (Kong et al., 1999). Ο Kong και οι συνάδελφοί του παρατήρησαν μειωμένο μέγεθος θύμου, ελλιπή παραγωγή κυτοκινών και μεγέθυνση της σπλήνας. Όλα τα ζωικά μοντέλα που έχουν δημιουργηθεί εμφανίζουν ολοκληρωτική έλλειψη λεμφαδένων και μικρότερα Peyer's patches (Douni et al., 2012). Αυτά τα αποτελέσματα, ταιριάζουν με τις ποικίλες λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει η πρωτεΐνη στο ανοσοποιητικό σύστημα. Κατά την οργανογένεση των λεμφαδένων, μαζί με την πρωτεΐνη LTαβ, ρυθμίζουν την αποίκιση των πρόδρομων κυττάρων (Kim et al., 2000). Ειδικότερα, στον θύμο είναι απαραίτητη για την έκφραση του παράγοντα AIRE (autoimmune regulator), ο οποίος προάγει την ωρίμανση των επιθηλιακών κυττάρων του μυελού που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη ανοχής έναντι του εαυτού (Hikosaka et al., 2008). Στο δέρμα, ύστερα από διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, επάγει την ανοσοκαταστολή αυξάνοντας τον πληθυσμό των ρυθμιστικών T-κυττάρων (Loser et al., 2006). Στο έντερο, ενεργοποιεί την δημιουργία των αντιγόνο-δειγματοληπτικών (antigen-sampling) M κυττάρων στο εντερικό επιθήλιο και είναι απαραίτητη για την ωρίμανση των CXCL13-εξαρτώμενων κρυπτοδομών (cryptopatches) σε απομονωμένους λεμφικούς αδένες στο μικρό έντερο (Knoop et al., 2011).

1.3 ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΔΟΜΗΣΗ

Τα οστά παρότι θεωρούνται οι σκληρότερες δομές σε έναν οργανισμό, αποτελούν μια δυναμική δομή από οστίτη ιστό, αγγεία, νεύρα και ζωντανά κύτταρα. Το μεγαλύτερο μέρος των οστών (60%-70%) αποτελείται από συνδυασμό ανόργανων και οργανικών συστατικών, ενώ το υπόλοιπο από νερό. Το οργανικό μέρος του οστού συνίσταται κυρίως από κολλαγόνο τύπου I, το οποίο του παρέχει ελαστικότητα, ενώ το ανόργανο μέρος από κρυστάλλους υδροξυαπατίτη ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) με άλατα, κυρίως φωσφορικό ασβέστιο, φωσφορικό μαγνήσιο και ανθρακικά άλατα του ασβεστίου, νατρίου, καλίου. Τα άλατα παρέχουν στα οστά την απαραίτητη ανθεκτικότητα και σκληρότητα (Steele et al., 1988).

Διακρίνονται δύο τύποι οστίτη ιστού, το φλοιώδες και το σπογγώδες. Το φλοιώδες οστόν είναι σκληρό, ικανό να αντέξει το βάρος και τις μηχανικές πιέσεις. Στις άκρες του βρίσκεται το σπογγώδες οστόν το οποίο είναι πορώδες και μπορεί να απορροφά την ενέργεια από τους κραδασμούς. Ανάλογα με την μορφολογία τους τα οστά διακρίνονται σε επιμήκη, βραχέα και πλατιά (Steele et al., 1988).

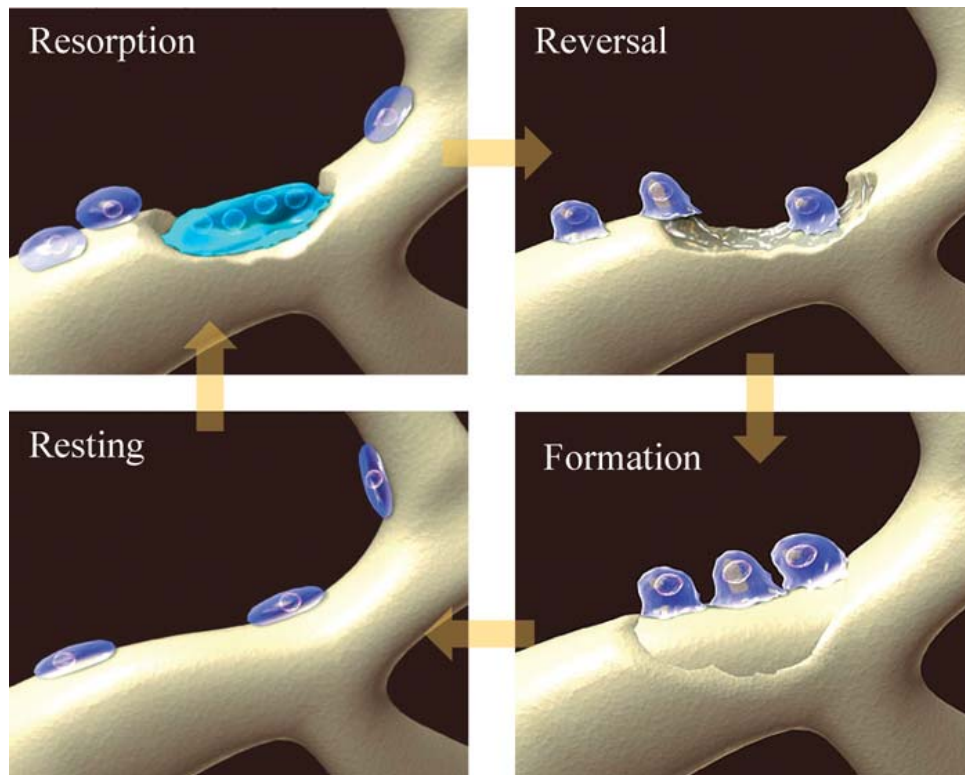
1.3.1 Φυσιολογική οστική αναδόμηση

Κατά τη διάρκεια της ζωής ενός σπονδυλόζωου τα οστά του ανακατασκευάζονται μονίμως από τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες που βρίσκονται σε συνεχή συνεργασία. Σε συγκεκριμένες θέσεις των οστών οι οστεοκλάστες απορροφούν το παλαιό οστό (bone resorption) και στη συνέχεια οι οστεοβλάστες καλύπτουν τα κενά με παραγωγή νέας οστικής θεμέλιας ουσίας (bone formation) και στο τέλος ακολουθεί επιμετάλλωση (bone mineralization). Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή σαν οστική αναδόμηση (bone remodeling) και εξαρτάται μερικώς από τις μηχανικές πιέσεις που επιβάλλονται πάνω στα οστά από τη βαρύτητα και τη τάση που αναπτύσσουν οι τένοντες καθώς και από αρκετές ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες που παράγονται τοπικά από τα οστά (Frost, 1990). Μέσω της διαδικασίας αυτής αντικαθίσταται το παλαιό οστό με νέο, επιδιορθώνονται μικροκατάγματα και μικροφθορές των μονάδων του οστού, ρυθμίζεται η ομοιοστασία του ιονισμένου ασβεστίου του εξωκυττάριου χώρου και προσαρμόζεται ο σκελετός στις μηχανικές πιέσεις που του ασκούνται. Έτσι, μέσω αυτής της λειτουργίας ο σκελετός ενός

ενήλικα ανανεώνεται πλήρως κάθε 10 χρόνια, ενώ ανά πάσα στιγμή ανακατασκευάζεται το 4% της ολικής οστικής επιφάνειας.

Ένας κύκλος αναδόμησης περιλαμβάνει τρεις διαδοχικές φάσεις: την απορρόφηση, την αναστροφή και τον σχηματισμό (Εικόνα 1.15). Η απορρόφηση ξεκινάει με την μετανάστευση των πρόδρομων οστεοκλαστών στην κατάλληλη περιοχή, και την διαφοροποίησή τους σε ώριμους, πολυπύρηνους οστεοκλάστες (Blair, 2004). Μετά την ολοκλήρωση της απορρόφησης, ακολουθεί η φάση αναστροφής, όπου οι οστεοκλάστες πεθαίνουν με απόπτωση και πρόδρομοι οστεοβλάστες μεταναστεύουν στην περιοχή. Κατά το στάδιο του σχηματισμού πραγματοποιείται παραγωγή της οστικής θεμέλιας ουσίας. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν όλο το παλαιό οστόν έχει αντικατασταθεί με καινούργιο. Η διάρκεια της κάθε φάσης είναι διαφορετική, η απορρόφηση μπορεί να διαρκέσει μέχρι 2 βδομάδες, η αναστροφή 4 με 5 βδομάδες, ενώ ο σχηματισμός μπορεί να κρατήσει έως και 4 μήνες (Cowin, 2001).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η οστική αναδόμηση λειτουργεί με την απόλυτη συνεργασία και ισορροπία των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών η οποία είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του απόλυτου ισοζυγίου των οστών. Η πολύτιμη αυτή συνεργασία ονομάζεται φαινόμενο σύζευξης (Hill, 1998). Όταν η απορρόφηση και η σύνθεση οστού βρίσκονται σε ισορροπία, διατηρείται η οστική μάζα αφού η ποσότητα του νέοσχηματιζόμενου οστού είναι ίση με την ποσότητα του απορροφούμενου.



Εικόνα 1.15: Φυσιολογική οστική αναδόμηση. Η διαδικασία ξεκινά με την οστική απορρόφηση από τους οστεοκλάστες. Συνεχίζεται με την φάση της αναστροφής, όπου οι οστεοβλάστες γεμίζουν το κενό που έχει δημιουργηθεί. Στη φάση του σχηματισμού, οι οστεοβλάστες σχηματίζουν το καινούργιο οστό. Τέλος, το οστό έχει αναδομηθεί πλήρως και οι οστεοβλάστες μεταφέρονται σε άλλη περιοχή (Coxon et al., 2004).

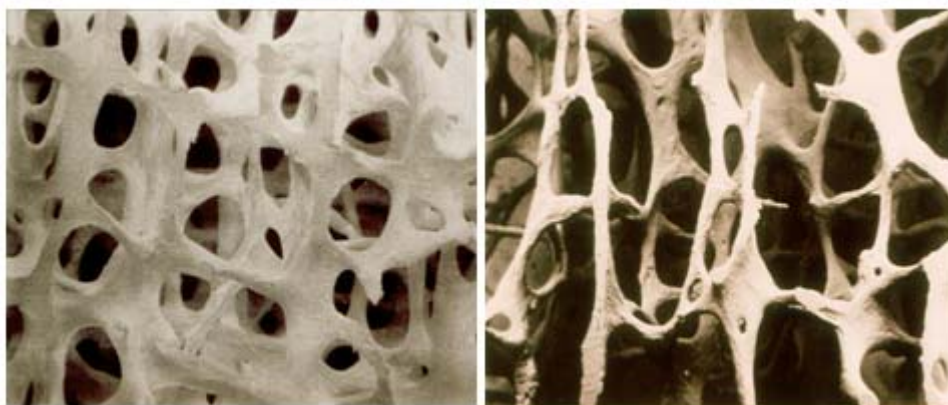
1.3.2. Ασθένειες που συνδέονται με την πρωτεΐνη RANKL

Ο όρος οστεοπέτρωση αναφέρεται σε μία μεγάλη ποικιλία κληρονομικών νοσημάτων των οστών που χαρακτηρίζονται από αδυναμία απορρόφησης του οστίτη ιστού από τους οστεοκλάστες, η οποία οδηγεί σε εξασθένηση της οστικής δόμησης και ανακατασκευής. Λόγω της συμμετοχής των οστεοκλαστών στην εκδήλωση των ασθενειών αυτών, σε μία πρόσφατη έρευνα σε παιδιά που πάσχουν από αυτοσωμική υπολειπόμενη οστεοπέτρωση, μελετήθηκε η λειτουργία της πρωτεΐνης RANKL. Τα αποτελέσματα φανερώνουν την ύπαρξη μίας μεγάλης ποικιλίας μεταλλάξεων στην εξωκυτταρική περιοχή της RANKL πρωτεΐνης, που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας της (Sobacchi et al., 2007). Παρόμοιος τύπος οστεοπέτρωσης εμφανίζεται σε παιδιά με μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον RANK υποδοχέα (Guerrini et al., 2008).

Η οστική νόσος του Paget ή παραμορφωτική οστεΐτιδα, προσβάλλει ένα ή περισσότερα οστά και χαρακτηρίζεται από την ανεξέλεγκτη αύξηση της δραστηριότητας των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών με επακόλουθο την αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής του οστού. Η νόσος μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό επικρατούντα τρόπο κληρονομικότητας. Οι ασθενείς με αυτές τις μεταλλάξεις φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες RANK, OPG και SQSTM1 (μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του RANKL-RANK μονοπατιού) (Whyte, 2006).

1.4 ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

Η οστεοπόρωση συχνά δεν διαγνώσκεται και δεν θεραπεύεται, κυρίως λόγω της έλλειψης συμπτωμάτων. Για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ως «σιωπηλή επιδημία» καθώς από αυτή πάσχει όχι μόνο η πλειοψηφία των γυναικών μετά την εμμηνόπαυση, αλλά και 1 στους 8 άνδρες. Είναι μία ασθένεια που χαρακτηρίζεται από σταδιακή μείωση της πυκνότητας και της ποιότητας των οστών η οποία έχει ως αποτέλεσμα τα οστά να γίνονται πιο λεπτά και εύθραυστα με αύξηση του κινδύνου κατάγματος (Albright et al., 1940) (Εικόνα 1.16). Πρόκειται για μία διαδεδομένη ασθένεια αυξημένης νοσηρότητας και θνησιμότητας (Johnell et al., 2004). Τα πιο συνηθισμένα κατάγματα που προκαλούνται από την οστεοπόρωση είναι στους σπόνδυλους, τα οποία είναι εξαιρετικά επώδυνα και πιθανό να εξελιχθούν σε κατάγματα των γοφών ή της σπονδυλικής στήλης. Άλλα πολύ συνηθισμένα γνωρίσματα της νόσου είναι η απώλεια ύψους, η κύφωση, ο πόνος στην πλάτη και η μείωση της φυσικής και ψυχολογικής λειτουργίας του ασθενούς (Silverman, 1992).



Εικόνα 1.16: Αριστερά παρατηρείται φυσιολογικό οστό και αριστερά οστό από ασθενή με οστεοπόρωση. Η αυξημένη οστική απορρόφηση στην οστεοπόρωση, οδηγεί σε μείωση της πυκνότητας των οστών, αυξάνοντας τον κίνδυνο καταγμάτων (National Rheumatoid Arthritis Society, <http://www.nras.org.uk>).

1.4.1. Παθοφυσιολογία της ασθένειας

Η οστική μάζα συσσωρεύεται στις δύο πρώτες δεκαετίες της ζωής ενός ανθρώπου. Στα υγιή άτομα, η μέγιστη πυκνότητα της οστικής μάζας επηρεάζεται κυρίως από γενετικούς παράγοντες και το βάρος. Ασθένεια ή διατροφική ανεπάρκεια κατά την παιδική ηλικία και μειωμένη παραγωγή στεροειδών κατά την εφηβεία, συχνά εμποδίζουν την απόκτηση της μέγιστης οστικής πυκνότητας και προδιαθέτουν το άτομο να εμφανίσει οστεοπόρωση σε μεγαλύτερη ηλικία (Bonjour et al., 1994).

Στα νεαρά άτομα, η ισορροπία μεταξύ οστικής απορρόφησης και οστικού σχηματισμού λειτουργεί σωστά και η αναδόμηση γίνεται χωρίς κάποια μεταβολή στη φυσιολογία των οστών. Καθώς αυξάνεται η ηλικία του ατόμου, όμως, η έλλειψη οιστρογόνων στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση και ανδρογόνων στους άνδρες οδηγεί στην διαταραχή της ισορροπίας στην οστική αναδόμηση, με αύξηση της απορρόφησης σε σχέση με τον σχηματισμό. Παρατηρείται γρήγορη αποδόμηση των οστών που συνδυάζεται με καταστροφή της αρχιτεκτονικής τους (Turner, 2002). Υπεύθυνοι πίσω από αυτή την διαταραχή φαίνεται να βρίσκεται η αυξημένη δράση των οστεοκλαστών, η οποία οδηγεί σε απώλεια οστικής μάζας και στην εμφάνιση οστεοπόρωσης (Riggs et al., 1982). Πέρα από την ηλικία, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την εκδήλωση της νόσου είναι ορισμένες ασθένειες, ναρκωτικά και μεταβολικές ανωμαλίες (Turner, 2002). Στους ανθρώπους της τρίτης ηλικίας,

εμφανίζεται πολύ συχνά έλλειψη της βιταμίνης D που συνδέεται με μειωμένη απορρόφηση ασβεστίου, η οποία οδηγεί σε απώλεια οστική μάζας και αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων (Parfitt et al., 1982).

1.4.2. Θεραπεία

Ο πρωταρχικός στόχος στην θεραπεία των ασθενών με οστεοπόρωση είναι να μειωθεί ο κίνδυνος νέων καταγμάτων. Η χρήση συμπληρωμάτων ασβεστίου και βιταμίνης D στους ηλικιωμένους μειώνει τον κίνδυνο καταγμάτων (Bischoff-Ferrari et al., 2005). Από την άλλη μεριά, φάρμακα που περιέχουν οιστρογόνα ή άλλους αναβολικούς παράγοντες και έχουν στόχο την ενδυνάμωση των οστών φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενα για την θεραπεία της οστεοπόρωσης σε γυναίκες και άνδρες (Delmas, 2002).

Τα διφωσφονικά είναι μία κατηγορία μη-ορμονικών φαρμάκων που βοηθούν στην αύξηση της πυκνότητας των οστών και χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την θεραπεία της οστεοπόρωσης και άλλων ασθενειών που σχετίζονται με την οστεοκλαστική δραστηριότητα (Watts et al., 1990, Liberman et al., 1995, Reginster et al., 2000). Τα διφωσφονικά άλατα παρουσιάζουν μεγάλη χημική ομοιότητα με τους κρυστάλλους ασβεστίου και έχουν την ικανότητα να συνδέονται με το ανόργανο τμήμα των οστών. Αποτελούνται από δύο φωσφονικές ομάδες ενωμένες με φωσφοαιθερικούς δεσμούς σε κεντρικό άνθρακα (P-C-P δομή) που προσομοιάζουν τη δομή του πυροφωσφορικού οξέως. Οι δύο φωσφονικές ομάδες είναι απαραίτητες για τη σύνδεση των μορίων με το ανόργανο μέρος του οστίτη ιστού και μετατροπή σε μία από τις δύο ομάδες μπορεί να μειώσουν δραματικά την ικανότητα σύνδεσής τους και τη βιοδιαθεσιμότητά τους (Nancollas et al., 2006). Είναι γνωστό ότι τα διφωσφονικά άλατα επιδρούν με τον υδροξυπατίτη, την δομική μονάδα των οστών, εμποδίζοντας την καθίζηση φωσφορικού ασβεστίου, καθυστερούν τον μετασχηματισμό του άμορφου υδροξυπατίτη σε κρυσταλλικό, και εμποδίζουν τη συσσωμάτωση και τη διάλυση των κρυστάλλων ασβεστίου (Russell et al. 2008).

Λόγω της μεγάλης ομοιότητάς τους με το ασβέστιο, τα διφωσφονικά φάρμακα μεταφέρονται με ταχύτητα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και συσσωρεύονται στις επιφάνειες όπου πραγματοποιείτε οστική αναδόμηση (Masarachia et al., 1996). Στη διάρκεια της οστικής απορρόφησης, οι οστεοκλάστες εκκρίνουν H⁺

προκαλώντας πτώση του pH στην περιοχή και σε αυτό το περιβάλλον τα διφωσφονικά απελευθερώνονται από τα οστά (Suda et al., 1997). Με μια διαδικασία, παρόμοια της ενδοκύττωσης, τα διφωσφονικά εισέρχονται στους οστεοκλάστες, όπου αναστέλλουν την δράση τους (Selander et al., 1994, Murakami et al., 1995). Αφού το φάρμακο εισχωρήσει στους οστεοκλάστες, επηρεάζει την λειτουργία τους ποικιλοτρόπως, επιδρώντας τόσο στη στρατολόγηση, την διαφοροποίηση και την απορροφητική ικανότητα των οστεοκλαστών όσο και στη μορφολογία τους, προκαλώντας την απόπτωσή τους *in vitro* (Sato et al., 1990). Πρόσφατες έρευνες, ωστόσο, αναφέρουν πως η μακροχρόνια χρήση των διφωσφονικών μπορεί να προκαλέσει αποδυνάμωση των οστών με σοβαρές παρενέργειες όπως καρκίνο του οισοφάγου και οστεονέκρωση του σαγονιού (Whitaker et al., 2012). Για τον λόγο αυτό γίνεται προσπάθεια αντικατάστασής τους με δραστικά φάρμακα που θα επιτρέπουν την μακροχρόνια χρήση.

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά της οστεοπόρωσης επικεντρώνεται στην παρεμπόδιση της πρωτεΐνης RANKL που ευθύνεται για την υπερβολική δράση των οστεοκλαστών. Ποικίλες έρευνες σε μοντέλα ποντικών, αρουραίων και πιθήκων, υποδεικνύουν πως η χρήση του φυσικού αναστολέα OPG (Omisky et al., 2007) και αντισωμάτων κατά της RANKL (Atkinson et al., 2005), μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης και αυξάνει την οστική πυκνότητα έως και 300% συγκριτικά με τα ζώα χωρίς θεραπεία. Για να αποδειχθεί η θεωρία πως η παρεμπόδιση της πρωτεΐνης RANKL μπορεί να έχει κλινική χρησιμότητα στην θεραπεία της οστεοπόρωσης, χορηγήθηκε ο φυσικός αναστολέας OPG σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. Στις γυναίκες αυτές, δόθηκε μία δόση OPG σε διάφορες συγκεντρώσεις (0, 0.1, 0.3, 1, 3mg/kg) και η αξιολόγηση της θεραπείας έγινε με τον δείκτη NTX που είναι ειδικός για την οστική απορρόφηση και τον BSAP για την οστική αναδόμηση. Μέσα σε 12 ώρες, παρατηρήθηκε μείωση του δείκτη NTX η οποία τις επόμενες 5 μέρες έφτασε στο 70 έως 80%, ενώ η τιμή του δείκτη επέστρεψε στην αρχική μέσα σε λίγες εβδομάδες. Μείωση του δείκτη BSAP παρατηρήθηκε μόνο στην υψηλότερη δόση, η οποία επήλθε με πολύ αργό ρυθμό (60 μέρες μετά την χορήγηση του αναστολέα). Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν πως η παρεμπόδιση της πρωτεΐνης RANKL έχει κλινική αξία στην θεραπεία της οστεοπόρωσης, όμως ο φυσικός αναστολέας δεν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί λόγω πιθανής ανοσογονικότητας (Bekker et al., 2001) αλλά και του γεγονότος ότι ο OPG

προσδένεται και σε ένα άλλο μέλος της TNF υπερικογένειας, το TRAIL (Emery et al., 1998).

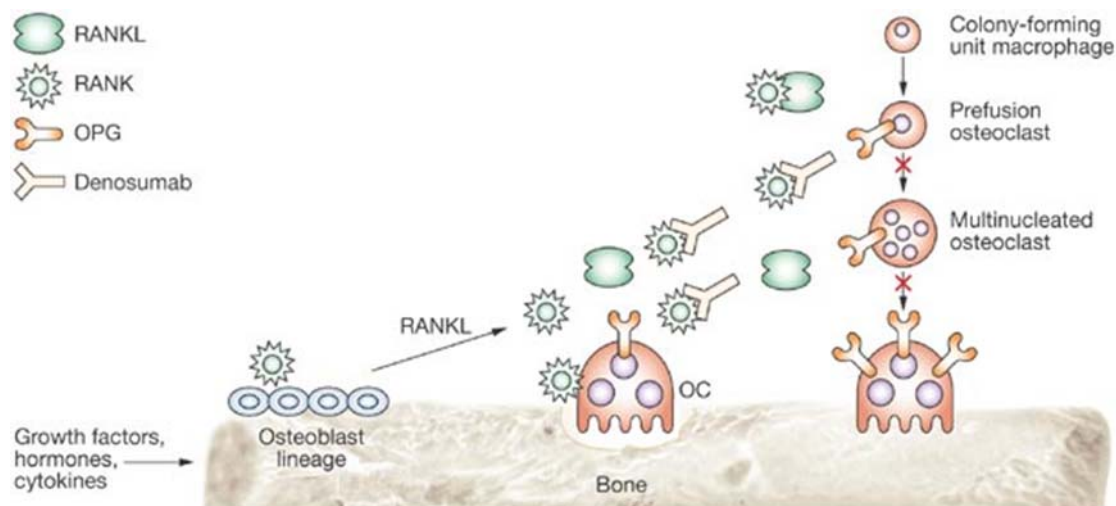
1.4.3 Το φαρμακευτικό προϊόν Denosumab

Το Denosumab ή αλλιώς AMG-162 είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) το οποίο δεσμεύεται με μεγάλη εξειδίκευση στην πρωτεΐνη RANKL. Το αντίσωμα αναστέλλει το RANKL/RANK μονοπάτι μεταγωγή σήματος που είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση, λειτουργία και επιβίωση των οστεοκλαστών (Bekker et al., 2004). Η δράση του Denosumab φαίνεται να έχει εξαιρετικά αποτελέσματα σε γυναίκες που εμφάνισαν οστεοπόρωση μετά την εμμηνόπαυση, σε τραύματα που προκαλούνται από την ρευματοειδή αρθρίτιδα ή τη μετάσταση καρκίνου (McClung et al., 2006).

Το αντίσωμα αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας τεχνολογία διαγονιδιακών ποντικών Xenomouse. Δεσμεύοντας τον προσδέτη RANKL ώστε να αποτύχει η σύνδεση του με τον υποδοχέα RANK, το denosumab δρα με πολύ υψηλή ακρίβεια στην αναστολή της οστικής απορρόφησης όπως απέδειξαν και *in vitro* και *in vivo* πειράματα (Εικόνα 1.17). Προκλινικές μελέτες που έγιναν σε πιθήκους έδειξαν πως ενδοφλέβια χορήγηση 0,1 και 10 mg/kg denosumab μείωσαν τις τιμές του N-telopeptide (NTx), δείκτη για την αποδόμηση του κολλαγόνου στα οστά, κατά 81% και 94%, αντίστοιχα. Υποδόρια χορήγηση 1mg/kg μείωσε τον δείκτη NTx κατά 93% (Bekker et al., 2004).

Το 2004 ο Bekker και οι συνεργάτες του διεξήγαγαν μία μελέτη για την εκτίμηση της ασφάλειας και της ανεκτικότητας υγείων γυναικών μετά την εμμηνόπαυση στο Denosumab. Συνολικά 49 γυναίκες έλαβαν μέρος στη μελέτη, στις οποίες δόθηκε μία δόση από το αντίσωμα (0,01-3.0mg/kg) ή εικονικό φάρμακο με υποδόρια ένεση στην κοιλιακή χώρα. Για του επόμενους 6 έως 9 μήνες για τις υψηλές δόσεις, ελέγχονταν οι δείκτες αναδόμησης των οστών στις γυναίκες καθώς και πιθανές παρενέργειες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η δράση του denosumab εξαρτάται από τη δόση που χορηγείται, με τη μέγιστη μείωση του δείκτη NTx να παρατηρείται στις δύο βδομάδες σε δόσεις $\leq 0,1\text{mg/kg}$, ένα μήνα για 1mg/kg δόση και τρεις μήνες για 3mg/kg δόση. Η δράση του αντισώματος είναι αντιστρεπτή με τον δείκτη να επιστρέφει στα προηγούμενα επίπεδα σε δύο με εννέα μήνες, ανάλογα με την δόση. Επιπλέον, καταγράφοντας την συγκέντρωση του denosumab στο αίμα των

συμμετεχόντων, αναλύθηκε η κινητικότητα του αντισώματος η οποία δεν παρουσίασε γραμμικότητα σε σχέση με τη δόση (Bekker et al., 2004).



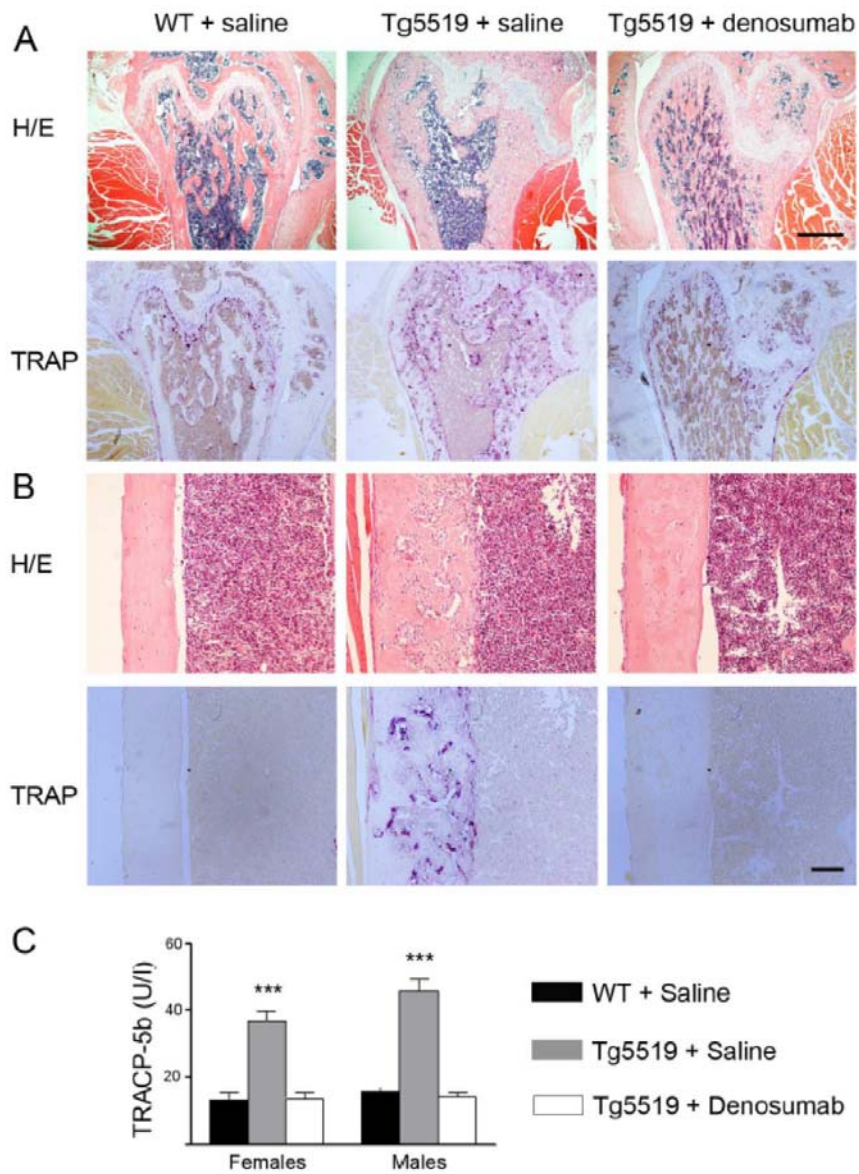
Εικόνα 1.17: Ο μηχανισμός δράσης του denosumab. Το αντίσωμα δεσμεύει τον RANKL, εμποδίζοντας την σύνδεσή του με το υποδοχέα RANK με αποτέλεσμα να μην ενεργοποιείται το μονοπάτι διαφοροποίησης των οστεοκλαστών (Deal, 2009).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν πως το denosumab θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια στην θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με την απώλεια οστικής μάζας. Τον Ιούνιο του 2010 η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (United States Food and Drug Administration – FDA) και της Ευρώπης (European Medicines Agency in Europe, EMA) ενέκρινε την χρήση του αντισώματος denosumab για την θεραπεία της οστεοπόρωσης σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες και σε περιπτώσεις απώλειας οστικής μάζας λόγω αφαίρεσης ορμονών σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και του προστάτη. Το αντίσωμα κυκλοφόρησε ως εμπορικό προϊόν με την ονομασία Prolia (Perone, 2010) και κυκλοφορεί στην Ελλάδα από το καλοκαίρι του 2010, ενώ πρόσφατα εγκρίθηκε η χρήση του και στην Ιαπωνία.

Η ερευνητική ομάδα της Δρ. Ντούνη έχει αναπτύξει ένα μοναδικό ζωικό μοντέλο οστεοπόρωσης με υπερέκφραση του RANKL γονιδίου του ανθρώπου σε διαγονιδιακά ποντίκια (TgRANKL) (Rinotas et al., 2013). Τα ποντίκια αυτά (Tg5519) φέρουν ολόκληρη τη γονιδιωματική περιοχή του RANKL του ανθρώπου σε 10 αντίγραφα και υπερεκφράζουν την RANKL πρωτεΐνη σε διάφορους ιστούς όπως στα οστά

ακολουθώντας το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου. Τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν οστική απώλεια στο σπογγώδες, πορώδη δομή στο φλοιώδες, έντονη οστεοκλαστογένεση, λιπώδη ιστό στον μυελό των οστών και μειωμένη οστική αντοχή. Για να εξετασθεί εάν τα ποντίκια αυτά αποτελούν κατάλληλο μοντέλο οστεοπόρωσης για την αξιολόγηση νέων φαρμάκων, μελετήθηκε αν ο φαινότυπος των ζώων μπορεί να επανέλθει στο φυσιολογικό ύστερα από θεραπεία με το αντίσωμα denosumab. Για τον σκοπό αυτό, χορηγήθηκε υποδόρια 10mg/kg φαρμάκου στα ζώα για 6 εβδομάδες, ξεκινώντας στις 4 εβδομάδες, όπου ήδη έχει αρχίσει να εμφανίζεται ο οστεοπορωτικός φαινότυπος.

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η επιλεκτική αναστολή της ανθρώπινης πρωτεΐνης RANKL από το denosumab, ανέστρεψε πλήρως τον παθολογικό φαινότυπο οστεοπόρωσης που παρουσίαζαν τα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον RANKL (Εικόνα 1.18). Το μοντέλο αυτό, λοιπόν, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση νέων φαρμάκων για την θεραπεία της οστεοπόρωσης (Rinotas et al., 2013).



Εικόνα 1.18: Επίδραση του denosumab στην θεραπεία RANKL διαγονιδιακών ποντικών με οστεοπόρωση. Αντιπροσωπευτικές τομές της μετάφυσης του μηριαίου οστού **(A)** και της μεσο-διάφυσης του φλοιώδους οστού **(B)** οστεοπορωτικών ποντικών (Tg 5519) στα οποία έχει χορηγηθεί είτε denosumab είτε φυσιολογικός ορός και άγριου τύπου ποντικών στους οποίους έχει χορηγηθεί φυσιολογικός ορός. Χρώση Εωσίνη/Αιματοξυλίνη (H/E, με μωβ χρώμα βάφεται ο μυελός των οστών) και χρώση TRAP (ώριμοι οστεοκλάστες). **(C)** Επίπεδα TRACP-5b (δείκτης οστικής απώλειας) σε Tg5519 ποντικούς ύστερα από θεραπεία με denosumab συγκριτικά με τους Tg5519 και αγρίου τύπου ποντικούς που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. *** $P \leq 0.001$ (Rinotas et al., 2013).

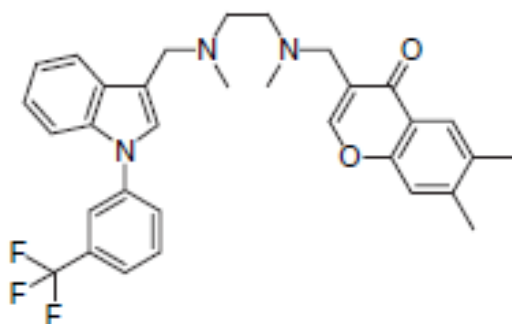
1.5 ΕΥΡΕΣΗ ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΟΥ-ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ TNF

Το 2005 ανακαλύφθηκε ένα μικρό μόριο, αναστολέας της πρωτεΐνης TNF, ο οποίος επάγει την αποδιάταξη του τριμερούς της πρωτεΐνης καθιστώντας την ανενεργή (He et al., 2005) (Εικόνα 1.19). Όπως προαναφέρθηκε, η πρωτεΐνη TNF παράγεται ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II και σχηματίζει ομο-τριμερη τα οποία στη συνέχεια απελευθερώνονται από την μεμβράνη ύστερα από πρωτεολυτική πέψη (Kriegler et al., 1988). Η πρωτεΐνη είναι ενεργή και ικανή να δεσμευτεί στους υποδοχείς της μόνο ως ομοτριμερές (Tang et al., 1996). Οι υποδοχείς που συνδέονται με την πρωτεΐνη, ο TNF receptor type 1 (TNF-R1) και ο TNF receptor type 2 (TNF-R2), είναι ικανοί να δεσμεύουν και την διαμεμβρανική και την εκκριτική μορφή της πρωτεΐνης (Wallach et al., 1991). Χαρακτηριστικό των υποδοχέων είναι η ύπαρξη της δομής θανάτου (death domain) για τον TNF-R1 και αλληλεπίδρασης με παράγοντες που σχετίζονται με τις πρωτεΐνες της TNFR υπεροικογένειας (TRAF interacting motifs) για τον TNF-R2. Πιστεύεται πως και ο υποδοχέας TNF-R1 μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνες της TRAF υπεροικογένειας, όμως με έμμεσο τρόπο (Tartaglia et al., 1993). Ύστερα από τη δέσμευση της πρωτεΐνης στους υποδοχείς, αυτοί απελευθερώνουν το εξωκυτταρικό τους κομμάτι με πρωτεολυτική πέψη. Ο υποδοχέας TNFR1 εκφράζεται συνεχώς σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους, ενώ ο TNFR2 είναι επαγόμενος και βρίσκεται κυρίως στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Στην πλειοψηφία των κυττάρων, ο TNFR1 φαίνεται να παίζει τον ρόλο κλειδί για την ενεργοποίηση του μονοπατιού μεταγωγής σήματος του TNF, ενώ στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τον ρόλο αυτόν κατέχει ο TNFR2 (Grell et al., 1995).

Η πρωτεΐνη TNF παράγεται κυρίως από μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, σιτευτικά κύτταρα (mast cells), ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και κύτταρα του νευρικού ιστού. Ο κύριος ρόλος της πρωτεΐνης είναι ο έλεγχος των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Mannel et al., 2000). Μπορεί να προκαλέσει πυρετό, κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, σήψη, καχεξία, φλεγμονή κ. (Beutler et al., 1985). Λόγω των ισχυρών προ-φλεγμονωδών και ανοσοδιεγερτικών ιδιοτήτων της, η πρωτεΐνη θεωρήθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη πολλών αυτοάνοσων νοσημάτων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ρευματοειδής αρθρίτιδα

(Taylor et al., 2000) και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Crohn's disease) (Blam et al., 2001), όπου σημαντική βελτίωση παρουσιάζουν οι ασθενείς που χορηγούνται με παράγοντες που εξουδετερώνουν την πρωτεΐνη TNF. Όλο και περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν την πλειοτροπική δράση της πρωτεΐνης και υποδεικνύουν πως ο τύπος του ιστού, η ακριβής περιεκτικότητα και αναλογία των υποδοχέων στο κύτταρο και η διάρκεια δράσης της πρωτεΐνης είναι πολύ σημαντικοί παράμετροι για το αποτέλεσμα της δράσης της πρωτεΐνης *in vivo*.

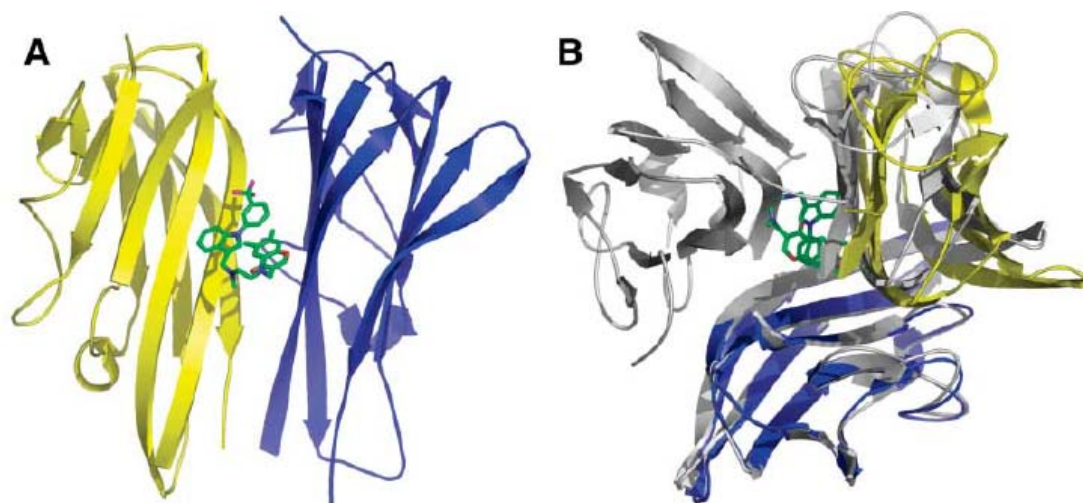
Το μικρό μόριο SPD304 (εικόνα 1.19) αποτελείται από ένα τρίφθορο-μέθυλο-φαίνυλο-ινδόλιο και μία διμέθυλο-χρωμόνη ενωμένα με μία διμεθυλαμίνη και έχει την ικανότητα να διασπά το ενεργό τριμερές σε ανενεργό διμερές αναστέλλοντας την σύνδεση της πρωτεΐνης στους υποδοχείς της (He et al., 2005).



Εικόνα 1.19: Χημική δομή του μορίου SPD-304.

Σε *in vitro* πειράματα για την αξιολόγηση της δραστηριότητας του μορίου ως αναστολέα, μία μέση συγκέντρωση των 22μM βρέθηκε ικανή να προκαλέσει αναστολή πρόσδεσης της πρωτεΐνης στον υποδοχέα TNFR1 και στο μονοπάτι υπεύθυνο για την καταστολή του αναστολέα της NF-kB πρωτεΐνης (IκB). Το πρώτο βήμα για την αναγνώριση του τρόπου δράσης του αναστολέα ήταν η λύση της δομής του συμπλόκου αναστολέα-TNF πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό έγινε προσπάθεια για τη λύση της κρυσταλλικής δομής του αναστολέα με το τριμερές της πρωτεΐνης με την χρήση ακτίνων-X (Εικόνα 1.20). Όπως αποκαλύφθηκε, ο αναστολέας SPD-304 αντικαθιστά την μία υπομονάδα στο τριμερές του TNF οπότε σταθεροποιείται σε σύμπλοκο με το διμερές. Στην ανάλυση φάνηκε, επίσης, πως το μόριο είχε προσδεθεί

σε μία «ρηχή εσοχή» αλληλεπιδρώντας με αμινοξικά κατάλοιπα και των δύο υπομονάδων, το οποία βρίσκονται θαμμένα ανάμεσα στις υδρόφοβες επιφάνειες αλληλεπίδρασης των μονομερών.



Εικόνα 1.20: Λύση της δομής του αναστολέα SPD-304 σε σύνδεση με την πρωτεΐνη TNF. (A) Η λύση της δομής του μορίου-αναστολέα με το διμερές της TNF πρωτεΐνης με κρυσταλλογραφία με ακτίνες X. (B) Η δομή του ίδιου συμπλόκου από άλλη οπτική γωνία. Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας, με γκρι εμφανίζεται το τριμερές TNF και με μπλε και κίτρινο οι υπομονάδες του διμερούς.

Πιο συγκεκριμένα, όταν προσδέεται το μόριο στο διμερές της πρωτεΐνης, αναδιπλώνονται οι δύο ομάδες που το αποτελούν και βρίσκονται η μία πάνω στην άλλη. Τα αμινοξικά κατάλοιπα με τα οποία αλληλεπιδρά ο αναστολέας είναι 16, 9 εκ των οποίων βρίσκονται στην πρώτη υπομονάδα (E57, Y59, S60, Q61, Y119, L120, G121, G122, και Y151) και 7 στην δεύτερη (L5', Y59', S60', Y119', L120', G121', and Y151'). Αξιοσημείωτο είναι πως το υπεύθυνο αμινοξύ για την μικρή αλλαγή της γωνίας ανάμεσα στις υπομονάδες του διμερούς, που είναι απαραίτητη για την δέσμευση του μορίου σε αυτές είναι η Τυροσίνη119.

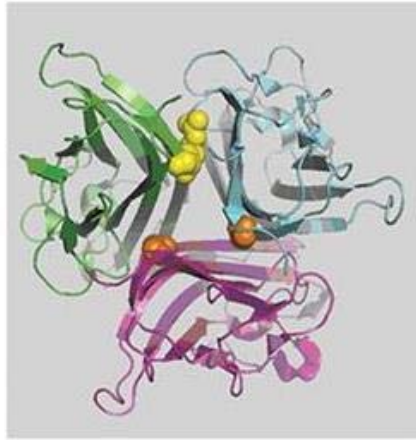
Ύστερα από την αναγνώριση του τρόπου σύνδεσης του μορίου στην πρωτεΐνη, το επόμενο βήμα ήταν η κατανόηση του μηχανισμού δράσης του μορίου. Η επιστημονική ομάδα που ανακάλυψε το μόριο-αναστολέα πρότεινε δύο πιθανά μοντέλα για τον τρόπο δράσης του. Στο πρώτο μοντέλο, το μόριο λειτουργεί

παθητικά δεσμεύοντας και σταθεροποιώντας τη δομή αμέσως μετά την αυθόρμητη αποχώρηση της μίας υπομονάδας από το τριμερές. Στο δεύτερο μοντέλο, το μόριο αλληλεπιδρά με το τριμερές της πρωτεΐνης προκαλώντας την απόσπαση της υπομονάδας. Προκειμένου να διερευνηθεί ποιος από τους δύο μηχανισμούς συμβαίνει στην πραγματικότητα, αναπτύχθηκε μία πολύ ευαίσθητη δοκιμή (fluorescence homoquenching-based assay) για να παρατηρηθεί η κινητική της απόσπασης της υπομονάδας από το τριμερές. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως παρουσία του μορίου, τα διμερή ήταν 600 φορές περισσότερα συγκριτικά με την απουσία του μορίου. Επομένως, το μόριο φαίνεται να δημιουργεί ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο με το τριμερές της πρωτεΐνης, επάγοντας την απομάκρυνση μίας από τις υπομονάδες του και τον σχηματισμό του διμερούς.

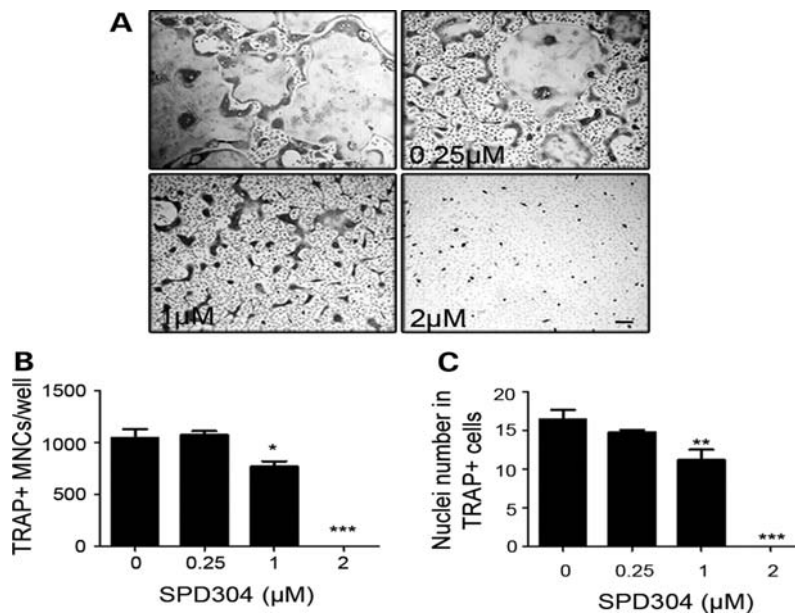
1.5.1 Αξιολόγηση του μορίου SPD-304 ως αναστολέα της πρωτεΐνης RANKL

Σε πρόσφατη μελέτη η ερευνητική ομάδα της Δρ Ελένης Ντούνη ανακάλυψε με τυχαία μεταλλαξογένεση ένα νέο μοντέλο υπολειπόμενης οστεοπέτρωσης στο ποντίκι που οφείλεται σε μία σημειακή μετάλλαξη με λάθος νόημα στο γονίδιο του RANKL. Η μετάλλαξη αυτή προκαλεί αντικατάσταση της γλυκίνης στη θέση 278 από αργινίνη (Douni et al., 2012) στην F β-πτυχωτή επιφάνεια του RANKL που βρίσκεται στην περιοχή αλληλεπίδρασης των μονομερών. Βάση της γνωστής κρυσταλλικής δομής του RANKL φαίνεται ότι η γλυκίνη 278 παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό των τριμερών και αντικατάστασή της από την αργινίνη παρεμποδίζει τον τριμερισμό των μονομερών δημιουργώντας μια ανενεργή RANKL πρωτεΐνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μόριο SPD-304 αλληλεπιδρά με την γλυκίνη 122 στο μόριο του TNF που αντιστοιχεί στην γλυκίνη 278 του RANKL (Εικόνα 1.21). Η γλυκίνη αυτή είναι συντηρημένη στη TNF υπεροικογένεια και φαίνεται ότι παίζει βασικό ρόλο στον τριμερισμό.

Εξετάστηκε επομένως εάν το μικρό μόριο SPD-304, που αλληλεπιδρά με την συντηρημένη γλυκίνη στο TNF παρεμποδίζει επίσης τη δράση του RANKL σε δοκιμές οστεοκλαστογένεσης (Εικόνα 1.22). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το SPD-304 αναστέλλει αποτελεσματικά τη δράση του RANKL, πιθανώς χρησιμοποιώντας τον ίδιο μηχανισμό δράσης με τον TNF (Douni et al., 2012).



Εικόνα 1.21: Διαγραμματική απεικόνιση με κορδέλες του τριμερούς του RANKL. Με πορτοκαλί φαίνεται το αμινοξύ G278 των αγρίων τύπων αλυσίδων και με κίτρινο το μεταλλαγμένο αμινοξύ G278R (Douni et al., 2012).



Εικόνα 1.22: Το μικρό μόριο SPD-304 αναστέλλει την πρωτεΐνη RANKL. (A) Χρώση TRAP για την παρουσία RANKL-επαγόμενων οστεοκλαστών σε διάφορες συγκεντρώσεις του μορίου SPD-304. (B) Αριθμός των πολυπύρηνων κυττάρων (αντιστοιχούν σε οστεοκλάστες) ανά βοθρίο. (C) Αριθμός των πυρήνων ανά οστεοκλάστη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του μορίου. Και στα 3 πειράματα η σύγκριση έγινε με κύτταρα χωρίς προσθήκη του SPD-304 (*P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.0001) (Douni et al., 2012).

1.5.2 Τοξικότητα του μορίου SPD-304

Παρά τις θετικές ιδιότητες του μορίου, η χρήση του σε φαρμακευτικές δοκιμές θεωρήθηκε αδύνατη καθώς σε όλα τα κυτταρικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν παρουσίασε τοξικότητα από την συγκέντρωση 5μΜ. Λόγω της ιδιαίτερης σημασίας του ως αναστολέα, το μόριο μελετήθηκε διεξοδικά ως προς τους παράγοντες που προκαλούν την τοξικότητά του.

Μεταβολικά πειράματα του μορίου, υποδεικνύουν πως ο 3-μεθυλ-ινδολικός του δακτύλιος μπορεί να αφυδρογονωθεί από ένζυμα του P450 κυτοχρώματος, παράγοντας ακόρεστα ιμίνια (iminium), που είναι ιδιαίτερα τοξικές ουσίες (Sun et al., 2007). Πέρα από αυτή τη διαδικασία, η υδροξυλίωση των μεθυλίων της διμεθυλοχρωμόνης (dimethylchromone) του SPD-304 θεωρείται πως παίζει επίσης κάποιο ρόλο στην τοξικότητα του μορίου (Skiles et al., 1996).

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η οστεοπόρωση είναι μία ασθένεια που επηρεάζει ένα μεγάλο ποσοστό εμμηνόπαυσιων γυναικών μειώνοντας την ποιότητα της ζωής τους. Πλέον γνωρίζουμε πως η αιτία για την εμφάνιση της ασθένειας είναι η ανεξέλεγκτη δράση των οστεοκλαστών, οι οποίοι καταστρέφουν τα οστά πολύ πιο γρήγορα απ' ό,τι αυτά δημιουργούνται. Η αυξημένη δράση τους έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ποιότητας των οστών καθιστώντας τα εύθραυστα και επιρρεπή σε κατάγματα. Υπεύθυνη για την ανεξέλεγκτη δράση των οστεοκλαστών, φαίνεται να είναι η αύξηση της πρωτεΐνης RANKL, η οποία επάγει την διαφοροποίηση και ωρίμανση των οστεοκλαστών. Ήδη η νέα θεραπευτική αντιμετώπιση της εμμηνόπαυσιων οστεοπόρωσης είναι η χρήση ενός μονοκλωνικού αντισώματος που με μεγάλη ειδικότητα αναστέλλει τη δράση της πρωτεΐνης RANKL. Επομένως, η πρωτεΐνη RANKL αποτελεί ένα σημαντικότερο στόχο για την θεραπεία ασθενειών με οστική απώλεια και η εύρεση νέων αναστολέων του αποτελεί μια πρόκληση.

Στην παρούσα διατριβή γίνεται μία προσπάθεια αξιολόγησης μικρών μορίων ως νέοι αναστολείς της πρωτεΐνης RANKL. Τα μόρια αυτά έχουν σχεδιαστεί ως ανάλογα του μικρού μορίου SPD-304 που στο παρελθόν έχει δειχθεί ότι αναστέλλει τον τριμερισμό της πρωτεΐνης TNF, αλλά εμφανίζει πολύ υψηλή τοξικότητα. Δεδομένου ότι το SPD-304 μόριο αναστέλλει τη δράση και της πρωτεΐνης RANKL, σχεδιάστηκαν ανάλογά του, με στόχο να βελτιωθούν οι ιδιότητες του αρχικού μορίου, δηλαδή να διατηρηθεί εξειδίκευσή τους ως προς την πρωτεΐνη RANKL και να μειωθεί η κυτταροτοξικότητά τους, ώστε να μην επηρεάζει την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν 9 νέα μικρά μόρια ανάλογα του SPD-304 ως προς α) την ιδιότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του RANKL σε δοκιμές οστεοκλαστογένεσης, β) την κυτταροτοξική δράση τους και γ) την παρεμπόδιση του τριμερισμού του RANKL.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ο σχεδιασμός των αναλόγων του SPD-304 έγινε από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή κ. Ηλιόπουλου (Εργαστήριο Γενετικής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών), η σύνθεση των αναλόγων έγινε από την ομάδα του καθηγητή κ. Κουλαδούρου (Εργαστήριο Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών), και οι δοκιμές δέσμευσης από την ομάδα του αν. καθηγητή κ. Κοντοπίδη (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

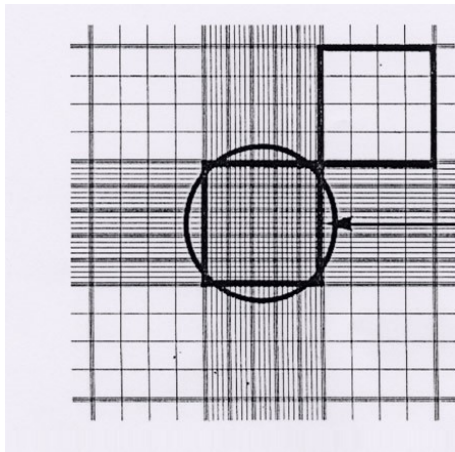
2.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΙΘΜΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΠΟ ΜΑΚΡΑ ΟΣΤΑ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε απαιτεί τα εξής υλικά:

- Αγωγό κάθετης νηματικής ροής Bioair instruments safeflow 2
- Θρεπτικό μέσο α -MEM (Gibco)
- Ορό εμβρύου μόσχου (FBS) (Gibco)
- Γλουταμίνη 200mM (Gibco)
- Πενικιλίνη / Στρεπτομυκίνη 10000U/ml (P/S) Gibco)
- Βελόνα διαμέτρου 271/2g (BD Medical)
- Σύριγγα των 5ml (BD Medical)
- Φίλτρο 70 μ m Nylon (BD Falcon)
- Falcon των 15ml (Sarstedt)
- Ficoll-Paque (GE Healthcare)
- Φυγόκεντρος eppendorf 5810R (Eppendorf)
- DPBS 10x (Gibco)
- Φυγόκεντρος Heraeus Labofuge 400 (Thermo Scientific)
- Αιματοκυττόμετρο (Bright Line)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- 1) Παρασκευή του complete medium α -MEM: 10% FBS, 2mM Glutamine, 5000U P/S. Επιλογή αρσενικών ποντικών 2-3 μηνών.
- 2) Θανάτωση ποντικών με CO₂.
- 3) Αφαίρεση των μακρών οστών του ποντικού.
- 4) Καθαρισμός των μακρών οστών από τους μύες.
- 5) Με βελόνα διαμέτρου 271/2g διανοίγονται οπές στην περιοχή της μετάφυσης των μακρών οστών.
- 6) Με μία σύριγγα των 5ml γίνεται εξώθηση των κυττάρων του μυελού των οστών. Καλή επαναδιάλυση των κυτταρικών συσσωματωμάτων (σχηματισμό ομοιογενούς κυτταρικού αιωρήματος), ακολούθως φιλτράρουμε το κυτταρικό αιώρημα και μεταφορέουμε σε falcon των 15ml.
- 7) Σε καινούργια σειρά falcon των 15ml προσθέτουμε 6ml του παράγοντα κυτταρικής κλασμάτωσης Ficoll-Paque. Ακολούθως προσθέτουμε την ποσότητα των κυττάρων σταγδην-στάγδην ώστε να μην αναμειχθούν οι δύο φάσεις και συμπληρώνουμε θρεπτικό μέσο ώστε ο τελικό όγκος να φτάσει τα 14ml.
- 8) Φυγοκέντρωση στα 1000g για 21min στους 22°C. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην επιτάχυνση και την επιβράδυνση της φυγοκέντρωσης, η οποία πρέπει να είναι πολύ χαμηλή ώστε οι φάσεις να μην αναμειχθούν.
- 9) Στο τέλος της φυγοκέντρωσης θα πρέπει να είναι ευδιάκριτη μία θολή ενδιάμεση φάση ανάμεσα στη φάση της φικόλης και του θρεπτικού μέσου, στο οποίο περιέχονται τα πρόδρομα μονοκύτταρα. Ξέπλυμα των κυττάρων με 1xPBS και φυγοκέντρωσή τους για 5min.
- 10) Όταν τελειώσει η φυγοκέντρωση, τοποθετούνται 10μl σε κάθε μεριά του αιματοκυττόμετρου και γίνεται μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο.
- 11) Υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων μέσω του τύπου (μέσος αριθμός κυττάρων σε ένα μεγάλο τετράγωνο) x συντελεστή αραιώσης x 10⁴.



Μεγάλο τετράγωνο

2.2 ΔΟΚΙΜΗ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΜΕΣΩ RANKL ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ TRAP (RANKL INDUCED OSTEOCLASTOGENESIS WITH TRAP STAINING)

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε απαιτεί τα εξής υλικά:

- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Bioair instruments safeflow 2)
- Πιάτο 96 βοθρίων (Costar)
- Θρεπτικό μέσο α -MEM (Life technologies)
- Mouse M-CSF (R&D Systems)
- Human RANKL (Peprotech)
- PRAs 20mM (100%DMSO)
- Επωαστήρας Series II 3110 Water-Jacketed CO₂ (Thermo Forma)
- DPBS
- Fixative Solution: 6,75mM Citrate, 65%acetone, 2,96%formaldehyde (Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit 387A-1kT – Sigma)
- TRAP Staining Solution: 1,25mg naphthol, 75mM acetate, 0,1g tatrare, 0,7mg fast garnet, 1,38mg sodium nitrate (Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit 387A-1kT – Sigma)
- 50%Glycerol in 1xPBS
- Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης Nikon eclipse TE300 (Nikon)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

ΠΡΩΤΗ ΜΕΡΑ

- 1) Σε κάθε βοθρίο προσθέτουμε 100 μl από κυτταρικό αιώρημα συγκέντρωσης 6×10^5 /ml (τελικός αριθμός $6 \cdot 10^4$ κύτταρα/βοθρίο).
- 2) Επώαση του πιάτου στους 37°C - $5\%\text{CO}_2$.
- 3) Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μορίου-αναστολέα από την αρχική συγκέντρωση σε α -MEM που περιέχει 25ng/ml MCSF και 40ng/ml RANKL ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση αναστολέα. Η περιεκτικότητα όλων των δειγμάτων σε διαλύτη (DMSO) είναι 0,1%.
- 4) Επώαση στους 37°C , $5\%\text{CO}_2$ για 1 ώρα.
- 5) Προσθήκη 100 μl σε κάθε βοθρίο με κύτταρα.
- 6) Επώαση στους 37°C , $5\%\text{CO}_2$.

ΤΡΙΤΗ ΜΕΡΑ

- 1) Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μορίου-αναστολέα από την αρχική συγκέντρωση σε α -MEM που περιέχει 25ng/ml MCSF και 40ng/ml RANKL ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση αναστολέα.
- 2) Επώαση στους 37°C για 1 ώρα.
- 3) Προσθήκη 200μl στα βοθρία.
- 4) Επώαση στους 37°C , $5\%\text{CO}_2$.

ΠΕΜΠΤΗ ΜΕΡΑ

- 1) Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μορίου-αναστολέα από την αρχική συγκέντρωση σε α -MEM που περιέχει 25ng/ml MCSF και 40ng/ml RANKL ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση αναστολέα.
- 2) Επώαση στους 37°C για 1 ώρα.
- 3) Προσθήκη 200μl στα βοθρία.
- 4) Επώαση στους 37°C , $5\%\text{CO}_2$.

ΕΚΤΗ ΜΕΡΑ

- 1) Ξέπλυμα με 1xPBS για να απομακρυνθούν τα χαλαρά προσδεμένα κύτταρα.

- 2) Προσθήκη 50μl/βοθρίο fixative solution για την μονιμοποίηση των κυττάρων.
Επώαση για 1min.
- 3) Ξέπλυμα με 200μl/well 1xPBS.
- 4) Παρασκευή του διαλύματος TRAP σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit και προσθήκη 100 μl/βοθρίο για 10min στους 37°C.
- 5) Απομακρύνεται το διάλυμα TRAP και προστίθενται 200μl διαλύματος 50% Glycerol σε 1xPBS για την διατήρηση των κυττάρων.
- 6) Φωτογράφιση των πιάτων σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

2.3 ΔΟΚΙΜΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΩΝ ΜΕ ΔΙΑΛΥΜΑ TRAP (TRAP ACTIVITY ASSAY)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε απαιτεί τα εξής υλικά:

- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής (Bioair instruments safeflow 2)
- Πιάτο 96 βοθρίων (Costar)
- Θρεπτικό μέσο α-MEM (Life technologies)
- Mouse M-CSF (R&D Systems)
- Human RANKL (Peprotech)
- Επωαστήρας Series II 3110 Water-Jacketed CO2 (Thermo Forma)
- DPBS (Gibco)
- Διάλυμα 0,2% Triton X-100 in PBS
- Διάλυμα TRAP (100mM Sodium acetate, 9mM p-nitrophenyl phosphate, 0,1M sodium tatrte)
- 0,5N NaOH
- Φωτόμετρο (Molecular devices opti-max tunable microplate reader (Biotech Equipment Sales)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

ΠΡΩΤΗ ΜΕΡΑ

- 1) Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 100 μl από το διάλυμα κυττάρων, στα οποία περιέχονται $6 \cdot 10^4$ κύτταρα.
- 2) Επώαση του πιάτου στους 37°C, 5%CO₂.
- 3) Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μορίου-αναστολέα από την αρχική συγκέντρωση σε α-MEM που περιέχει 25ng/ml MCSF και 40ng/ml RANKL ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση αναστολέα.
- 4) Επώαση στους 37 °C για 1 ώρα.
- 5) Προσθήκη στα 100μl σε κάθε βοθρίο με κύτταρα.
- 6) Επώαση στους 37°C, 5%CO₂.

ΤΡΙΤΗ ΜΕΡΑ

- 1) Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μορίου-αναστολέα από την αρχική συγκέντρωση σε α-MEM που περιέχει 25ng/ml MCSF και 40ng/ml RANKL ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση αναστολέα.
- 2) Επώαση στους 37 °C για 1 ώρα.
- 3) προσθήκη 200μl στα βοθρία.
- 4) Επώαση στους 37°C, 5%CO₂.

ΠΕΜΠΤΗ ΜΕΡΑ

- 1) 2 ξεπλύματα με 1xPBS
- 2) Λύση των κυττάρων σε 200μl παγωμένο 0,2%Triton X-100. Επώαση για 10min και ελαφριά ανάδευση στο ενδιάμεσο. Προσθήκη 180μl διαλύματος TRAP σε 20μl κυτταρικού εκχυλίσματος. Επώαση για 30min στους 37 °C.
- 3) Προσθήκη 50μl 0,5N NaOH για να σταματήσει η αντίδραση.
- 4) Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405nm.

2.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης στα λυμένα κύτταρα με τη μέθοδο Bradford

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε απαιτεί τα εξής υλικά:

- Πιάτο 96 βοθρίων (Costar)
- Διάλυμα Bradford (Biorad)
- 1xPBS
- BSA 0,5mg/ml
- Φωτόμετρο Molecular devices opti-max tunable microplate reader (Biotech Equipment Sales)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- 1) Προετοιμασία του διαλύματος Bradford (αναλογία 1:5 σε H₂O). Προετοιμασία των standards με πρωτεΐνη BSA γνωστής συγκέντρωσης για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης και τον υπολογισμό της συνολικής πρωτεΐνης των προς εξέταση δειγμάτων.
- 2) Επώαση για 15min.
- 3) Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595nm.
- 4) Δημιουργία της πρότυπης καμπύλης $y = a + bx$, όπου $y = \mu\text{g}$ και $x = \text{OD}$.
- 5) Υπολογισμός των μg ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα.
- 6) Τέλος, υπολογίζεται το πηλίκo της ποσότητας της πρωτεΐνης TRAP προς την συνολική ποσότητα πρωτεΐνης στα δείγματα ώστε να προσδιορισθεί η δραστικότητα (ποσότητα πρωτεΐνης TRAP) ανά μg δείγματος (σύνολο πρωτεϊνών).

2.4 ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ MTT (MTT TOXICITY ASSAY)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε απαιτεί τα εξής υλικά:

- Πιάτο 96 βοθρίων (Costar)
- Θρεπτικό μέσο α -MEM (Gibco)
- Mouse M-CSF (R&D Systems)

- Επωαστήρας Series II 3110 Water-Jacketed CO₂ (Thermo Forma)
- Αντιδραστήριο MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 5mg/ml (Sigma)
- DMSO (Sigma)
- Φωτόμετρο Molecular devices opti-max tunable microplate reader (Biotech Equipment Sales)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

ΠΡΩΤΗ ΜΕΡΑ

- 1) Σε κάθε βοθρίο προστίθενται 100 μl από το διάλυμα κυττάρων, στα οποία περιέχονται 10⁵ κύτταρα.
- 2) Επώαση του πιάτου στους 37°C, 5%CO₂. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μορίου-αναστολέα ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση σε α-MEM με 25ng/ml MCSF. Προσθήκη 100μl στα βοθρία με τα κύτταρα.
- 3) Επώαση στους 37°C, 5%CO₂.

ΜΕΡΑ ΤΡΙΤΗ

- 1) Αραίωση του πυκνού αντιδραστηρίου MTT σε τελική συγκέντρωση 0,5mg/ml με α-MEM.
- 2) Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και προσθήκη 200μl αντιδραστήριο MTT.
- 3) Επώαση των κυττάρων για 2 ώρες στους 37°C, 5%CO₂.
- 4) Απομάκρυνση του διαλύματος και προσθήκη 200μl DMSO.
- 5) Ανάδευση για 2-3min.
- 6) Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 550nm.

2.5 CROSS LINKING – WESTERN BLOTTING

2.5.1 Cross linking – Ηλεκτροφόρηση

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω υλικά

- Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης (resolving gel 12% - stacking gel 4%)
- 1,5M Tris PH 8,8
- Acrylamide (Applichem)
- 10% SDS
- 10% APS
- N,N,N',N'-TetramethylethylenediamineIsopropanol (TEMED) (Sigma)
- dH2O
- falcon 15ml
- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (Biorad)
- Heat block
- Tris-glycine electrolhoresis buffer (25mM Trisma Base, 192mM glycine, 0,1%SDS)
- Suberic acid - DSS (50mM) (Sigma)
- Διμεθυλοσουλφοξείδιο – DMSO (Sigma)
- Loading buffer (μπλε της βρωμοφαινόλης)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- 1) Τα τζάμια της συσκευής μέσα στα οποία θα παρασκευαστεί το πήκτωμα τοποθετούνται στο καλούπι τους, το οποίο τοποθετείται στη βάση η οποία θα το κρατήσει σταθερό.
- 2) Σε falcon των 15 ml αναμειγνύονται τα συστατικά για το resolving gel (12%), όπου γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών
 - i. 1,65ml dH2O
 - ii. 1,25ml 1,5M Tris-HCl PH 8,8
 - iii. 2ml 30% Acrylamide

iv. 50μl 10% SDS

Τέλος προστίθενται οι αποδιατακτικοί παράγοντες

i. 50μl 10%APS

ii. 5μl TEMED

- 3) Το διάλυμα αναμειγνύεται και χύνεται ανάμεσα στα τζάμια.
- 4) Από πάνω προστίθεται μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για να γίνει ευθυγράμμιση του πηκτώματος.
- 5) Μόλις πήξει το resolving gel, ξεκινά η παρασκευή του stacking gel (4%), το οποίο χρησιμεύει στη συμπύκνωση των πρωτεϊνών σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φτάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel).
 - i. 1,51ml dH₂O
 - ii. 625μl 0,5M Tris-HCl PH 6,8
 - iii. 335μl 30% Acrylan
 - iv. 25μl 10% SDS
- 6) Στο στάδιο αυτό αφαιρείται η αιθανόλη και προστίθενται οι αποδιατακτικοί παράγοντες.
 - v. 25μl 10% APS
 - vi. 3μl TEMED
- 7) Τέλος, τοποθετούνται τα χτενάκια στο πάνω μέρος των τζαμιών.
- 8) Τα μόρια αναστολείς αραιώνονται στην επιθυμητή συγκέντρωση (τελική συγκέντρωση διαλύτη στα μόρια 0,5%).
- 9) Προσθήκη 1μl μορίου-αναστολέα και 9μl πρωτεΐνης (0,278μM) και επώαση στους 37°C για 1 ώρα.
- 10) Προσθήκη 2μl του παράγοντα σύνδεσης DSS (50mM) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα.
- 11) Αφού περάσει η μία ώρα προστίθενται 2μl Tris-HCl 0,5M PH 7,5 σε κάθε δείγμα για να σταματήσει η αντίδραση και επώαση για 30min.

- 12) Στα δείγματα προσθέτουμε 5xLoading buffer και θερμαίνονται σε heat block στους 100°C για 3min.
- 13) Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγάδια της πολυακρυλαμίδης και η συσκευή γεμίζει με electrophoresis buffer.
- 14) Εφαρμογή ρεύματος σταθερής τάσης 90V.

2.5.2 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω υλικά:

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,45μm pore size (SanataCruz)
- Χαρτί Whattman
- Σφουγγάρια
- Transfer Buffer (25mM Trisma Base, 192mM Glucine, 20% methanol)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- 1) 4 χαρτιά Whattman, 2 σφουγγάρια καθώς και η μεμβράνη κομμένη στις διαστάσεις της πηκτής διαβρέχονται με transferring buffer
- 2) 1 σφουγγάρι, 2 χαρτιά Whattman και η μεμβράνη τοποθετούνται στην άνοδο και η πηκτή με τα άλλα δύο χαρτιά Whattman και το δεύτερο σφουγγάρι στην κάθοδο.
- 3) Τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με το tranfer buffer και ασκείται επίδραση ηλεκτρικού πεδίου 110V για μία ώρα στους 4°C.

2.5.3. Western Blotting

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω υλικά:

- Blocking Buffer (5% BSA in 1xPBS 0,1%Tween20)
- Πολυκλωνικό Αντίσωμα:Goat Anti-h.RANKL
- 1xPBS 0,1% Tween20

- Δευτερεύων Αντίσωμα: Anti-Goat HRP IgG

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- 1) Η μεμβράνη μεταφέρεται σε πλαστικό δοχείο με καπάκι.
- 2) Γίνεται προσθήκη Blocking Buffer ώστε να καλύπτεται πλήρως η μεμβράνη.
- 3) Η μεμβράνη μεταφέρεται στους 4°C για 16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση.
- 4) Προσθήκη πρώτου αντισώματος Anti-hum.RANKL (100ng/ml). Ο διαλύτης είναι 5%BSA in 1xPBS, 0,1%Tween20. Επώαση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- 5) Το αντίσωμα απομακρύνεται και ξεπλένουμε την μεμβράνη 3 φορές με 1xPBS, 0,1%Tween20 για 10min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- 6) Προσθήκη δεύτερου αντισώματος Anti-Goat (500ng/ml). Ο διαλύτης είναι 5%BSA in 1xPBS, 0,1%Tween20. Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.
- 7) Το αντίσωμα απομακρύνεται και ξεπλένουμε την μεμβράνη 3 φορές με 1xPBS, 0,1%Tween20 για 10min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.

2.5.4. Εμφάνιση της μεμβράνης

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω υλικά:

- Διάλυμα Α

dH ₂ O	2,33ml
2M Tris-HCl PH 8.5	125μl
Coumaric acid	11μl
Luminol	25μl
Total	2,5ml

- Διάλυμα Β

dH ₂ O	2,375ml
2M Tris-HCl PH 8.5	125μl
Hydrogen Peroxide 30%	1,5μl
Total	2,5ml

- Films(Fujifilm 24x24)
- Διάλυμα εμφάνισης του φιλμ (Developer)
- Διάλυμα μονιμοποίησης του φιλμ (Fixer)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- 1) Προετοιμασία των διαλυμάτων A και B, μίξη αυτών και επώαση ακολούθως της μεμβράνης για 3min.
- 2) Εμφάνιση της μεμβράνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ SPD-304

Τα τελευταία χρόνια οι έρευνες για την θεραπεία της οστεοπόρωσης, στρέφονται στην αναστολή της δράσης της πρωτεΐνης RANKL, η οποία είναι από τους κύριους ρυθμιστές της διαφοροποίησης, ενεργοποίησης και επιβίωσης των οστεοκλαστών (Bekker et al., 2001). Οι οστεοκλάστες είναι τα κύτταρα που ευθύνονται για την απορρόφηση των οστών στην διαδικασία που ονομάζεται οστική αναδόμηση και η υπερβολική ενεργότητά τους συνδέεται με την εμφάνιση οστεοπόρωσης. Το πολλά υποσχόμενο φάρμακο κατά της οστεοπόρωσης, denosumab, είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει την πρωτεΐνη RANKL του ανθρώπου, αναστέλλοντας την σύνδεση της με τον υποδοχέα RANK παρεμποδίζοντας έτσι το μονοπάτι διαφοροποίησης και ενεργοποίησης των οστεοκλαστών (Bekker et al., 2004). Το denosumab παρά τα πολύ θετικά αποτελέσματά του ως φάρμακο για την θεραπεία της οστεοπόρωσης, είναι ένα αντίσωμα και η μακροχρόνια χορήγησή του, θα μπορούσε να προκαλέσει ανεπιθύμητη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού (Miller et al., 2011). Επίσης, ως αντίσωμα δεν μπορεί να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να εισέλθει στον εγκέφαλο, ένα όργανο όπου η έκφραση του RANKL είναι ιδιαίτερα αυξημένη (Rinotas et al., 2013). Επομένως, η εύρεση μικρών μορίων (small molecules) που στοχεύουν τον RANKL αποτελούν εναλλακτικές μορφές αναστολής του.

Λίγα χρόνια πριν ανακαλύφθηκε ότι ένα μικρό μόριο, το SPD-304, μπορούσε να δράσει ως αναστολέας της πρωτεΐνης TNF μέσω της ικανότητάς του να καταστρέφει τα ενεργά τριμερή με την απομάκρυνση ενός μονομερούς και της δημιουργίας ενός ανενεργού διμερούς το οποίο δεν μπορεί πλέον να δεθεί στους υποδοχείς (He et al., 2005). Λόγω της ομολογίας μεταξύ RANKL και TNF και της ένταξής τους στην ίδια υπερικογένεια, το SPD-304 μόριο δοκιμάστηκε ως αναστολέας της πρωτεΐνης RANKL με θετικά αποτελέσματα (Douni et al., 2012). Βασικό μειονέκτημα του SPD-304 μορίου που αποτρέπει την χρήση του ως φάρμακο είναι η μεγάλη τοξικότητα που

εμφανίζει σε *in vitro* πειράματα κυτταροκαλλιιεργειών. Μεταβολικά πειράματα του μορίου, υποδεικνύουν πως ο 3-μεθυλ-ινδολικός του δακτύλιος μπορεί να αφυδρογονωθεί από ένζυμα του P450 κυτοχρώματος, παράγοντας ακόρεστα ιμίνια (iminium), που είναι ιδιαίτερα τοξικές ουσίες (Sun et al., 2007). Πέρα από αυτή τη διαδικασία, η υδροξυλίωση των μεθυλίων της διμεθυλοχρωμόνης (dimethylchromone) του SPD-304 θεωρείται πως παίζει επίσης κάποιο ρόλο στην τοξικότητα του μορίου. Για τον λόγο αυτό, σχεδιάστηκαν ανάλογα του SPD-304 μορίου, με σκοπό την δημιουργία νέων φαρμάκων διατηρώντας ή βελτιώνοντας την δράση τους σε λειτουργικές δοκιμές οστεοκλαστογένεσης και ταυτόχρονα ελαττώνοντας την κυτταροτοξικότητά τους.

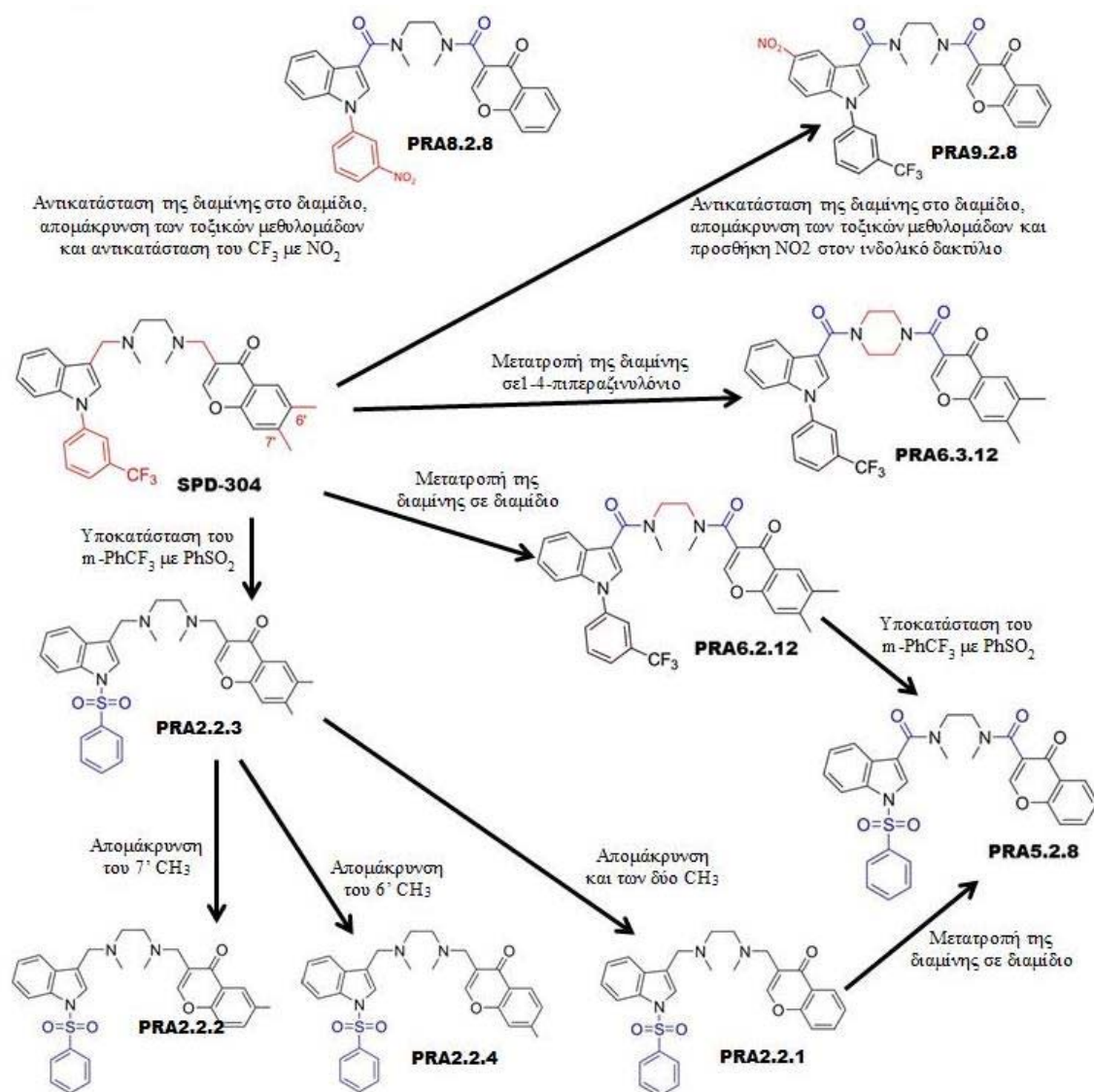
Πιο συγκεκριμένα, για την σύνθεση των μορίων PRA2.2., αρχικά έγινε αντικατάσταση του τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτυλίου (trifluoromethylphenyl moiety) με αρωματικό δακτύλιο και μία θειϊκή ομάδα (PhSO_2). Ταυτόχρονα, στα μόρια αυτά απομακρύνθηκε το 7'μεθύλιο (PRA2.2.2), το 6' μεθύλιο (PRA2.2.4) ή και τα δύο (PRA2.2.1) από την διμεθυλοχρωμόνη.

Στα μόρια PRA6.2.12 και PRA6.3.12 έχει γίνει αντικατάσταση της διαμίνης που υπήρχε αρχικά στο SPD-304, με το αντίστοιχο διαμίδιο (PRA6.2.12) και το 1-4-πιπεραζινυλόνιο (1-4-piperazinylone) (PRA6.3.12).

Στο μόριο 5.2.8 συνυπάρχουν οι αλλαγές των μορίων 2.2.1 και 6.2.12, οι οποίες περιλαμβάνουν την αλλαγή της διαμίνης στο διαμίδιο, απομάκρυνση των μεθυλίων από τον δακτύλιο της διμεθυλοχρωμόνης και αντικατάσταση του τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτυλίου με τον αρωματικό δακτύλιο PhSO_2 .

Στο μόριο 8.2.8 έχει αντικατασταθεί το τριφθορομεθύλιο με αζωτούχα ομάδα (NO_2), η διαμίνη έχει αντικατασταθεί με το αντίστοιχο διαμίδιο και έχουν απομακρυνθεί τα μεθύλια από την διμεθυλοχρωμόνη.

Για την σύνθεση του μορίου 9.2.8 οι αλλαγές αφορούν την μετατροπή της διαμίνης σε διαμίδιο, την απομάκρυνση των μεθυλίων από την διμεθυλοχρωμόνη και προσθήκη μίας αζωτούχας ομάδας (NO_2) στον δακτύλιο ινδολίου.



Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση της πορείας σύνθεσης των μορίων – αναλόγων.

3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΙΚΑΝΟΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ

Ο προσδιορισμός της συγγένειας των μορίων με την πρωτεΐνη, δηλαδή η ικανότητά τους να αναγνωρίζουν και να προσδένονται σε αυτή, βασίστηκε σε *in vitro* πειράματα δέσμευσης για τον υπολογισμό της σταθεράς διάστασης (K_d) του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν από την ερευνητική ομάδα του κ.Κοντοπίδη.

Η δέσμευση ενός προσδέτη από έναν υποδοχέα μπορεί να περιγραφεί από την ακόλουθη αντίδραση ως αποτέλεσμα του νόμου δράσης των μαζών (Mass Action Law): Πρόσδεμα [L] + Υποδοχέας [R] \leftrightarrow [LR].

Η σταθερά διάστασης (K_d) του συμπλόκου Πρόσδετη-Υποδοχέας ορίζεται από τη σχέση: $K_d = [L] \times [R] / [LR]$. Όσο πιο μικρή είναι η σταθερά διάστασης τόσο πιο ισχυρή είναι η συγγένεια μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα, δηλαδή υπάρχει ισχυρότερη σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα (Zhou et al., 2008).

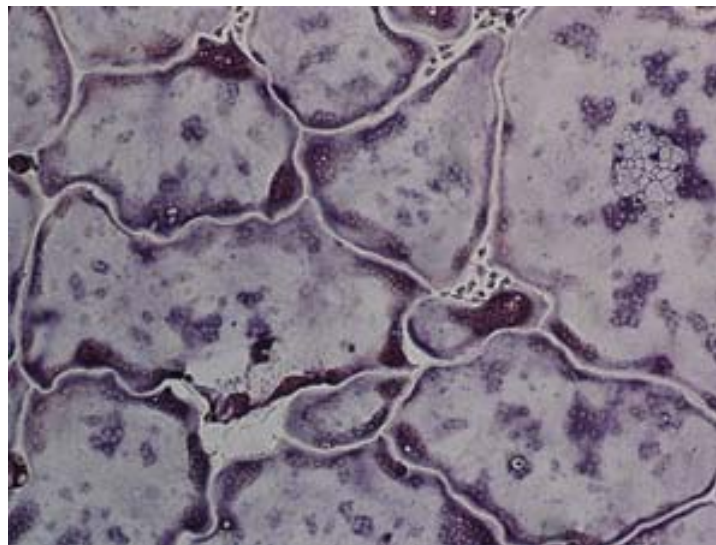
3.3 RANKL-ΕΠΑΓΟΜΕΝΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

3.3.1. Λειτουργική δοκιμή οστεοκλαστογένεσης

Υπάρχουν τέσσερα είδη κυττάρων στα οστά: τα οστεοπρογονικά κύτταρα, οι οστεοβλάστες, τα οστεοκύτταρα και οι οστεοκλάστες. Τα οστεοπρογονικά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα κύτταρα που μπορούν να εξελιχθούν σε οστεοβλάστες, που είναι υπεύθυνοι για την σύνθεση οστίτη ιστού και κάποια στιγμή παγιδεύονται μέσα στο οστόν σχηματίζοντας τα οστεοκύτταρα. Οι οστεοκλάστες είναι τα κύτταρα που αποδομούν τον οστίτη ιστό. Προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα μυελικής προέλευσης, τα οποία μεταναστεύουν στα οστά υπό την δράση της πρωτεΐνης M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) και διαφοροποιούνται σε οστεοκλάστες μέσω της πρωτεΐνης RANKL (Teitelbaum et al., 2000).

Για την απομόνωση των πρόδρομων κυττάρων από τα οποία προέρχονται οι ώριμοι οστεοκλάστες, αφαιρείται ο μυελός των οστών από το μηριαίο και το κνημιαίο οστόν ενήλικων αρσενικών ποντικών ηλικίας 2-3 μηνών και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση πυκνότητας σε κλάσμα φικόλης (Ficoll-Paque). Η φικόλη έχει μικρότερη πυκνότητα από τα ερυθροκύτταρα και τα πολυμορφοπύρηνα ουδετερόφιλα, τα οποία κατά τη φυγοκέντρηση διαπερνούν την φάση της φικόλης και σχηματίζουν ίζημα στον πυθμένα. Αντίθετα, τα μονοπύρηνα κύτταρα «παγιδεύονται» στην ενδιάμεση φάση ανάμεσα στην φικόλη που έχει μεγαλύτερη πυκνότητα και το θρεπτικό μέσο που έχει μικρότερη (Katz et al., 1980). Για την διαφοροποίησή τους σε οστεοκλάστες επωάζονται παρουσία M-CSF και RANKL σε θρεπτικό υλικό α -MEM για 5 ημέρες σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας.

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των οστεοκλαστών είναι η παραγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών κατά την διαφοροποίησή τους. Μία από τις πιο γνωστές πρωτεΐνες είναι η όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό (tartrate resistant acid phosphatase-TRAP) που εκφράζεται από τους διαφοροποιημένους οστεοκλάστες. Η όξινη φωσφατάση καταλύει την υδρόλυση της φωσφορικής α-ναφθόλης απελευθερώνοντας την α-ναφθόλη και φωσφορικό. Η α-ναφθόλη που απελευθερώνεται από την ενζυμική δραστηριότητα ενώνεται με το άλας GBC (2-Methyl-4-([2-methylphenyl]azo)benzenediazonium άλας) δημιουργώντας αδιάλυτες αποθέσεις πορφυρής χρωστικής στα σημεία δραστηριότητας. Στο εργαστήριο για τον εντοπισμό οστεοκλαστών στο τέλος της κυτταροκαλλιέργειας, ύστερα από 6 μέρες επώασης των κυττάρων με τις πρωτεΐνες RANKL και M-CSF και το μόριο-αναστολέα, προστίθεται α-ναφθόλη, άλας GBC για την παραγωγή σήματος καθώς και τρυγικό για να ανασταλεί η δράση ισοενζύμων της TRAP πρωτεΐνης που είναι ευαίσθητα σε τρυγικό. Τα κύτταρα που παρατηρούνται ύστερα από τη χρώση (Εικόνα 3.2) είναι μεγάλου μεγέθους πολυπύρρηνοι οστεοκλάστες (αριθμός πυρήνων ≥ 3) που έχουν την ικανότητα να απορροφούν οστό (Ballanti et al., 1997).



Εικόνα 3.2: Η πρωτεΐνη RANKL είναι απαραίτητη για την διαφοροποίηση των ώριμων οστεοκλαστών. Με μωβ χρώμα εμφανίζονται τα σημεία όπου υπάρχει παραγωγή της πρωτεΐνης TRAP. Τα σημεία αυτά επικεντρώνονται κυρίως στους πυρήνες των ώριμων οστεοκλαστών, οι οποίοι μετά τη χρώση είναι ευδιάκριτοι. Στη φωτογραφία φαίνεται το αυξημένο μέγεθος των κυττάρων και η ύπαρξη πολλών πυρήνων σε αυτά, χαρακτηριστικά των ώριμων οστεοκλαστών.

3.3.2. Δοκιμή δραστηριότητας όξινης φωσφατάσης (TRAP)

Η δοκιμή αυτή δραστηριότητας επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση της δραστηριότητας της όξινης φωσφατάσης (TRAP) που σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των ώριμων οστεοκλαστών στην καλλιέργεια. Ύστερα από 5 μέρες καλλιέργεια πρόδρομων οστεοκλαστών, που έχουν απομονωθεί από τον μυελό των οστών ποντικών άγριου τύπου, παρουσία των πρωτεϊνών M-CSF και RANKL και το μόριο-αναστολέα προστίθεται φωσφορική α-ναφθόλη, οξικό νάτριο και τρυγικό. Η προσθήκη τρυγικού εξασφαλίζει την αποκλειστική δράση της TRAP πρωτεΐνης, που υδρολύει την φωσφορική α-ναφθόλη σε α-ναφθόλη η οποία ενώνεται στη συνέχεια με το οξικό νάτριο σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που απορροφά στα 405nm. Αύξηση της απορρόφησης σχετίζεται άμεσα με την δράση της TRAP πρωτεΐνης στο δείγμα (Ballanti et al., 1997).

Κάθε δείγμα, όμως, περιέχει διαφορετική ποσότητα κυττάρων στο τέλος της καλλιέργειας παρά το γεγονός ότι όλες οι δοκιμές ξεκίνησαν με ίδιο αριθμό κυττάρων, επομένως συνίσταται να μετρηθεί η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης και στη συνέχεια να συσχετισθεί με την πρωτεΐνη TRAP των δειγμάτων. Ο υπολογισμός του συνόλου των πρωτεϊνών στα δείγματα γίνεται με την μέθοδο Bradford. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται περιέχει την χρωστική Coomassie Brilliant Blue η οποία αλλάζει χρώμα (από καφέ γίνεται μπλε) όταν συνδέεται με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Το σύμπλοκο χρωστικής-πρωτεΐνης απορροφά στα 595nm και γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης μέσω πρότυπης καμπύλης από δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων (Bradford, 1976).

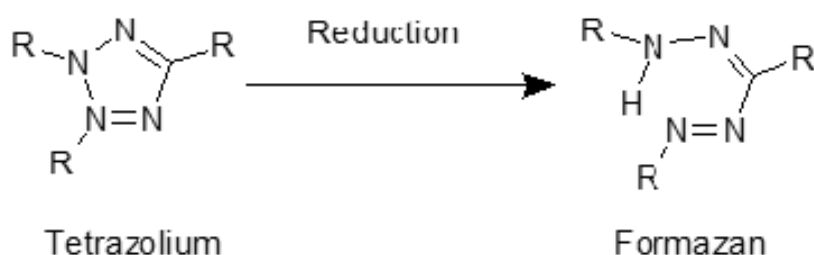
3.3.3. Αναστολή δοκιμής οστεοκλαστογένεσης

Το μόριο SPD-304, αναστέλλει την διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης πιθανόν λόγω αδυναμίας σχηματισμού λειτουργικών τριμερών (Douni et al., 2012) με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρόσδεσης του RANKL στον υποδοχέα RANK. Βασιζόμενοι σε αυτόν τον μηχανισμό, στα πειράματα για την αξιολόγηση των SPD-304 αναλόγων, έγινε προεπάση της πρωτεΐνης RANKL με διαφορετικές συγκεντρώσεις των αναλόγων για 1 ώρα πριν ξεκινήσει η δοκιμή οστεοκλαστογένεσης. Βασικό παράγοντα για την ομοιομορφία των αποτελεσμάτων αποτελεί η τελική συγκέντρωση του διαλύτη στα δείγματα, η οποία πρέπει να είναι σε

όλα ίδια. Ο διαλύτης που επιλέχθηκε είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide-DMSO) κυρίως λόγω της εξαιρετικής διαλυτικής του δράσης (Balakin et al., 2006), της υψηλής απορρόφησής του από ζωικά κύτταρα (Elfbaum et al., 1968) και της χαμηλής τοξικότητάς του (Klingman, 1965). Τα αρχικά δείγματα (stock 20mM αναλόγων σε 100% διαλύτη) αραιώθηκαν στις επιθυμητές συγκεντρώσεις οι οποίες είχαν τελική συγκέντρωση 0.1% DMSO. Η συγκέντρωση 0.1% του διαλύτη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, για να επιβεβαιωθεί πως η αναστολή της οστεοκλαστογένεσης οφείλεται στην δράση των μορίων και όχι του διαλύτη. Οι συγκεντρώσεις αναστολέα που χρησιμοποιήθηκαν κυμαίνονται από 0.1μM έως 20μM και εξαρτώνται από την δραστικότητα και την τοξικότητα του μορίου.

3.4 ΔΟΚΙΜΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ/ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ MTT (MTT TOXICITY ASSAY)

Το βασικότερο μειονέκτημα του μορίου SPD-304 ήταν η υψηλή τοξικότητά του, η οποία αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα στην χρήση του ως φάρμακο και την χορήγησή του σε ζωικούς οργανισμούς. Επομένως, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να ελεγχθεί η τοξικότητα των νέων SPD-304 αναλόγων που δημιουργήθηκαν. Η δοκιμή MTT (Microculture Tetrazolium Test) είναι μια μέθοδος μέτρησης της βιωσιμότητας των κυττάρων και χρησιμοποιείται ευρέως για δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας. Ύστερα από καλλιέργεια κυττάρων του μυελού των οστών για 3 μέρες παρουσία της πρωτεΐνης MCSF και του μορίου-αναστολέα (προ-οστεοκλάστες), προστίθεται στα κύτταρα το αντιδραστήριο MTT. Το αντιδραστήριο MTT (κίτρινο χρώμα) πρόκειται για ένα τετραζόλιο που διασπάται από όλα τα ζωντανά και μεταβολικά ενεργά μιτοχόνδρια των κυττάρων για να παραχθεί ένα μωβ προϊόν φορμαζάνης (Εικόνα 3.3). Η φορμαζάνη απορροφά στα 550nm και η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων στα δείγματα (Mosmann, 1983).

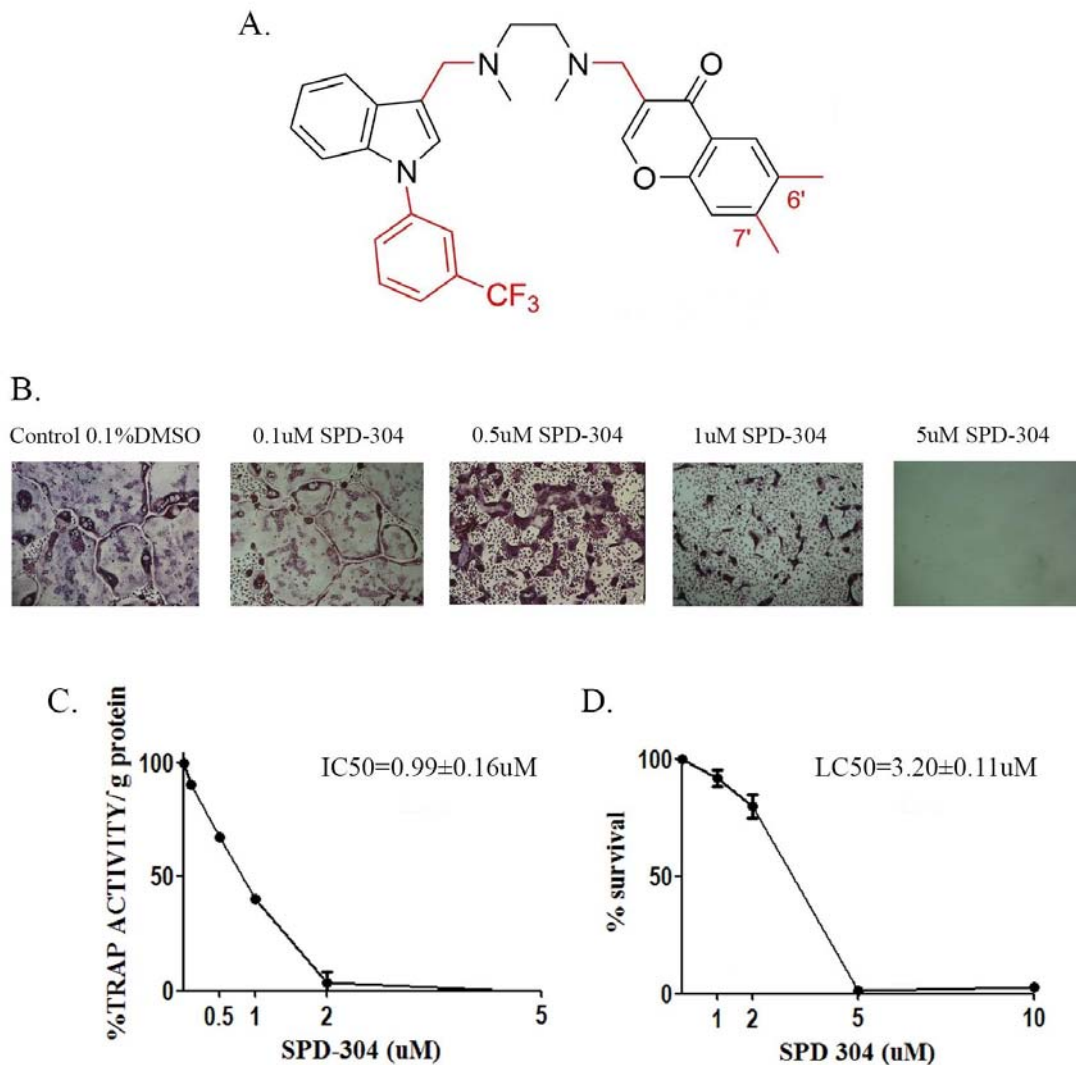


Εικόνα 3.3: Η αντίδραση αναγωγής του τετραζόλιου σε φορμαζάνη.

3.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ

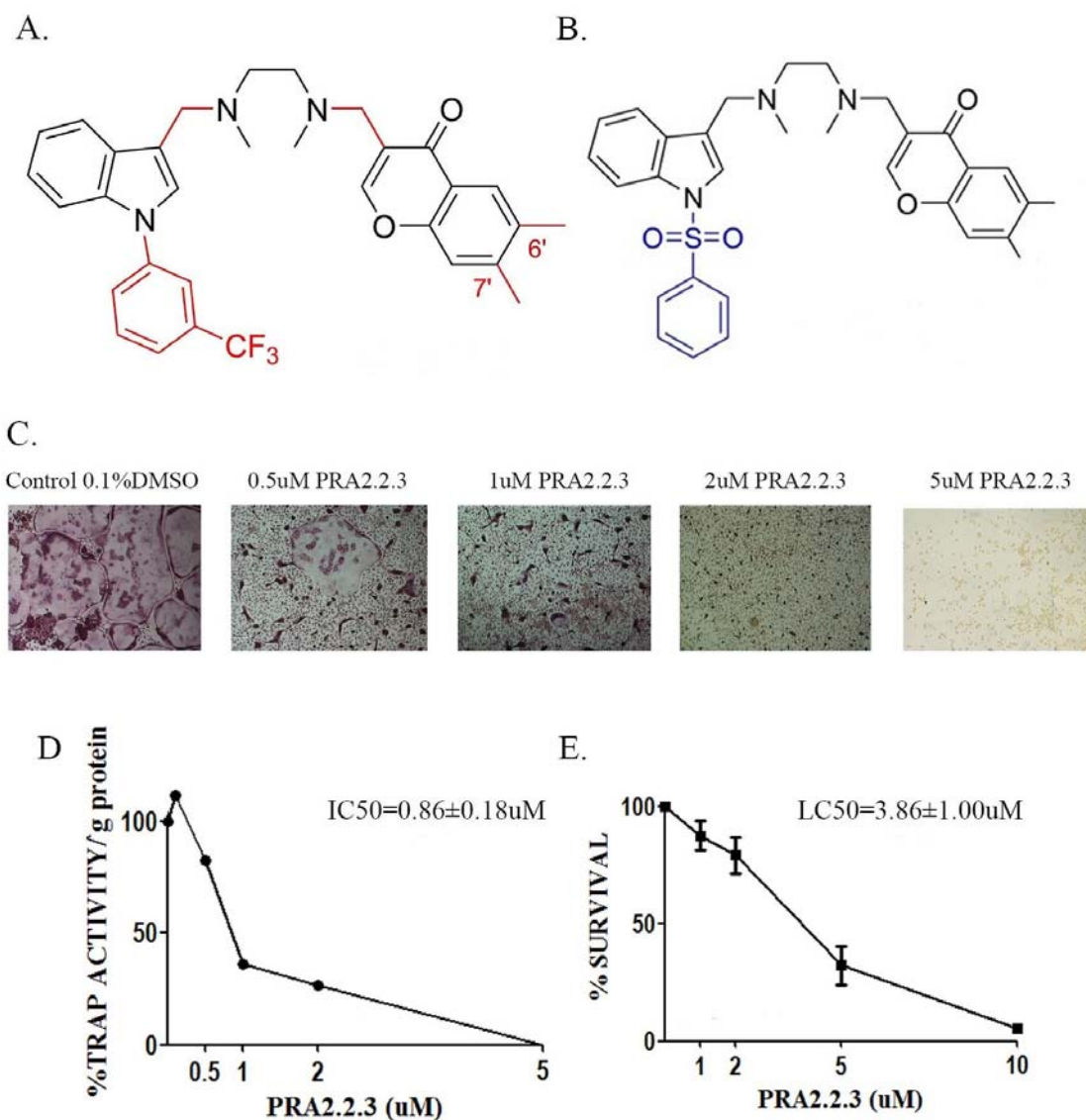
Η αρχική σύνθεση περιελάμβανε 72 νέα μόρια – ανάλογα του SPD-304 τα οποία ελέγχθησαν στο εργαστήριό μας ως προς την αναστολή της δράσης του ανθρώπινου RANKL με την δοκιμασία της οστεοκλαστογένεσης, σε συγκέντρωση 5μM. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση επιλέχθηκε με βάση την συμπεριφορά του SPD-304, το οποίο ανέστειλε την δημιουργία των ώριμων οστεοκλαστών σε μικρότερες συγκεντρώσεις ($IC_{50}=0.99 \pm 0.16 \mu M$) ενώ στη συγκέντρωση 5μM παρουσίαζε τοξικότητα ($LC_{50}=3.2 \pm 0.11 \mu M$) (Εικόνα 3.4).

Στην παρούσα μελέτη επικεντρωθήκαμε σε 9 μόρια (PRAs), τα οποία στη συγκέντρωση 5μM ανέστειλαν επαρκώς την δοκιμασία της οστεοκλαστογένεσης, και επέδειξαν μικρότερη τοξικότητα από το SPD-304. Τα μόρια αυτά αξιολογήθηκαν περαιτέρω με δοκιμασίες οστεοκλαστογένεσης και τοξικότητας, για να εντοπιστεί η κρίσιμη συγκέντρωση που προκαλεί την αναστολή της RANKL-επαγόμενης διαφοροποίησης στο 50% των πρόδρομων κυττάρων (IC_{50}) και στον θάνατο του 50% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού (LC_{50}).



Εικόνα 3.4: Η επίδραση του SPD-304 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. **(A)** Η δομή του SPD-304. **(B)** Αναστολή RANKL-επαγόμενης οστεοκλαστογένεσης σε συγκεντρώσεις από 0.1-5 μM . **(C)** Ποσοτική εκτίμηση της αναστολής της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις SPD-304 από 0.1-5 μM ($\text{IC}_{50}=0.99 \pm 0.16 \mu\text{M}$). **(D)** Ποσοτική εκτίμηση της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις SPD-304 από 1-10 μM ($\text{LC}_{50}=3.2 \pm 0.11 \mu\text{M}$). n= αριθμός πειραμάτων.

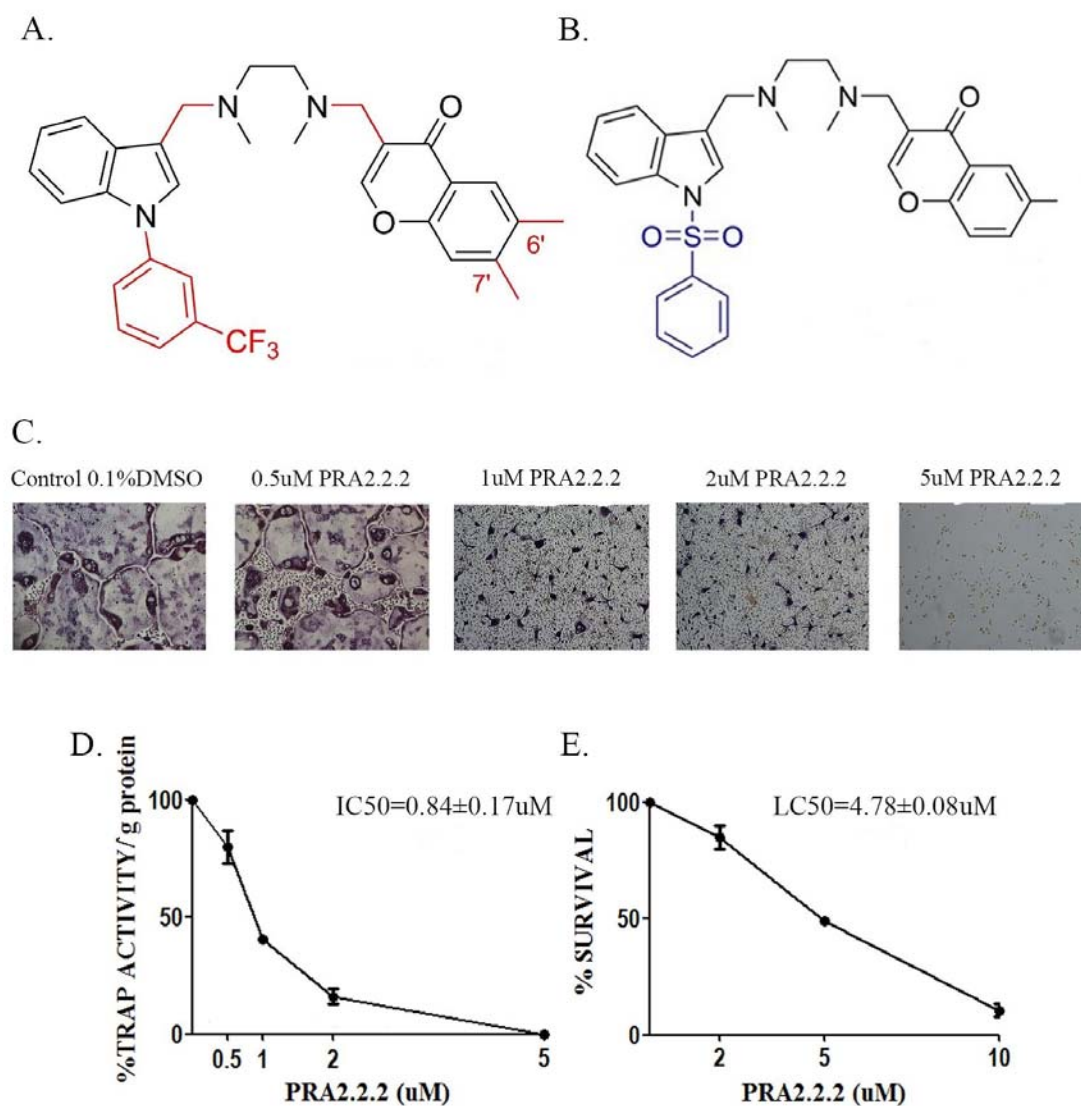
Σε όλα τα μόρια PRA2.2 αντικαταστάθηκε ο τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτύλιος με αρωματικό δακτύλιο και μία θειϊκή ομάδα (PhSO₂). Το μόριο PRA2.2.3 παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά με το SPD-304 τόσο στην αναστολή της RANKL-επαγόμενης



οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=0.86 \pm 0.18 \mu M$) όσο και στην τοξικότητα ($LC_{50}=3.86 \pm 1 \mu M$) (Εικόνα 3.5).

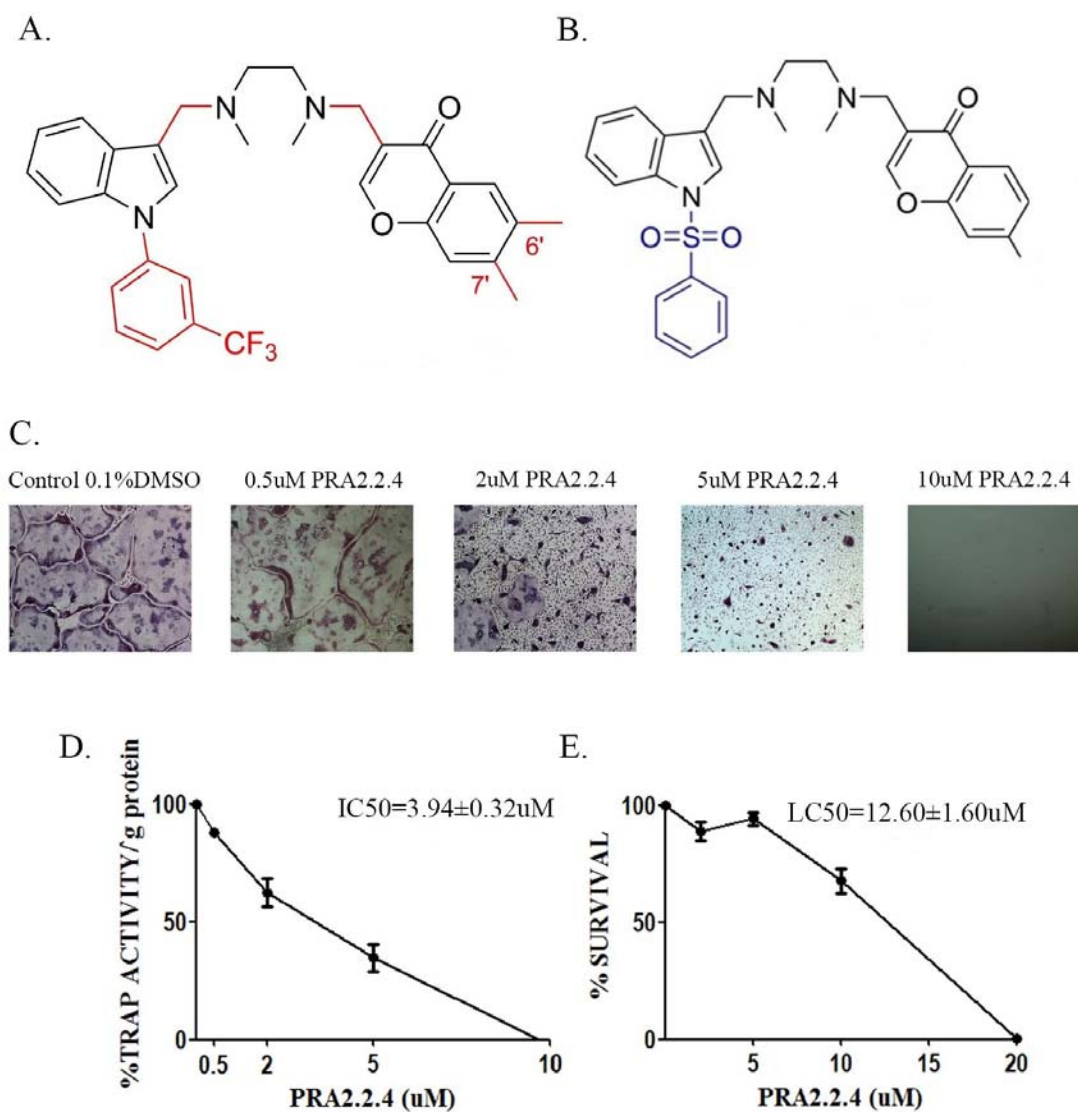
Εικόνα 3.5: Η επίδραση του μορίου PRA2.2.3 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. Σύγκριση του SPD-304 (A) με το μόριο PRA2.2.3 (B) όπου με χρώμα υποδεικνύονται οι τροποποιήσεις από το αρχικό μόριο. (C) Δοκιμασία οστεοκλαστογένεσης σε συγκεντρώσεις από 0.5-5 μM PRA2.2.3. (D) Ποσοτική εκτίμηση της αναστολής της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις PRA2.2.3 από 0.1-5 μM ($IC_{50}=3.86 \pm 1.00 \mu M$, n=2). (E) Ποσοτική εκτίμηση της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις PRA2.2.3 από 1-10 μM ($LC_{50}=3.86 \pm 1 \mu M$, n=2). n= αριθμός πειραμάτων.

Το μόριο PRA2.2.2 στο οποίο έχει απομακρυνθεί το 7' μεθύλιο της διμεθυλοχρωμόνης, επίσης παρουσίασε παρόμοια αναστολή της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=0.84 \pm 0.17 \mu M$) και τοξικότητα ($LC_{50}=4.78 \pm 0.08 \mu M$) με το SPD-304 (Εικόνα 3.6).



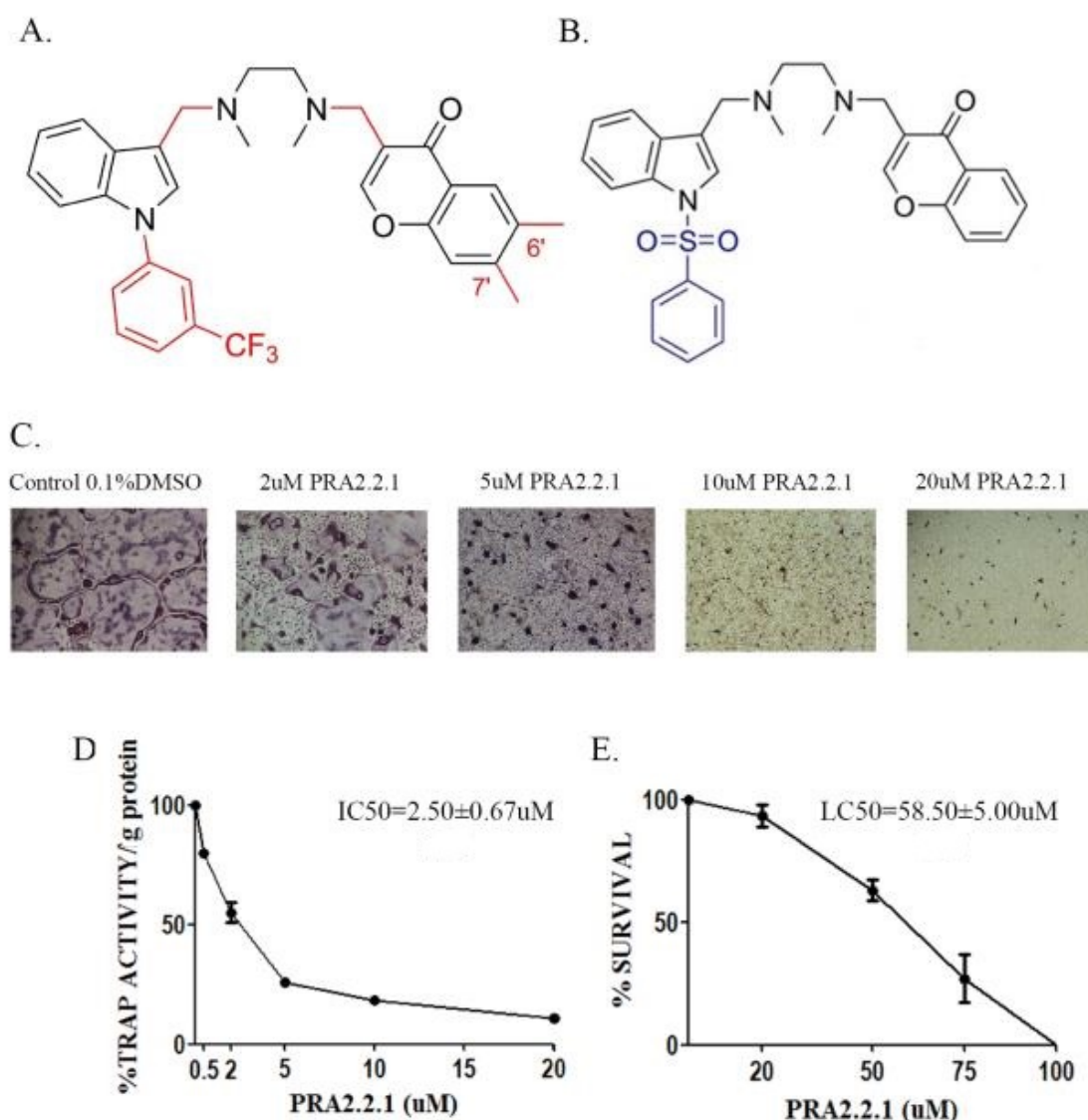
Εικόνα 3.6: Η επίδραση του μορίου PRA2.2.2 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. Σύγκριση του SPD-304 (A) με το μόριο PRA2.2.2 (B) όπου με χρώμα υποδεικνύονται οι τροποποιήσεις από το αρχικό μόριο. (C) Δοκιμασία οστεοκλαστογένεσης σε συγκεντρώσεις από 0.5-5 μM PRA2.2.2. (D) Ποσοτική εκτίμηση της αναστολής της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις PRA2.2.2 από 0.5-5 μM ($IC_{50}=0.84 \pm 0.17 \mu M$, $n=2$). (E) Ποσοτική εκτίμηση της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις PRA2.2.2 από 2-10 μM ($LC_{50}=4.78 \pm 0.08 \mu M$, $n=2$). n = αριθμός πειραμάτων.

Το μόριο PRA2.2.4 στο οποίο έχει απομακρυνθεί το 6' μεθύλιο της διμεθυλοχρωμόνης παρουσίασε μικρότερη αναστολή της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=3.94 \pm 0.32 \mu M$) αλλά και μικρότερη τοξικότητα ($LC_{50}=12.6 \pm 1.6 \mu M$) σε σχέση με το SPD-304 (Εικόνα 3.7).



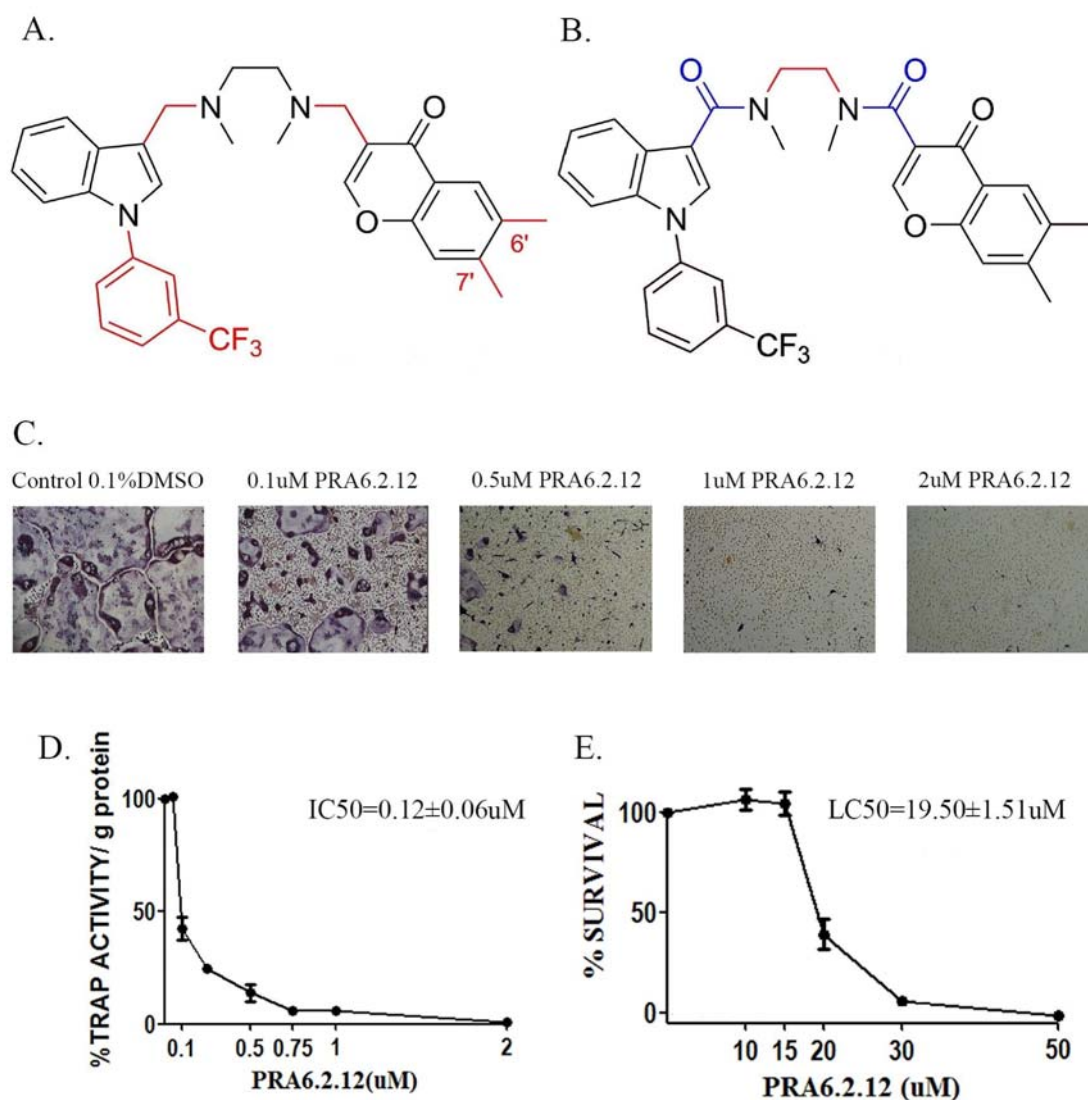
Εικόνα 3.7: Η επίδραση του μορίου PRA2.2.4 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. Σύγκριση του SPD-304 (A) με το μόριο PRA2.2.4 (B) όπου με χρώμα υποδεικνύονται οι τροποποιήσεις από το αρχικό μόριο. (C) Δοκιμασία οστεοκλαστογένεσης σε συγκεντρώσεις από 0.5-10 μM PRA2.2.4. (D) Ποσοτική εκτίμηση της αναστολής της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις PRA2.2.4 από 1-20 μM ($IC_{50}=3.94 \pm 0.32 \mu M$, $n=3$). (E) Ποσοτική εκτίμηση της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις PRA2.2.4 από 1-20 μM ($LC_{50}=12.6 \pm 1.6 \mu M$, $n=3$). n = αριθμός πειραμάτων.

Το μόριο PRA2.2.1 στο οποίο έχουν απομακρυνθεί και τα δύο μεθύλια της διμεθυλοχρωμόνης, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί παρουσίασε επίσης αναστολή της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=2.5 \pm 0.67 \mu M$) αλλά σαφώς μικρότερη τοξικότητα ($LC_{50}=58.5 \pm 5 \mu M$) σε σχέση με το SPD-304 (Εικόνα 3.8).



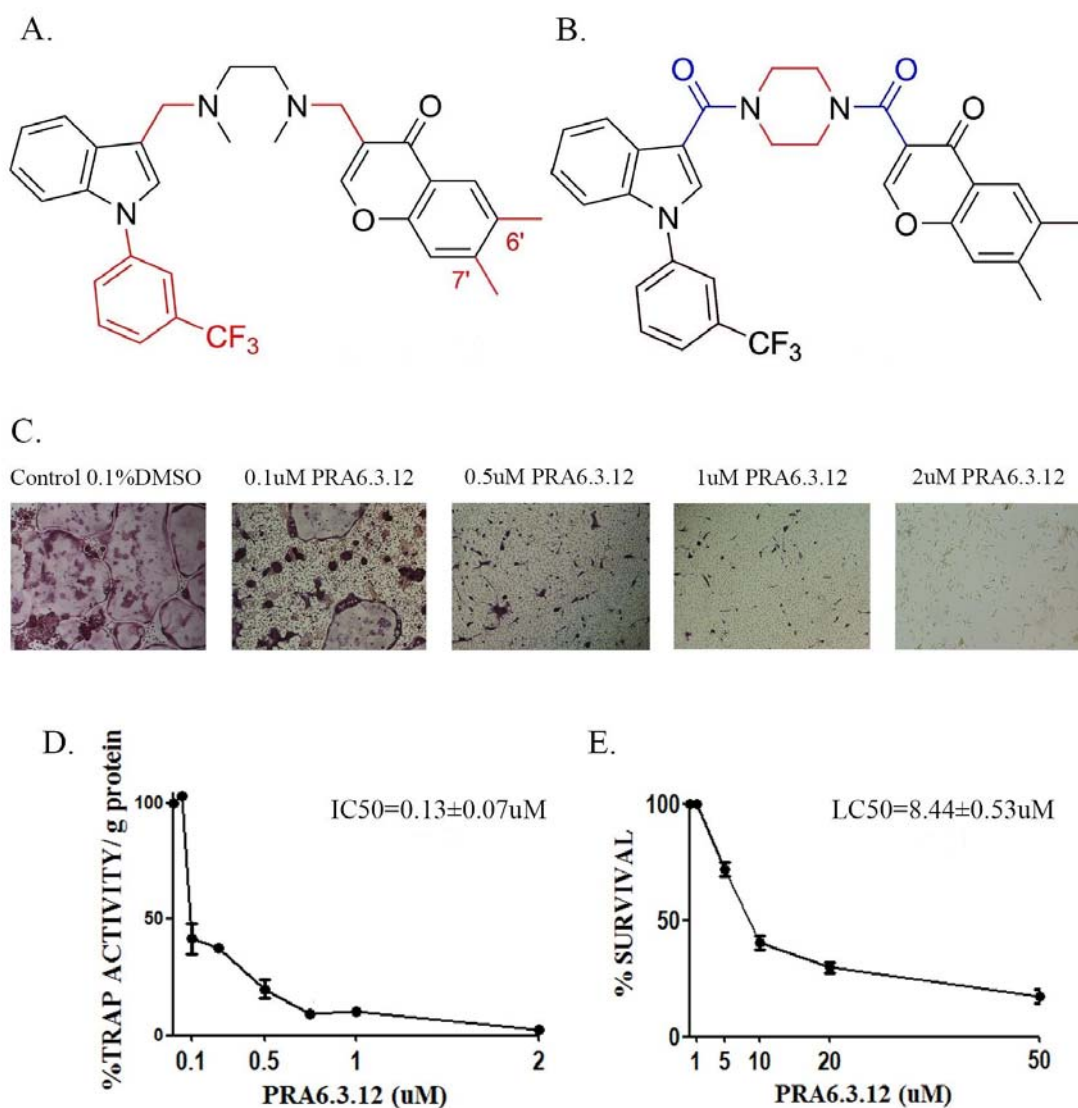
Εικόνα 3.8: Η επίδραση του μορίου PRA2.2.1 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. Σύγκριση του SPD-304 (A) με το μόριο PRA2.2.1 (B) όπου με χρώμα υποδεικνύονται οι τροποποιήσεις από το αρχικό μόριο. (C) Δοκιμασία οστεοκλαστογένεσης σε συγκεντρώσεις από 2-20 μM PRA2.2.1. (D) Ποσοτική εκτίμηση της αναστολής της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις PRA2.2.1 από 0.5-20 μM ($IC_{50}=2.5 \pm 0.67 \mu M$, $n=3$). (E) Ποσοτική εκτίμηση της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις PRA2.2.1 από 20-100 μM ($LC_{50}=58.5 \pm 5 \mu M$, $n=4$). n = αριθμός πειραμάτων.

Στο μόριο PRA6.2.12 έγινε τροποποίηση της διαμίνης του αρχικού μορίου με το αντίστοιχο διαμίδιο. Το μόριο αυτό παρουσίασε δραστική αναστολή της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=0.12 \pm 0.06 \mu M$) και μικρότερη τοξικότητα ($LC_{50}=19.5 \pm 1.51 \mu M$) σε σχέση με το SPD-304 (Εικόνα 3.9).



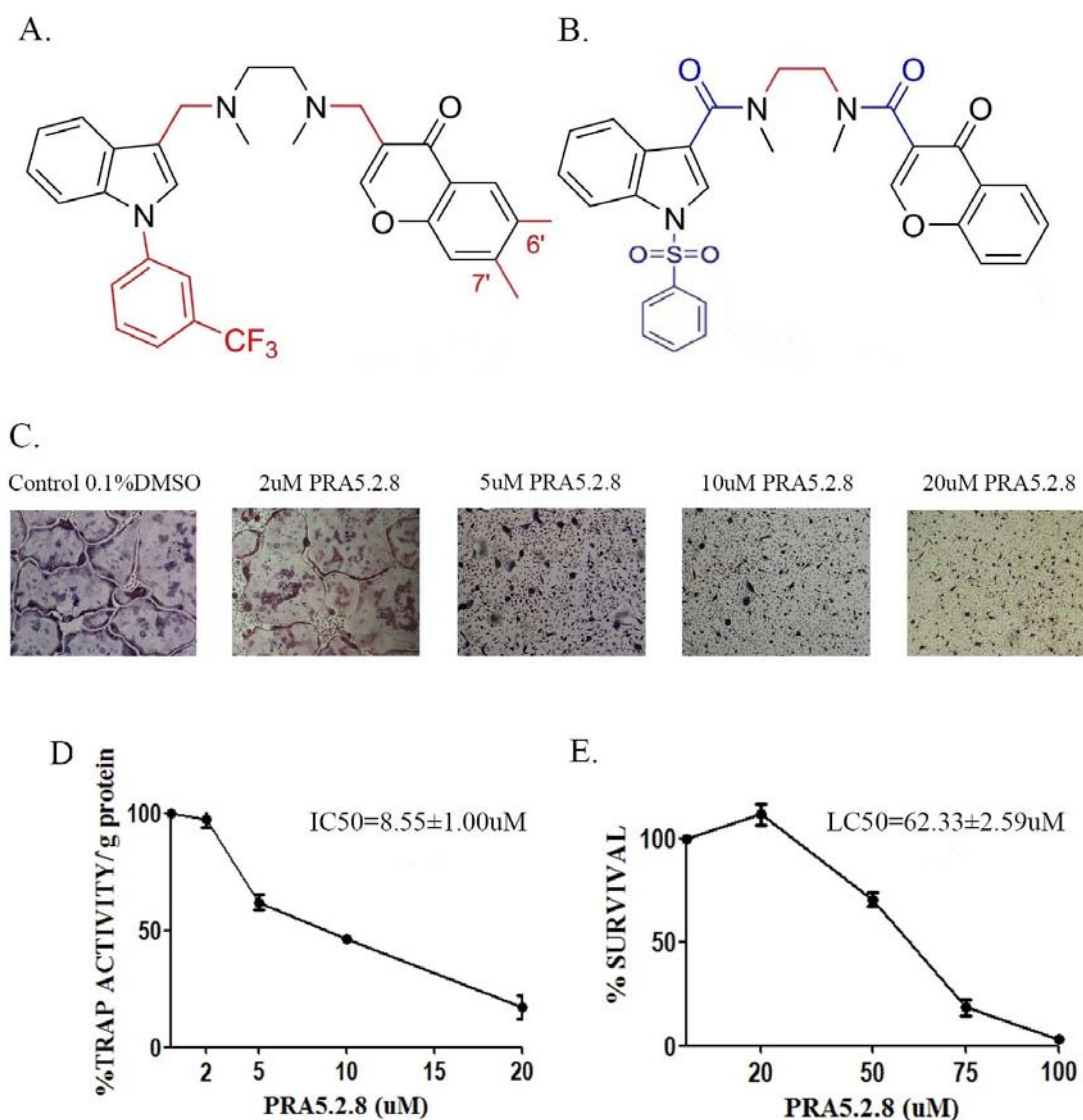
Εικόνα 3.9: Η επίδραση του μορίου PRA6.2.12 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. Σύγκριση του SPD-304 (A) με το μόριο PRA6.2.12 (B) όπου με χρώμα υποδεικνύονται οι τροποποιήσεις από το αρχικό μόριο. (C) Δοκιμασία οστεοκλαστογένεσης σε συγκεντρώσεις από 0.1-5 μM PRA6.2.12. (D) Ποσοτική εκτίμηση της αναστολής της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις PRA6.2.12 από 0.1-2 μM ($IC_{50}=0.12 \pm 0.06 \mu M$, $n=4$). (E) Ποσοτική εκτίμηση της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις PRA6.2.12 από 10-50 μM ($LC_{50}=19.5 \pm 1.51 \mu M$, $n=3$). n = αριθμός πειραμάτων.

Το μόριο PRA6.3.12, στο οποίο έγινε τροποποίηση της διαμίνης στο 1-4-πιπεραζινυλόνιο, παρουσίασε όπως το PRA6.2.12 δραστική αναστολή της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=0.13 \pm 0.07 \mu M$) και μειωμένη τοξικότητα ($LC_{50}=8.44 \pm 0.53 \mu M$) σε σχέση με το SPD-304 (Εικόνα 3.10).



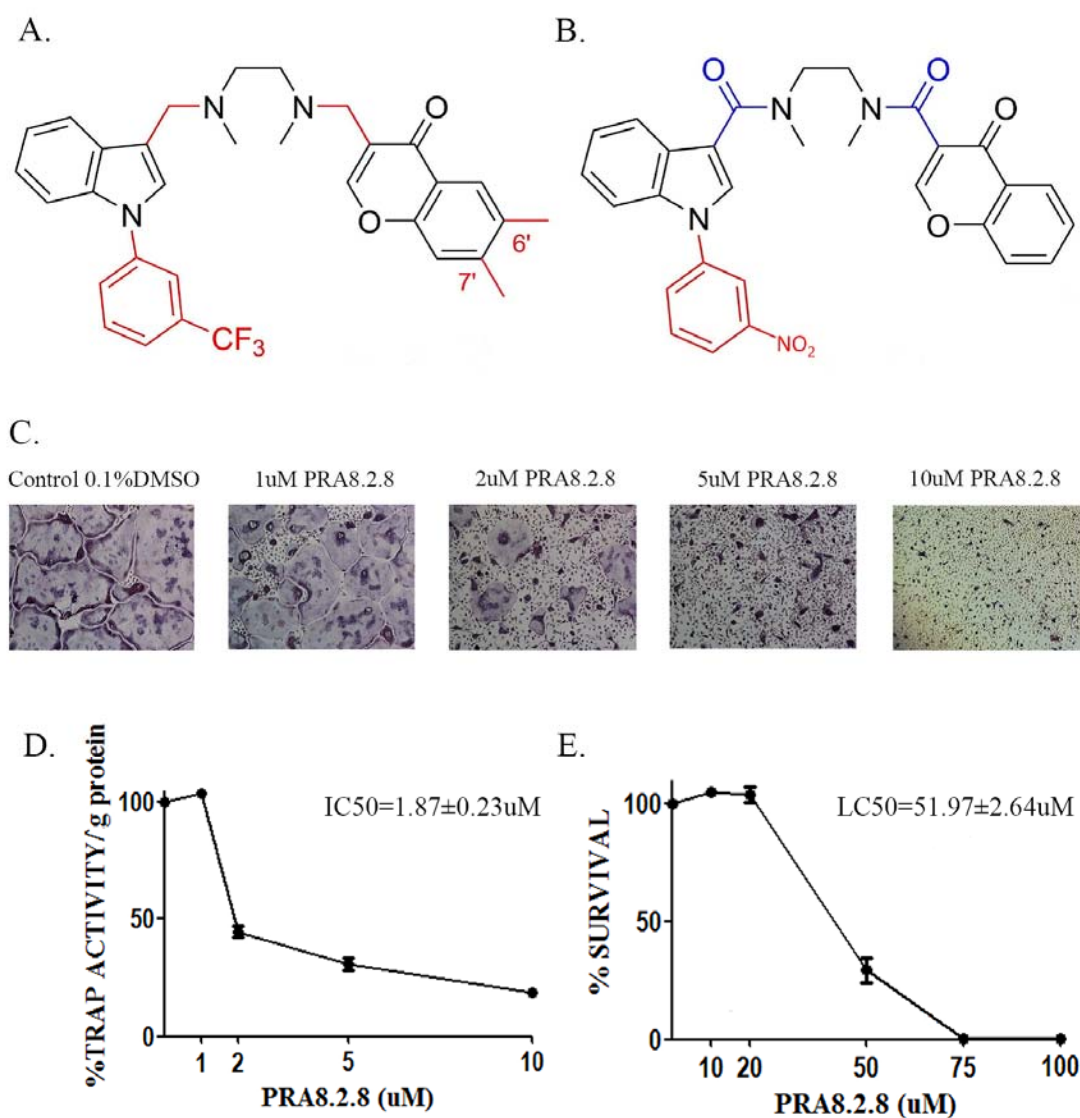
Εικόνα 3.10: Η επίδραση του μορίου PRA6.3.12 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. Σύγκριση του SPD-304 (A) με το μόριο PRA6.3.12 (B) όπου με χρώμα υποδεικνύονται οι τροποποιήσεις από το αρχικό μόριο. (C) Δοκιμασία οστεοκλαστογένεσης σε συγκεντρώσεις από 0.1-2 μM PRA6.3.12. (D) Ποσοτική εκτίμηση της αναστολής της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις PRA6.3.12 από 0.05-2 μM ($IC_{50}=0.13 \pm 0.07 \mu M$, $n=3$). (E) Ποσοτική εκτίμηση της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις PRA6.3.12 από 1-50 μM ($LC_{50}=8.44 \pm 0.53 \mu M$, $n=3$). n = αριθμός πειραμάτων.

Το μόριο PRA5.2.8, το οποίο περιέχει τις αλλαγές των PRA2.2.1 και PRA6.2.12, παρουσίασε μικρότερη αναστολή της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=8.55 \pm 1 \mu M$) αλλά σαφώς μικρότερη τοξικότητα ($LC_{50}=62.33 \pm 2.59 \mu M$) σε σχέση με το SPD-304 (Εικόνα 3.11).



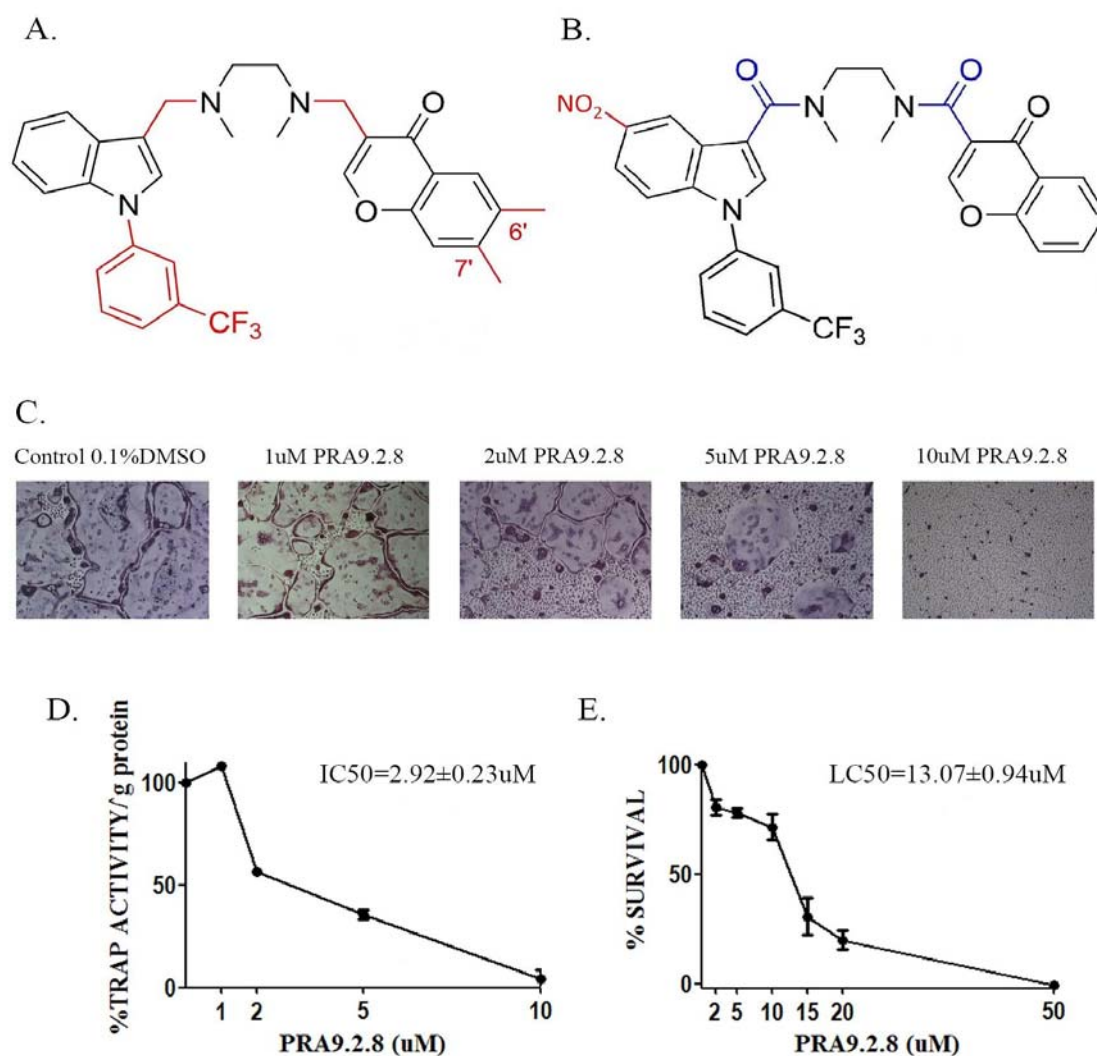
Εικόνα 3.11: Η επίδραση του μορίου PRA5.2.8 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. Σύγκριση του SPD-304 (A) με το μόριο PRA5.2.8 (B) όπου με χρώμα υποδεικνύονται οι τροποποιήσεις από το αρχικό μόριο. (C) Δοκιμασία οστεοκλαστογένεσης σε συγκεντρώσεις από 2-20 μM PRA5.2.8 (D) Ποσοτική εκτίμηση της αναστολής της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις PRA5.2.8 από 2-20 μM ($IC_{50}=8.55 \pm 1 \mu M$, $n=3$). (E) Ποσοτική εκτίμηση της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις PRA5.2.8 από 20-100 μM ($LC_{50}=62.33 \pm 2.59 \mu M$, $n=3$). n = αριθμός πειραμάτων.

Αντίστοιχα, στο μόριο PRA8.2.8 έχει αντικατασταθεί η διαμίνη στο αντίστοιχο διαμίδιο, το τριφθορομεθύλιο με μία αζωτούχα ομάδα (NO₂) και έχουν απομακρυνθεί τα μεθύλια της διμεθυλοχρωμόνης. Το μόριο αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί παρουσίασε επίσης σημαντική αναστολή της οστεοκλαστογένεσης (IC₅₀=1.87 ± 0.23 μM) αλλά σαφώς μικρότερη τοξικότητα (LC₅₀=51.97 ± 2.64 μM) σε σχέση με το SPD-304 (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12: Η επίδραση του μορίου PRA8.2.8 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. Σύγκριση του SPD-304 (A) με το μόριο PRA8.2.8 (B) όπου με χρώμα υποδεικνύονται οι τροποποιήσεις από το αρχικό μόριο. (C) Δοκιμασία οστεοκλαστογένεσης σε συγκεντρώσεις από 1-10 μM PRA8.2.8. (D) Ποσοτική εκτίμηση της αναστολής της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις PRA8.2.8 από 1-10 μM (IC₅₀=1.87 ± 0.23 μM, n=4). (E) Ποσοτική εκτίμηση της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις PRA8.2.8 από 10-100 μM (LC₅₀=51.97 ± 2.64 μM, n=4). n= αριθμός πειραμάτων

Τέλος, στο μόριο PRA9.2.8 έχει αντικατασταθεί η διαμίνη στο αντίστοιχο διαμίδιο, έχουν απομακρυνθεί τα μεθύλια της διμεθυλοχρωμόνης και έχει προστεθεί μία αζωτούχα ομάδα στον ινδολικό δακτύλιο. Το μόριο αυτό εμφανίζει, επίσης, αναστολή της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=2.92 \pm 0.23 \mu M$), μικρότερη τοξικότητα ($LC_{50}=13.07 \pm 0.94 \mu M$) σε σχέση με το SPD-304 αλλά μεγαλύτερη σε σχέση με άλλα ανάλογα όπως το PRA8.2.8 (Εικόνα 3.13).



Εικόνα 3.13: Η επίδραση του μορίου PRA9.2.8 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. Σύγκριση του SPD-304 (A) με το μόριο PRA9.2.8 (B) όπου με χρώμα υποδεικνύονται οι τροποποιήσεις από το αρχικό μόριο. (C) Δοκιμασία οστεοκλαστογένεσης σε συγκεντρώσεις από 1-10 μM PRA9.2.8. (D) Ποσοτική εκτίμηση της αναστολής της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις PRA9.2.8 από 1-10 μM ($IC_{50}=2.92 \pm 0.23 \mu M$, $n=3$). (E) Ποσοτική εκτίμηση της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις PRA9.2.8 από 2-50 μM ($LC_{50}=13.07 \pm 0.94 \mu M$, $n=3$). n = αριθμός πειραμάτων.

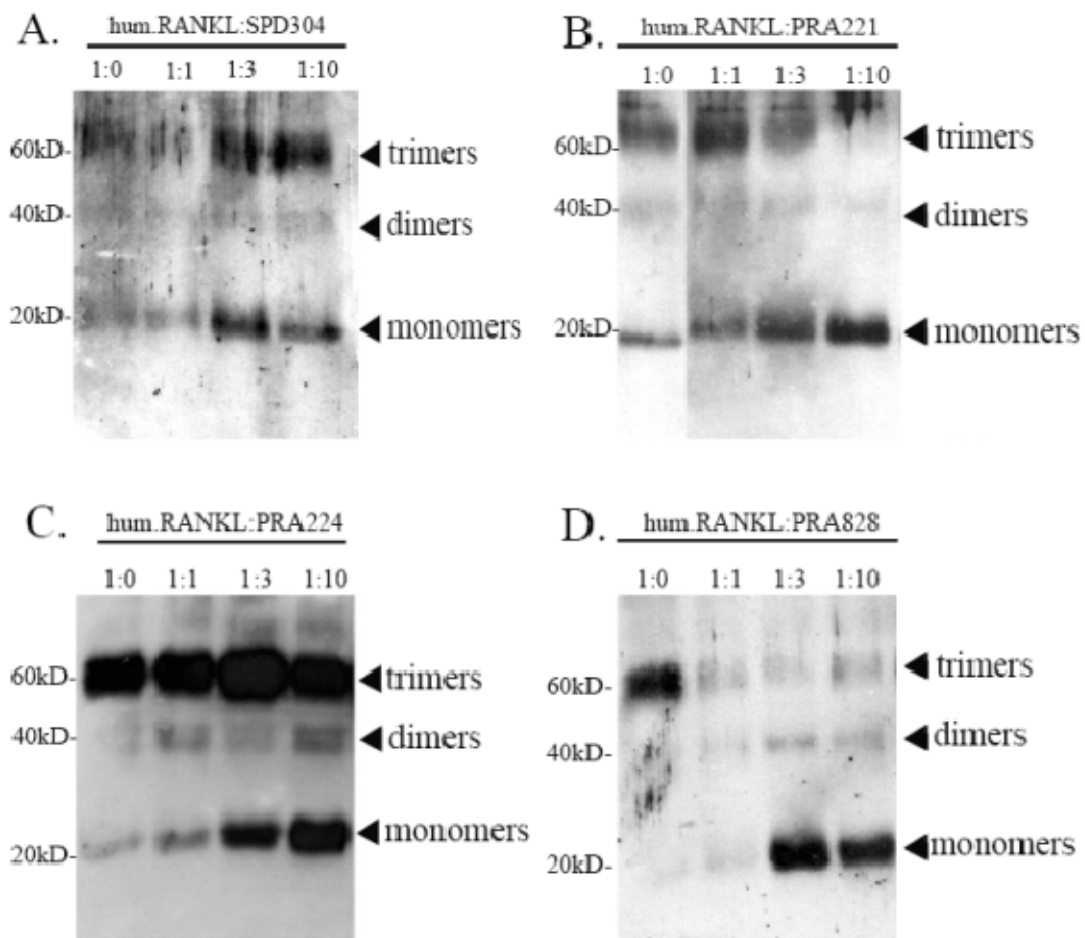
3.6 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΩΝ SPD-304 ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Το μόριο SPD-304 προβλέπεται να προσδένεται στην πρωτεΐνη RANKL προκαλώντας την απελευθέρωση μονομερών από τα τριμερή καθιστώντας την ανίκανη να προσδεθεί στον υποδοχέα RANK και να ενεργοποιήσει το μονοπάτι για την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Douni et al., 2012). Για να ανιχνεύσουμε τον μηχανισμό με τον οποίο αναστέλλουν την οστεοκλαστογένεση τα SPD-304 ανάλογα χρησιμοποιήσαμε διασταυρούμενη σύνδεση (cross-linking) για να σταθεροποιήσουμε τις δομές του συμπλόκου πρωτεΐνης-αναλόγων.

Κατά τη διαδικασία αυτή, τα πρωτεϊνικά δείγματα προεπωάζονται με τους αναστολείς και στη συνέχεια προστίθεται disuccinimidyl suberate (DSS) επιτυγχάνοντας έτσι τη σταθεροποίηση της δομής της πρωτεΐνης με τον αναστολέα και αποτροπή αποδιάταξής τους παρουσία του απορρυπαντικού SDS κατά την ηλεκτροφόρηση τους στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ύστερα από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων έγινε ανίχνευση των πρωτεϊνών με ανάλυση ανοσοαποτυπώματος κατά Western χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα ειδικό για την RANKL πρωτεΐνη του ανθρώπου (Staros, 1982).

Η ποσότητα των μορίων που προστέθηκε σε κάθε αντίδραση, υπολογίστηκε με βάση τα μόρια πρωτεΐνης ώστε να αντιστοιχεί ένα μόριο πρωτεΐνης σε ένα μόριο-αναστολέα (αναλογία 1:1), ένα μόριο πρωτεΐνης σε τρία μόρια-αναστολέα (αναλογία 1:3) και ένα μόριο πρωτεΐνης σε δέκα μόρια-αναστολέα (1:10). Για τον έλεγχο της ικανότητας της πρωτεΐνης να σχηματίζει, φυσιολογικά, τριμερή, χρησιμοποιήθηκε αντίδραση χωρίς μόριο-αναστολέα (αναλογία 1:0).

Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν (Εικόνα 3.14), όταν η πρωτεΐνη RANKL δεν επωαζόταν με κάποιο μόριο-αναστολέα (αναλογία 1:0), στο ανοσοαποτύπωμα εμφανιζόταν μία έντονη ζώνη στο μοριακό βάρος 60kD, η οποία αντιστοιχεί στο τριμερές της πρωτεΐνης. Όταν προστίθεται στην αντίδραση το μόριο-αναστολέας (αναλογίες 1:1-10), παρατηρείται μία αύξηση της έντασης της ζώνης στο μοριακό βάρος 20kD η οποία μάλιστα γίνεται εντονότερη όσο αυξάνεται η ποσότητα του μορίου. Τα μόρια που βρίσκονται στο μοριακό βάρος των 20kD, αντιστοιχούν στα μονομερή της πρωτεΐνης (Εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.14: Επίδραση του SPD-304 και των αναλόγων του PRA2.2.1, PRA2.2.4, PRA8.2.8 στην απελευθέρωση μονομερών. Πειράματα cross-linking και western blot μεταξύ ανθρώπινου RANKL και SPD-304 (A), PRA2.2.1 (B), PRA2.2.4 (C) και PRA8.2.8 (D). Οι αναλογίες αναφέρονται στα μόρια πρωτεΐνης προς τα μόρια αναστολέα. Σημειώνονται τα μοριακά βάρη και τα τριμερή (trimers), διμερή (dimers) και μονομερή (monomers).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αυξημένα επίπεδα RANKL εντοπίζεται σε ασθενείς που πάσχουν από οστεοπόρωση και τα τελευταία χρόνια οι προσπάθειες για την καταπολέμησή της στρέφονται στην αναστολή της πρωτεΐνης αυτής (Bekker et al., 2001). Αποκορύφωμα των προσπαθειών αυτών ήταν η δημιουργία του φαρμακευτικού σκευάσματος Prolia, το οποίο περιέχει ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει και προσδένεται ειδικά στην πρωτεΐνη RANKL, το denosumab, εμποδίζοντας την σύνδεσή της στον υποδοχέα RANK (Bekker et al., 2004). Σε μελέτες που έγιναν στην φάση II της αξιολόγησης του αντισώματος ως φαρμάκου, τα αποτελέσματα στον έλεγχο και την θεραπεία της οστεοπόρωσης, κυρίως σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, αποδεικνύουν την επιστροφή των δεικτών οστικής μάζας σε φυσιολογικά επίπεδα (Lewiecki et al., 2007). Η μελέτη του denosumab συνεχίστηκε για να αξιολογηθεί η μακροχρόνια δραστηριότητα και ασφάλειά του. Τα αποτελέσματα που δημοσιεύθηκαν αφορούν την χρήση του φαρμάκου για 6 χρόνια και υποδεικνύουν διατήρηση του δείκτη μείωσης της οστικής απορρόφησης, αύξηση της πυκνότητας των οστών και μείωση του κινδύνου κατάγματος χωρίς αύξηση της συχνότητας εμφάνισης παρενεργειών (Bone et al., 2013).

Παρά τα πολύ θετικά αποτελέσματα, ανησυχία προκαλεί η μακροχρόνια χρήση του καθώς πρόκειται για αντίσωμα το οποίο μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ανοσολογικές αποκρίσεις (Miller et al., 2011). Πέρα από αυτό βέβαια, το denosumab, ως αντίσωμα δεν μπορεί να εισέλθει σε όργανα όπως ο εγκέφαλος, όπου η έκφραση της πρωτεΐνης είναι υψηλή (Rinotas et al., 2013). Επίσης, η πρωτεΐνη RANKL παίζει ουσιώδη ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και πλήρη αναστολή της από το denosumab μπορεί να οδηγήσει σε αυτοάνοσα νοσήματα.

Το 2005 ανακαλύφθηκε ένα μικρό μόριο, το SPD-304, που είχε την ικανότητα να διασπά τα τριμερή της πρωτεΐνης TNF, αναστέλλοντας την δράση της. Το SPD-304 δρα απομακρύνοντας μία από τις υπομονάδες του τριμερούς, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με το «ανενεργό» διμερές. Λόγω της υψηλής δομικής ομοιότητας των πρωτεϊνών της TNF υπεροικογένειας, ελέγχθηκε η δράση του SPD-304 στην αναστολή του RANKL. Πράγματι, ύστερα από μελέτη που πραγματοποιήθηκε από

την Δρ. Ντούνη και την ερευνητική της ομάδα αποδείχθηκε πως το SPD-304 μπορεί να αναστείλει την δράση της πρωτεΐνης RANKL, που συμμετέχει στο μονοπάτι της διαφοροποίησης, ωρίμανσης και επιβίωσης των οστεοκλαστών (Douni et al., 2012). Το μικρό μόριο SPD-304 έχει την ικανότητα να δεσμεύει την πρωτεΐνη RANKL ($K_d=8.4$) και να αναστέλλει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών ($IC_{50}=0.99\pm 0.16M$) αλλά παρουσίασε υψηλή τοξικότητα ($LC_{50}=3.20\pm 0.11\mu M$) (Εικόνα 3.4). Δυστυχώς, το μόριο αυτό δεν μπόρεσε να αξιοποιηθεί περαιτέρω σε προκλινικές δοκιμές λόγω της υψηλής τοξικότητάς που εμφάνιζε σε *in vitro* πειράματα κυτταροκαλλιέργειας. Σε μία προσπάθεια αξιοποίησης της ιδιότητας που έχει το μόριο SPD-304 να αναστέλλει την δράση της πρωτεΐνης RANKL, σχεδιάστηκαν δομικά ανάλογά του τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα δέσμευσης της πρωτεΐνης, την δραστηριότητα και την τοξικότητα τους.

Αρχικά, έγινε τροποποίηση του τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτυλίου του μορίου SPD-304 σε αρωματικό δακτύλιο που περιέχει μία θειική ομάδα ως υποκαταστάτη (PRA2.2.3) (Εικόνα 3.5). Το καινούργιο μόριο εμφάνιζε εξίσου υψηλή τοξικότητα με το αρχικό ($LC_{50}= 3.86\pm 1.00\mu M$)) ενώ η αλλαγή δεν φαίνεται να ευνόησε την ικανότητα πρόσδεσής του στην πρωτεΐνη RANKL ($K_d= 8.7$) και την αναστολή της διαδικασίας της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=0.86\pm 0.18\mu M$) (Πίνακας 4.1). Διατηρώντας την τροποποίηση του τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτυλίου, απομακρύνθηκαν τα μεθύλια της διμεθυλοχρωμόνης. Η απομάκρυνση του 7' μεθυλίου (PRA2.2.2) (Εικόνα 3.6) δεν βελτίωσε ούτε την τοξικότητα του μορίου ($LC_{50}= 4.78\pm 0.08\mu M$), ούτε την ικανότητα πρόσδεσής του στην πρωτεΐνη ($K_d=6.2$) και την αναστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών ($IC_{50}=0.84\pm 0.17\mu M$), ενώ η απομάκρυνση του 6' μεθυλίου (PRA2.2.4) (Εικόνα 3.7) μείωσε λίγο την τοξικότητα του μορίου ($LC_{50}= 12.60\pm 1.60\mu M$) και την ικανότητα να αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση ($IC_{50}=3.94\pm 0.32\mu M$), ενώ αύξησε την ικανότητα πρόσδεσής του στην πρωτεΐνη ($K_d=4.9$). (Πίνακας 4.1). Τέλος, η απομάκρυνση και των δύο μεθυλίων (PRA2.2.1) της διμεθυλοχρωμόνης (Εικόνα 3.8), είχε ως αποτέλεσμα το μόριο να έχει πολύ μικρότερη τοξικότητα ($LC_{50}= 58.50\pm 5.00\mu M$), λίγο χαμηλότερη δραστηριότητα στην αναστολή της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=2.5\pm 0.67\mu M$) και αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης στην πρωτεΐνη ($K_d=5.24$) συγκριτικά με το αρχικό μόριο. Επομένως, η απομάκρυνση και των δύο μεθυλίων της χρωμόνης, είναι απαραίτητη για την μείωση της τοξικότητας των αναλόγων, ενώ η αλλαγή του

τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτυλίου στον αρωματικό δακτύλιο με υποκαταστάτη τη θειική ομάδα δεν φαίνεται να παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην βελτίωση των ιδιοτήτων των αναλόγων (Πίνακας 4.1).

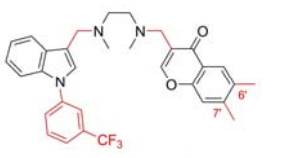
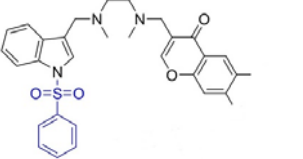
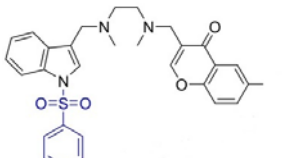
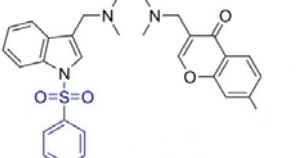
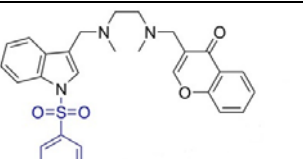
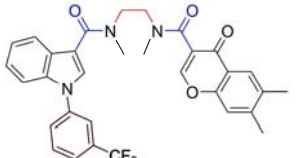

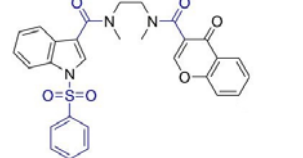
Στη συνέχεια, αντικαταστάθηκε η διαμίνη που υπάρχει στο SPD-304 με το αντίστοιχο διαμίδιο (PRA6.2.12) (Εικόνα 3.9) και 1-4-πιπεραζινυλόνιο (PRA6.3.12) (Εικόνα 3.10). Το μόριο 6.2.12 παρουσιάζει πολύ μικρότερη τοξικότητα ($LC_{50}=19.50\pm 1.51\mu M$), συγκριτικά με το αρχικό μόριο SPD-304 ($LC_{50}=3.20\pm 0.11\mu M$). Η τοξικότητα του μορίου 6.3.12 μειώθηκε σχετικά ($LC_{50}=8.44\pm 0.53\mu M$) με το SPD-304, παρέμεινε όμως σε υψηλά επίπεδα. Ωστόσο, οι τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο μόριο 6.2.12 μείωσαν την ικανότητα πρόσδεσης του στην πρωτεΐνη RANKL ($K_d=20.82$) κάτι που δεν συμφωνεί με την δραματική αναστολή που επιφέρει σε RANKL λειτουργικές δοκιμές οστεοκλαστογένεσης και χρειάζεται περαιτέρω επιβεβαίωση και ανάλυση. Τροποποιήσεις στο μόριο 6.3.12 αύξησαν την ικανότητα του να προσδένεται σε αυτήν ($K_d=4.6$) (Πίνακας 4.1). Και τα δύο μόρια ανέστειλαν την διαδικασία της οστεοκλαστογένεσης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (6.2.12: $IC_{50}=0.12\pm 0.06\mu M$, 6.3.12: $IC_{50}=0.13\pm 0.07\mu M$), συγκριτικά με το μόριο SPD-304 ($IC_{50}=0.99\pm 0.16\mu M$). Επομένως, προτιμήθηκε η αλλαγή της διαμίνης σε διαμίδιο καθώς το κύριο πρόβλημα των μορίων είναι η τοξικότητά τους. Αξίζει να σημειωθεί πως τα μόρια PRA6.2.12 και PRA6.3.12 είναι τα πιο δραστικά από όσα δοκιμάστηκαν, υποδεικνύοντας πως η διαμίνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη σύνδεση των μορίων με το υπόστρωμα.

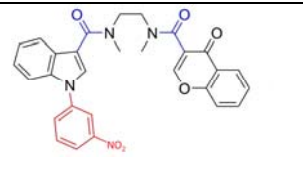
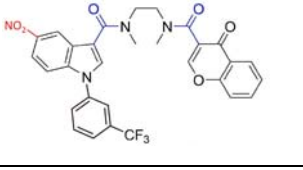
Έχοντας υπόψη τις τροποποιήσεις των προηγούμενων μορίων οι οποίες είχαν ένα θετικό αποτέλεσμα στις ιδιότητες των αναλόγων, σχεδιάστηκε ένα νέο μόριο (PRA5.2.8) στο οποίο αντικαταστάθηκε η διαμίνη με το διαμίδιο (Εικόνα 3.11), ο τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτύλιος αντικαταστάθηκε με τον αρωματικό δακτύλιο και απομακρύνθηκαν τα μεθύλια από την διμεθυλοχρωμόνη. Το μόριο αυτό εμφάνισε εξαιρετικά χαμηλή τοξικότητα ($LC_{50}=62.33\pm 2.59\mu M$) συγκριτικά με το αρχικό μόριο ($LC_{50}=3.20\pm 0.11\mu M$). Η ικανότητα πρόσδεσης στην πρωτεΐνη βελτιώθηκε αρκετά ($K_d=4.6$) συγκριτικά με το μόριο SPD-304 ($K_d=8,4$) (Πίνακας 4.1). Δυστυχώς, οι αλλαγές μείωσαν την δραστηριότητα του αναστολέα, με συνέπεια να μην αναστέλλει την ανάπτυξη ώριμων οστεοκλαστών ($IC_{50}=8.55\pm 1.00\mu M$), τόσο αποτελεσματικά όπως το αρχικό μόριο ($IC_{50}=0.99\pm 0.16\mu M$).

Επόμενο βήμα ήταν ο σχεδιασμός ενός μορίου με τις ίδιες αλλαγές, όπως το μόριο PRA5.2.8, με την διαφορά πως ο αρωματικός δακτύλιος περιέχει υποκαταστάτη μία αζωτούχα ομάδα (Εικόνα 3.12). Το PRA8.2.8 μόριο, εμφάνισε χαμηλή τοξικότητα ($LC_{50}=51.97\pm 2.64\mu M$), όπως και το PRA5.2.8, σε σχέση με το αρχικό μόριο ($LC_{50}=3.20\pm 0.11\mu M$). Το μόριο PRA8.2.8 είναι ελάχιστα τοξικότερο από το PRA5.2.8, όμως έχει το πλεονέκτημα πως συνδέεται στην πρωτεΐνη RANKL με πολύ μεγαλύτερη εξειδίκευση ($K_d=2.18$), συγκριτικά όχι μόνο με το SPD-304 ($K_d=8.4$) αλλά και τα υπόλοιπα μόρια ($K_d=4.6-20.84$) (Πίνακας 4.1). Ως εκ τούτου, το μόριο PRA8.2.8 είναι πιο δραστικό ($IC_{50}=1.87\pm 0.23\mu M$), από το PRA5.2.8 ($IC_{50}=8.55\pm 1.00\mu M$), λιγότερο δραστικό όμως από το αρχικό μόριο ($IC_{50}=0.99\pm 0.16\mu M$).

Το τελευταίο μόριο που σχεδιάστηκε (PRA9.2.8) είναι παρόμοιο των δύο προηγούμενων μορίων με τη διαφορά πως ο τριφθορομεθυλοφαινυλο δακτύλιος έχει παραμείνει όπως στο αρχικό μόριο SPD-304, ενώ έχει προστεθεί μία αζωτούχα ομάδα στον ινδολικό δακτύλιο του μορίου (Εικόνα 3.13). Οι αλλαγές αυτές βελτίωσαν την συγγένεια του μορίου με την πρωτεΐνη ($K_d=2.82$) σε σχέση με το αρχικό μόριο ($K_d=8.4$), στο ίδιο επίπεδο με το μόριο PRA8.2.8 ($K_d=2.18$), όμως, δεν είχαν τόσο θετική επίδραση στην τοξικότητα του μορίου ($LC_{50}=13.07\pm 0.94\mu M$), η οποία αν και βελτιώθηκε από το SPD-304 ($LC_{50}=3.20\pm 0.11\mu M$) δεν έφτασε τα επίπεδα των μορίων PRA8.2.8 ($LC_{50}=51.97\pm 62.64\mu M$) και PRA5.2.8 ($LC_{50}=62.33\pm 2.59$). Αντίθετα, η επίδραση των αλλαγών είχε θετικό αποτέλεσμα στην δραστικότητα του μορίου ($IC_{50}=2.92\pm 0.23\mu M$) σε σχέση με τα μόρια PRA8.2.8 ($IC_{50}=1.87\pm 0.23\mu M$) και PRA5.2.8 ($IC_{50}=8.55\pm 1.00\mu M$), δεν έφτασε όμως την δραστικότητα του αρχικού μορίου SPD-304 ($IC_{50}=0.99\pm 0.16\mu M$) (Πίνακας 4.1).

Γενικά, τα αποτελέσματα δραστικότητας (IC_{50}) επηρεάζονται πολύ από την τοξικότητα των μορίων. Για τον λόγο αυτό, η επίδραση που έχει ένα μόριο όπως το SPD-304 στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, δεν μπορούμε να είμαστε βέβαιοι αν οφείλεται εν μέρη στην τοξικότητά του. Επομένως, η τιμή IC_{50} κάθε μορίου δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως μέσω σύγκρισης με διαφορετική τοξικότητα. Συγκεντρωτικά όλα τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1.

MOPIO	Kd (μM)	IC50 (μM)	LC50 (μM)	
	SPD-304	8.40	0.99±0.16	3.20±0.11***
	PRA2.2.3	8.7	0.86±0.188	3.86±1.00***
	PRA2.2.2	6.62	0.84±0.17	4.78±0.08***
	PRA2.2.4	4.9	3.94±0.32	12.60±1.60***
	PRA2.2.1	5.24	2.50±0.67	58.50±5.00***
	PRA6.2.12	20.82	0.12±0.06	19.50±1.51***
	PRA6.3.12	4.6	0.13±0.07	8.44±0.53***
	PRA5.2.8	4.6	8.55±1.00	62.33±2.59***

	PRA8.2.8	2.18	1.87±0.23	51.97±2.64***
	PRA9.2.8	2.82	2.92±0.23	13.07±0.94***

Πίνακας 4.1: Συγκενρωτικός πίνακας της δομής και των ιδιοτήτων κάθε SPD-304 αναλόγου. Η σταθερά K_d υπολογίστηκε από την ομάδα του κ. Κοντοπίδη (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) και υποδεικνύει την ικανότητα σύνδεσης του μορίου με την πρωτεΐνη RANKL. Η τιμή IC₅₀ δείχνει την συγκέντρωση μορίου που χρειάζεται για να γίνει αναστολή της διαφοροποίησης στο 50% των οστεοκλαστών. Η τιμή LC₅₀ αντιστοιχεί στην συγκέντρωση μορίου που προκαλεί τον θάνατο στο 50% των κυττάρων του πληθυσμού. ***=P<0.0001

Τέλος, προσδιορίστηκε ο μηχανισμός με τον οποίο επιδρούν τα μόρια – ανάλογα του SPD-304 με την μέθοδο «cross-linking» (Εικόνα 3.14). Η μέθοδος υποδεικνύει πως παρουσία των αναλόγων διαταράσσεται η δυναμική ισορροπία που φυσιολογικά τείνει στον σχηματισμό των τριμερών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση και αύξηση των μονομερών. Αυτό υποδηλώνει πως τα μόρια-ανάλογα δρουν με παρόμοιο τρόπο με αυτό του SPD-304, προκαλώντας την αποδέσμευση μίας υπομονάδας από τα τριμερή της πρωτεΐνης καθιστώντας την πρωτεΐνη RANKL ανενεργή.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν για πρώτη φορά μικρά μόρια που στοχεύουν την πρωτεΐνη RANKL στη διαδικασία του τριμερισμού. Έπειτα από την αξιολόγηση των μορίων-αναλόγων του SPD-304 που σχεδιάστηκαν, το μόριο που εμφάνιζε την πιο θετική επίδραση στην αναστολή της οστεοκλαστογένεσης, χωρίς να επεμβαίνει στην επιβίωση των κυττάρων ήταν το μόριο PRA8.2.8. Το μόριο αυτό έχει επιλεγεί για *in vivo* αξιολόγηση στα ζωικά μοντέλα οστεοπόρωσης που έχουν πρόσφατα δημιουργηθεί από την ερευνητική ομάδα της Δρ. Ντούνη (Rinotas et al., 2013), ώστε να ελεγχθεί εάν είναι αποτελεσματικό και στο επίπεδο του οργανισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aggarwal BB. (2003) Signaling pathways of the TNF superfamily: a double edged sword. *Nature Reviews Immunology* Vol.3(9) p.745-756.

Albright, F, Smith PH, Richardson AM. (1941) Postmenopausal osteoporosis. *The Journall of the American Medical Association*.Vol.116 p.2465-2471.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. Vol.390(6656) p.175–179.

Armstrong AP, Miller RE, Jones JC, Zhang J, Keller ET, Dougall WC. (2008) RANKL acts directly on RANKexpressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate*. Vol.68(1) p.92-104.

Asselin-Labat ML, Vaillant F, Sheridan JM, Pal B, Wu D, Simpson ER, Yasuda H, Smyth GK, Martin TJ, Lindeman GJ, Visvader JE. (2010) Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature*. Vol.465(7299) p.798-802.

Atkinson J, Cranmer P, Saunders T, Niehaus M, Smith SY, Varela A, Ominsky MS, Cosenza ME, Kostenuik PJ. (2005) AMG 162, a fully human RANKL antibody, increases bone mass and bone strength in cynomolgus monkeys. *Journal of Bone and Mineral Research*.Vol.20 p.29.

Balakin KV, Savchuk NP, Tetko IV. (2006) In silico approaches to prediction of aqueous and DMSO solubility of drug-like compounds: trends, problems and solutions. *Current medicinal chemistry*. Vol.13(2) p.223-241.

Ballanti P, Minisola S, Pacitti MT, Scarnecchia L, Rosso R, Mazzuoli GF, Bonucci E. (1997) Tartrate-resistant acid phosphate activity as osteoclastic marker: sensitivity of cytochemical assessment and serum assay in comparison with standardized osteoclast histomorphometry. *Osteoporosis international*. Vol.7(1) p.39-43.

Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR. (2001) The effect of a single dose of osteoprotegerin in post-menopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.16 p.348–360.

Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, Holmes GB, Dunstan CR, DePaoli AM. (2004) A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.19(7) p.1059-1066.

Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD et al. (1985) Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* Vol.316 p.552–554.

Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Dawson-Hughes B. (2005) Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The Journal of the American Medical Association*. Vol.293(18) p.2257-2264.

Blair HC, Athanasou NA. (2004) Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. *Histology and Histopathology*. Vol.19(1) p.189-199.

Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. (1989) Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*. Vol.245 p.855-857.

Blam ME, Stein RB and Lichtenstein GR (2001) Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives. *The American Journal of Gastroenterology*. Vol.96 p.1977–1997.

Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in biochemical sciences*. Vol. 27(1) p.19-26.

Bone HG, Chapurlat R, Brandi ML, Brown JP, Czerwinski E, Krieg MA, Man Z, Mellström D, Radominski SC, Reginster JY, Resch H, Román Ivorra JA, Roux C, Vittinghoff E, Daizadeh NS, Wang A, Bradley MN, Franchimont N, Geller ML, Wagman RB, Cummings SR, Papapoulos S. (2013) The Effect of 3 or 6 Years of Denosumab Exposure in Women With Postmenopausal Osteoporosis: Results From the FREEDOM Extension. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Epub ahead of print.

Bonjour JP, Theintz G, Law F, Slosman D, Rizzoli R. (1994) Peak bone mass. *Osteoporosis International*. Vol.4(1) p.7-13.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol.72 p.248-254.

Brendan F Boyce and Lianping Xing. (2007) Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy* Vol.9 p.1.

Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N, Gasser TC, Mihatsch MJ. (2000) Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Human Pathology*. Vol.31(5) p.578-583.

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & Development*. Vol.12(9) p.1260-1268.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol.72(9) p.3666-3670.

Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. (2006) Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer*. Vol.107(2) p.289-298.

Chesneau V, Becherer JD, Zheng Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Blobel CP. Catalytic properties of ADAM 19. (2003) *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.278 p.22331–22340.

Clohisy DR, Ogilvie CM, Carpenter RJ, Ramnaraine ML. (1997) Localized, tumor-associated osteolysis involves the recruitment and activation of osteoclasts. *Journal of Orthopedic Research*. Vol.14(1) p.2-6.

Cowin, S.C. (2001) *Bone Biomechanics Handbook*. CRC Press.

Coxon JP, Oades GM, Colston KW, Kirby RS. (2004) Advances in the use of bisphosphonates in the prostate cancer setting. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. Vol.7(2) p.99-104.

Deal C. (2009) Potential new drug targets for osteoporosis. *Nature Clinical Practice-Pharmacology*. Vol.5(1) p.20-27.

Delmas PD. (2002) Treatment of postmenopausal osteoporosis. *THE LANCET* Vol.359.

Dougall WC, Chaisson M. (2006) The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases. *Cancer Metastasis Reviews*. Vol.25(4) p.541-549.

Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes & Development*. Vol.3(18) p.2412-2424.

Douni E, Rinotas V, Makrinou E, Zwerina J, Penninger JM, Eliopoulos E, Schett G, Kollias G. (2012) A RANKL G278R mutation causing osteopetrosis identifies a functional amino acid essential for trimer assembly in RANKL and TNF. *Human Molecular Genetics*. Vol.21(4) p.784-798.

Elfbaum, SG, Laden K. (1968) Effect of dimethyl sulfoxide on percutaneous absorption--a mechanistic study. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. Vol.18 p.841.

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. (1998) Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Journal of Biological Chemistry*. Vol.273(23) p.14363-14367.

Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. (2000) The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*. Vol.103(1) p.41-50.

Frost HM. (1990) Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *The Anatomic Record*. Vol.226(4) p.414-422.

Gravallese EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, Goldring SR. (2000) Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis and Rheumatism*. Vol.43(2) p.250-258.

Grell M, Douni E, Wajant H et al. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* Vol.83 p.793–802.

Grewal IS. (2009) Overview of TNF superfamily: a chest full of potential therapeutic targets. *Advances in experimental medicine and biology* Vol.647 p.1-7.

Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, Gouin F, Redini F, Heymann D. (2003) Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *The American Journal of Pathology*. Vol.163(5) p.2021-203.

Gruss HJ, Dower SK. (1995) Tumor Necrosis Factor Ligand superfamily involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* Vol.85 p.3378-3404.

Guerrini MM, Sobacchi C, Cassani B, Abinun M, Kilic SS, Pangrazio A, Moratto D, Mazzolari E, Clayton-Smith J, Orchard P, Coxon FP, Helfrich MH, Crockett JC, Mellis D, Vellodi A, Tezcan I, Notarangelo LD, Rogers MJ, Vezzoni P, Villa A, Frattini A. (2008) Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. *American Journal of human Genetics* Vol.83(1) p.64-76.

H. Kalervo Väänänen, Haibo Zhao, Mika Mulari and Jussi M. Halleen. (2000) The cell biology of osteoclast function. *Journal of Cell Science*. Vol.113 p.377-381.

Hennighausen L, Robinson GW, Wagner KU, Liu X. (1997) Developing a mammary gland is a stat affair. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. Vol.2(4) p.365-372.

Hikosaka Y, Nitta T, Ohigashi I, Yano K, Ishimaru N, Hayashi Y, Matsumoto M, Matsuo K, Penninger JM, Takayanagi H, Yokota Y, Yamada H, Yoshikai Y, Inoue J, Akiyama T,

Takahama Y. (2008) The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator," *Immunity* Vol.29(3) p.438–450.

Hill PA. (1998) Bone remodelling. *British Journal of Orthodontics*. Vol.25 p. 101–107.

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. (2001) Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and Thymus. *Endocrinology*. Vol.142 p.1419–26.

Inaoka T, Bilbe G, Ishibashi O, Tezuka K, Kumegawa M, Kokubo T. (1995) Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol.206(1) p.89-96.

Johnell O, Kanis JA, Odén A, Sernbo I, Redlund-Johnell I, Petterson C, De Laet C, Jönsson B. Mortality after osteoporotic fractures. (2004) *Osteoporosis International*. Vol.15(1) p.38-42.
Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, Sarosi I, Morony S, Rubin E, Sarao R, Hojilla CV, Komnenovic V, Kong YY, Schreiber M, Dixon SJ, Sims SM, Khokha R, Wada T, Penninger JM. (2006) Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*. Vol.440(7084) p.692-696.

Karsenty G, Wagner EF. (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell*. Vol.2 p.389- 406.

Katz RL, Lukeman JM. (1980) The comparative diagnostic accuracy of cancer-cell detection obtained with Ficoll-Hypaque gradient separation and standard centrifugation technics on body-cavity fluids. *American Journal of Clinical Pathology*. Vol. 74(1) p.18-24.

Kim D, Mebius RE, MacMicking JD, Jung S, Cupedo T, Castellanos Y, Rho J, Wong BR, Josien R, Kim N, Rennert PD, Choi Y. (2000) Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *Journal of Experimental Medicine*. Vol.192(10) p.1467–1478.

Kim HJ, Hong J, Jung JW, Kim TH, Kim JA, Kim YH, Kim SY. (2010) Gymnasterkoreayne F inhibits osteoclast formation by suppressing NFATc1 and DC-STAMP expression. *International immunopharmacology*. Vol.10(11) p.1440-1447.

Kitazawa S, Kitazawa R. (2002) RANK ligand is a prerequisite for cancer-associated osteolytic lesions. *The Journal of Pathology*. Vol.198(2) p.228-236.

Klingman AM. (1965) Topical pharmacology and toxicology of dimethyl sulfoxide.1. *The journal of the American medical association*. Vol.193 p.796-804.

Knoop KA, Butler BR, Kumar N, Newberry RD, Williams IR. (2011) Distinct developmental requirements for isolated lymphoid follicle formation in the small and large intestine: RANKL is essential only in the small intestine. *The American Journal of Pathology*. Vol.179(4) p.1861–1871.

Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, Takayanagi H. (2005) NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nature Medicine*. Vol.11 p.880-885.

Kollias G, Douni E, Kassiotis G and Kontoyiannis D (1999) On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunological Reviews*. Vol.169 p.175–194.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymphnode organogenesis. *Nature*. Vol.397(6717) p.315–323.

Kriegler M, Perez C, DeFay K et al. (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* Vol.53 p.45–53.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. Vol.93 p.165–176.

Lam J, Nelson CA, Ross FP, Teitelbaum SL, Fremont DH. (2001) Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol.108(7) p.971-979.

Lange CA. (2008) Challenges to defining a role for progesterone in breast cancer. *Steroids*. Vol.73(9-10) p.914-921.

Lewiecki EM, Miller PD, McClung MR, Cohen SB, Bolognese MA, Liu Y, Wang A, Siddhanti S, Fitzpatrick LA. (2007) Two-year treatment with denosumab (AMG 162) in a randomized phase 2 study of postmenopausal women with low BMD. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.22(12) p.1832-1841.

Lieberman UA, Weiss SR, Bröll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriguez-Portales J, Downs RW Jr, Dequeker J, Favus M. (1995) Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*. Vol.333(22) p.1437-1443.

Liu C, Walter TS, Huang P, Zhang S, Zhu X, Wu Y, Wedderburn LR, Tang P, Owens RJ, Stuart DI, Ren J, Gao B. (2010) Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. *Journal of Immunology*. Vol.184(12) p.6910-6919.

Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW. (1999) TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes & Development* Vol.13 p.1015-1024.

Loser K, Mehling A, Loeser S, Apelt J, Kuhn A, Grabbe S, Schwarz T, Penninger JM, Beissert S. (2006) Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nature Medicine*. Vol.12(12) p.1372–1379.

Luan X, Lu Q, Jiang Y, Zhang S, Wang Q, Yuan H, Zhao W, Wang J, Wang X. (2012) Crystal structure of human RANKL complexed with its decoy receptor osteoprotegerin. *Journal of Immunology*. Vol.189(1) p.245-252.

Mannel DN, Echtenacher B (2000) TNF in the inflammatory response. *Chemical Immunology* Vol.74 p.141–161.

Marsters SA, Frutkin AD, Simpson NJ, Fendly BM, Ashkenazi A. (1992). Identification of cysteine-rich domains of the type 1 tumor necrosis factor receptor involved in ligand binding. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.267(9) p.5747-5750.

Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. (1996) Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone*. Vol.19(3) p.281-290.

McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH, Peacock M, Miller PD, Lederman SN, Chesnut CH, Lain D, Kivitz AJ, Holloway DL, Zhang C, Peterson MC, Bekker PJ. (2006) Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *The New England Journal of Medicine*. Vol.354(8) p.821-831.

Miller PD, Wagman RB, Peacock M, Lewiecki EM, Bolognese MA, Weinstein RL, Ding B, San Martin J, McClung MR. (2011) Effect of denosumab on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover: six-year results of a phase 2 clinical trial. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. Vol.96(2) p.394-402.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. Vol.65(1-2) p.55-63.

Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M, Yoshioka Y, Tsunoda SI, Nakagawa S, Yamagata Y, Tsutsumi Y (2010) Solution of the structure of the tnfr1-tnfr2 complex, *Science Signaling*. Vol. 3(148) p.83.

Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T. (1995) A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone*. Vol. 17(2) p.137-144.

Naito A, Azuma S, Tanaka S, Miyazaki T, Takaki S, Takatsu K, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Yamamoto T, Inoue J. (1999) Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes to Cells*. Vol. 4 p.353-362.

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*. Vol.108 p.17-29.

Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RG, Ebetino FH. (2006) Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone*. Vol.38(5) p.617-627.

Ominsky MS, Kostenuik PJ, Cranmer P, Smith SY, Atkinson JE . (2007) The RANKL inhibitor OPG-Fc increases cortical and trabecular bone mass in young gonad-intact cynomolgus monkeys. *Osteoporosis International*. Vol.18(8) p.1073-1082.

Parfitt AM, Gallagher JC, Heaney RP, Johnston CC, Neer R, Whedon CG. (1982) Vitamin D and bone health in the elderly. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Vol.36 p.1014–1031.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg P, Denryck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB & Goeddel DV (1984). Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology yo lymphotoxin. *Nature* Vol.312 p.724-729.

Perrone M (2010). FDA clears Amgen's bone-strengthening drug Prolia. *BioScience Technology*.

Reginster J, Minne HW, Sorensen OH, Hooper M, Roux C, Brandi ML, Lund B, Ethgen D, Pack S, Roumagnac I, Eastell R. (2000) Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis International*. Vol. 11(1) p.83-91.

Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, Offord KP, Dunn WL, Mazess RB, Johnson KA, Melton LJ. (1982) Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. *Journal of Clinical Investigation*. Vol.70 p.716-723.

Rinotas V, Niti A, Dacquin R, Bonnet N, Stolina M, Han CY, Kostenuik P, Jurdic P, Ferrari S, Douni E. (2013) Novel genetic models of osteoporosis by overexpression of human RANKL in transgenic mice. *Journal of bone and mineral Research*. Oct 11. doi: 10.1002/jbmr.2112. [Epub ahead of print]

Russell RG, Mühlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H. (1970) The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcified tissue research*. Vol. 6(3) p.183-196.

Sakiyama H, Masuda R, Inoue N, Yamamoto K, Kuriwa K, Nakagawa K, Yoshida K. (2001). Establishment and characterization of macrophage-like cell lines expressing osteoclast-specific markers. *Journal of bone and mineral metabolism*. Vol.19(4) p.220-227.

Sato M, Grasser W. (1990) Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol.5(1) p.31-40.

Schneeweis, L. A., D. Willard, and M. E. Milla. (2005) Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.280 p.41155–41164.

Selander K, Lehenkari P, Väänänen HK. (1994) The effects of bisphosphonates on the resorption cycle of isolated osteoclasts. *Calcified tissue research*. Vol. 55(5) p.368-375.

Silverman SL. (1992) The clinical consequences of vertebral compression fracture. *Bone*. Vol.13 p.27-31.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in theregulation of bone density. *Cell*. Vol.89 p.309–319.

Skiles GL, Yost GS. (1996) Mechanistic studies on the cytochrome P450-catalyzed dehydrogenation of 3-methylindole. *Chemical research in toxicology*. Vol.9(1) p.291-297.

Sobacchi C, Frattini A, Guerrini MM, Abinun M, Pangrazio A, Susani L, Bredius R, Mancini G, Cant A, Bishop N, Grabowski P, Del Fattore A, Messina C, Errigo G, Coxon FP, Scott DI, Teti A, Rogers MJ, Vezzoni P, Villa A, Helfrich MH. (2007) Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nature Genetics*. Vol.39(8) p.960-962.

Staros JV. (1982) N-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis(N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers. *Biochemistry*. Vol.21(17) p.3950-3955.

Steele DG, Bramblett AC. (1988) *The Anatomy and Biology of the Human Skeleton*. Texas A&M University Press.

Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. (1997) Regulation of osteoclast function. *Journal of bone and mineral research*. Vol. 2(6) p.869-879.

Suda, T., Takahashi, N. and Martin, T. J. (1992). Modulation of osteoclast differentiation. *Endocrine Reviews*. Vol.13 p.66-80.

Sun H, Ehlhardt WJ, Kulanthaivel P, Lanza DL, Reilly CA and Yost GS. (2007) Dehydrogenation of Indoline by Cytochrome P450 Enzymes: A Novel "Aromatase" Process. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. Vol.322(2) p.843-851.

Ta HM, Nguyen GT, Jin HM, Choi J, Park H, Kim N, Hwang HY, Kim KK. (2010) Structure-based development of a receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) inhibitor peptide and molecular basis for osteopetrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol.107(47) p.20281-2086.

Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental Cell*. Vol.3 p.889-901.

Tang P, Hung M-C and Klostergaard J (1996) Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* Vol.35 p.8216–8225.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH and Goeddel DV (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* Vol.74 p.845–853.

Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, Feldmann M, Maini RN. (2000) Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor

necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. Vol.43 p.38–47.

Teitelbaum SL, Ross FP. (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature Reviews Genetics*. Vol.4 p.638-649.

Teitelbaum SL. (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science*. Vol.289(5484) p.1504-8.

Thiebaud D, Krieg MA, Gillard-Berguer D, Jacquet AF, Goy JJ, Burckhardt P. (1996) Cyclosporine induces high bone turnover and may contribute to bone loss after heart transplantation. *European Journal of Clinical Investigation* Vol.26 p.549-555.

Tilman B. Drüeke, Isidro Salusky, (2001). The spectrum of renal osteodystrophy. Oxford University Press.

Turner CH. (2002) Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporosis International*. Vol.13(2) p.97-104.

Upsana G, Bharat BA. (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology* Vol.66(8) p.1403-1408.

Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. (2000). The cell biology of osteoclast function. *Journal of cell science*. Vol.113(3) p.377-381.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM.(2006). RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in molecular medicine*. Vol.12(1) p.17-25.

Wada T, Nakashima T, Oliveira-dos-Santos AJ, Gasser J, Hara H, Schett G, Penninger JM. (2005) The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis. *Nature Medicine*. Vol.11 p.394-399.

Wallach D, Engelmann H, Nophar Y et al. (1991) Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents and Actions Supplements*. Vol.35 p.51–57.

Watts NB, Harris ST, Genant HK, Wasnich RD, Miller PD, Jackson RD, Licata AA, Ross P, Woodson GC 3rd, Yanover MJ, et al. (1990) Intermittent cyclical etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis. *The New England Journal of Medicine*. Vol.323(2) p.73-79.

Whitaker M, Guo J, Kehoe T, Benson G. (2012) Bisphosphonates for osteoporosis--where do we go from here? *The New England Journal of Medicine*. Vol.366(22) p.2048-2051.

Whyte MP. (2006) Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol.1068 p.143-164.

Williams TW, Granger GA. (1968) Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature* Vol.219(158) p.1076-1077.

Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, Choi Y. (1997) TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *The Journal of Experimental Medicine*. Vol.186 p.2075-80.

Yao Z, Matsuo K, Nishimura R, Xing L, Boyce BF. (2005) c-Fos/NFAT1- or 2-mediated osteoclastogenesis requires NF-kB p50/p52 expression. *Journal of Bone and Mineral Research* Vol.1 p.145.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*. Vol.139 p.1329-37.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* Vol.95 p.3597-602