



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Τροφίμων Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**«Μελέτη RANKL-επαγόμενων παθογενετικών μηχανισμών
σε γενετικά ζωικά πρότυπα και νέες θεραπευτικές
προσεγγίσεις»**



ΡΗΝΩΤΑΣ Ε. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Ε. ΝΤΟΥΝΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Τροφίμων Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**«Μελέτη RANKL-επαγόμενων παθογενετικών μηχανισμών σε
γενετικά ζωικά πρότυπα και νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις»**

ΡΗΝΩΤΑΣ Ε. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Ε. ΝΤΟΥΝΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2014

Agricultural University of Athens

School of Food Science, Biotechnology and Development

Department of Biotechnology

Laboratory of Genetics

«Study of RANKL-mediated pathogenic mechanisms in genetic animal models and development of new therapeutic approaches»

RINOTAS E. VAGELIS

SUPERVISOR: E. DOUNI

Ph.D. Thesis

ATHENS 2014

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής έτυχε χρηματοδότησης από το έργο με τίτλο «Από Μόρια Στόχους σε Μόρια-Οδηγούς: Καινοτόμες Φαρμακευτικές Ουσίες για την Αρθρίτιδα-TheRAlead» στα πλαίσια δράσης εθνικής εμβέλειας «Συνεργασία» - Πράξη II. Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης - ΕΤΠΑ) και από εθνικούς πόρους.



Η αποδοχή για την εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύγκλησης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ 2η/20-10-2010). Ο ορισμός και η τροποποίηση της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, καθώς και η ανάθεση του θέματος έγιναν με αποφάσεις των ΓΣΕΣ (12η/29-03-2011, 8η/14-03-2012 και 6η/26-01-2012, αντίστοιχα). Ο ορισμός της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Βιοτεχνολογίας (14η/24-07-2014).

Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932 άρθρο 202).

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Ελένη Ντούνη, Επίκουρη Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής (Μέλος)

Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής (Μέλος)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Ελένη Ντούνη

Επίκουρη Καθηγήτρια, Εργ. Γενετικής,
Τμήμα Βιοτεχνολογίας,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Ηλίας Ηλιόπουλος

Καθηγητής Εργ. Γενετικής, Τμήμα
Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Αθηνών.

Παναγιώτης Κατινάκης

Καθηγητής, Εργ. Γενικής και Γεωργικής
Μικροβιολογίας, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής
Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Σπυρίδων Κίντζιος

Καθηγητής Εργ. Κυτταροιστοκαλλιέργειας,
Τμήμα Βιοτεχνολογίας,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Νικόλαος Λάμπρου

Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργ. Ενζυμικής
Τεχνολογίας, Τμήμα Βιοτεχνολογίας,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Νικόλαος Κοσμίδης

Επίκουρος Καθηγητής, Εργ. Γενετικής,
Τμήμα Βιοτεχνολογίας,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Αριάδνη Χάγερ

Επίκουρη Καθηγήτρια, Εργ. Γενικής και
Ειδικής Ζωοτεχνίας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής
Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΑΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. **Rinotas V**, Niti A, Dacquin R, Bonnet N, Stolina M, Han CY, Kostenuik P, Jurdic P, Ferrari S, Douni E. (2014) Novel genetic models of osteoporosis by overexpression of human RANKL in transgenic mice. **J Bone Miner Res**, May;29 (5):1158-69.
2. Papaneophytou CP, **Rinotas V**, Douni E, Kontopidis G. (2013) A statistical approach for optimization of RANKL overexpression in Escherichia coli: Purification and characterization of the protein. **Protein Expr Purif**, Jul; 90(1):9-19.
3. Papaneophytou CP, Mettou AK, **Rinotas V**, Douni E, Kondopidis GA. (2012) Solvent Selection for Insoluble Ligands, a Challenge for Biological Assay Development: A TNF- α /SPD304 Study. **ACS Med. Chem. Lett**; 4 (1):137–141.
4. 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. **Hum Mol Genet.**,Feb 15.21(4):784-98.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΚΑΙ ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Rinotas V, Violitzi F, Alexiou P, Liepouri F, Maranti A, Tsiliouka K, Strongilos A, Papakyriakou T, Papaneophytou C, Kontopidis G, Couladouros E, Eliopoulos E, Douni E. (2014) Novel small molecule inhibitors of human RANKL that target its trimerization. 5th International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems, 15-19 June, Kos Greece.

Rinotas V, Papadaki M, Dacquin R, Bonnet N, Jurdic P, Ferrari S, Douni E. (2013). Novel osteoporosis models by overexpressing human RANKL in transgenic mice. 64th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, 6-8 December 2013 (**Βραβείο προφορικής ανακοίνωσης**).

Rinotas V, Violitzi F, Alexiou P, Liepouri F, Maranti A, Tsiliouka K, Strongilos A, Papakyriakou T, Papaneophytou C, Kontopidis G, Couladouros E, Eliopoulos E, Douni E. (2013) Novel human RANKL inhibitors targeting its trimerization. ASBMR Annual Meeting, 4-7 October, Baltimore, USA.

Rinotas V, Niti A, Dacquin R, Bonnet N, Ferrari S, Jurdic P, Douni E. (2013). Novel models of osteoporosis in transgenic mice overexpressing human RANKL. ASBMR Annual Meeting, 4-7 October, Baltimore, USA.

Rinotas V, Violitzi F, Alexiou P, Liepouri F, Maranti A, Tsiliouka K, Strongilos A, Papakyriakou T, Papaneophytou C, Kontopidis G, Couladouros E, Eliopoulos E, Douni E. (2013). Novel SPD304-like inhibitors targeting trimerization of human RANKL. 5th International BBBB Conference “From Drug Discovery and Formulation Strategies to Pharmacokinetics-Pharmacodynamics”, 26-28 September, Athens.

Rinotas V, Niti A, Kontopidis G, Couladouros E, Eliopoulos E, Douni E. (2012). Study of RANKL-mediated pathogenic mechanisms in mouse models and development of new therapeutic approaches. 2nd Conference on Agricultural Biotechnology, 4-5 October, Athens.

Rinotas V, Dacquin R, Bonnet N, Ferrari S, Jurdic P, Alexiou P, Papakyriakou T, Papaneophytou C, Kontopidis G, Couladouros E, Eliopoulos E, Douni E. 2012. Study of RANKL-mediated pathogenic mechanisms in mouse models and development of new therapeutic approaches. 5th International Workshop on Advances in the Molecular Pharmacology and Therapeutics of Bone Disease, 27-30 June Oxford, UK.

Rinotas V, Alexiou P, Papakyriakou T, Papaneophytou C, Kontopidis G, Couladouros E, Eliopoulos E, and Douni E. (2012). Development of novel therapeutic approaches targeting RANKL trimerization. 4th International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the immune and skeletal systems. Aegean Conferences, June 18-21, Corfu Greece.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Πρώτα και κύρια θέλω να ευχαριστήσω την επιβλέπουσά μου και μέλος της τριμελούς επιτροπής, Επίκουρη Καθηγήτρια Ελένη Ντούνη για την υπομονή της, την ενθάρρυνση και την προσωπική μέριμνα και εκπαίδευση που μου παρείχε κατά την διάρκεια εκπόνηση αυτής τη διδακτορικής διατριβής στο εργαστήριό της. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον καθηγητή Ηλία Ηλιόπουλο, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την εποπτεία καθ' όλη την διάρκεια της παρούσας διατριβής. Επίσης, ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Παναγιώτη Κατινάκη, μέλος της τριμελούς επιτροπής, που έδειξε αμέριστη συμπαράσταση και εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου από την περίοδο που εκπόνησα την μεταπτυχιακή μου μελέτη στο εργαστήριό του, καθώς και για την εποπτεία της διδακτορικής διατριβής. Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής τον Καθ. Σπυρίδωνα Κίντζιο, τον Αναπλ. Καθ. Νικόλαο Λάμπρου, τον Επικ. Καθ. Νικόλαο Κοσμίδη και την Επικ. Καθ. Αριάδνη Χάγερ για τις εποικοδομητικές υποδείξεις τους.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Δρ Ελένης Ντούνη, που με την άψογη συνεργασία τους, την επίδειξη συναδελφικότητας και την άμεση συνεισφορά τους στη διενέργεια πειραμάτων εξασφάλισαν ευχάριστο κλίμα και βέλτιστες συνθήκες για την εκπόνηση αυτής της διατριβής. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη Φωτεινή Βιολιτζή, υποψήφια διδάκτορα, για τη συνεργασία σε πειραματικές διαδικασίες, τον Φώτη Ιωακειμίδη, μεταδιδάκτορα, για τη συνεισφορά του στην επίλυση πλείστων τεχνικών ζητημάτων, την Toshimi Kano για την συνεισφορά της σε πολλές πειραματικές διαδικασίες, και τις συναδέλφους Μαρία-Ειρήνη Τερζενίδου και Μαρία Παπαδάκη για τη συνεργασία γενικότερα. Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου την σύζυγό μου Σούζυ και την κόρη μου Λυδία για την αμέριστη συμπαράσταση και ανοχή τους καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστική ανακατασκευή είναι μια συνεχής διαδικασία ανανέωσης των μικρομονάδων των οστών με διαδοχική ενεργοποίηση και λειτουργία των οστεοκλαστών και οστεοβλαστών, κυττάρων υπεύθυνων για την οστική απορρόφηση και παραγωγή, αντίστοιχα. Φυσιολογικά και οι δύο διεργασίες βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία μεταξύ τους, εξασφαλίζοντας την σκελετική ακεραιότητα. Η διατάραξη αυτής της ισορροπίας αποτελεί την κύρια αιτία πρόκλησης σκελετικών νοσημάτων, όπως η οστεοπόρωση. Η κυτταροκίνη RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand) μέλος της υπερικογένειας του TNF (Tumor Necrosis Factor), αποτελεί τον κύριο διαμεσολαβητή στην διαδικασία της οστικής απορρόφησης καθώς επάγει την διαφοροποίηση, επιβίωση και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Ως τριμερές συνδέεται στον υποδοχέα του RANK, επάγοντας τον τριμερισμό του και την ενεργοποίηση των ενδοκυτταρικών μονοπατιών που οδηγούν στην δημιουργία ώριμων και λειτουργικών οστεοκλαστών, ενώ η δράση του RANKL αναστέλλεται από την οστεοπροτεγερίνη (OPG), ένα ανταγωνιστικό διαλυτό υποδοχέα. Η αναλογία μεταξύ RANKL και OPG καθορίζει τη βιοδιαθεσιμότητα και τη δράση του RANKL στα βιολογικά συστήματα. Η σημασία του RANKL στην βιολογία του σκελετικού συστήματος φαίνεται από το γεγονός ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο του RANKL προκαλούν αυτοσωμική υπολειπόμενη οστεοπέτρωση λόγω αδυναμίας σχηματισμού οστεοκλαστών. Αντιθέτως, αυξημένη παραγωγή του RANKL συνδέεται με επαγωγή οστεοκλαστικής δραστηριότητας και οστικής απώλειας σε ασθένειες όπως η οστεοπόρωση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το πολλαπλό μυέλωμα, οι οστικές μεταστάσεις και οι περιοδοντικές ασθένειες. Η αναστολή της δράσης του RANKL θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση για την παρεμπόδιση της οστικής απώλειας στις παραπάνω ασθένειες και έχει ήδη εγκριθεί η χορήγηση ενός μονοκλωνικού αντισώματος, του denosumab, έναντι του RANKL σε εμμηνοπαυσιακές οστεοπορωτικές γυναίκες. Το γεγονός αυτό καθιστά αναγκαία την εύρεση νέων αναστολέων του RANKL και την αξιολόγησή τους σε κατάλληλα ζωικά μοντέλα.

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετήθηκαν δύο μοναδικά ζωικά μοντέλα που έχουν δημιουργηθεί από την ερευνητική ομάδα της Επίκ. Καθηγήτριας Ελένης Ντούνη. Το πρώτο γενετικό μοντέλο χαρακτηρίζεται από αυτοσωμική υπολειπόμενη οστεοπέτρωση και οφείλεται σε μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο RANKL του ποντικού που προκαλεί αντικατάσταση ενός αμινοξέος από γλυκίνη σε αργινίνη στην θέση 278, (G278R), καθιστώντας ανενεργή την πρωτεΐνη RANKL. Η

μελέτη της υπεύθυνης μετάλλαξης έχει οδηγήσει στην κατανόηση του μοριακού παθογενετικού μηχανισμού και στον σχεδιασμό νέων αναστολέων έναντι του RANKL. Πιο συγκεκριμένα δείξαμε με πειράματα ανοσοαποτύπωσης και cross-linking ότι η μεταλλαγμένη RANKL^{G278R} πρωτεΐνη δεν σχηματίζει ομοτριμερή και έχει απολέσει την βιολογική της δραστηριότητα. Ακόμη σε *ex vivo* κυτταρικές δοκιμές δείξαμε ότι η RANKL^{G278R} δεν επάγει τον σχηματισμό οστεοκλαστών ενώ ασκεί κυρίαρχη αρνητική επίδραση στην δράση της άγριου τύπου RANKL. Λόγω της υψηλής συντηρητικότητας που εμφανίζει η γλυκίνη στην θέση 278 μεταξύ των μελών της υπεροικογένειας του TNF, προχωρήσαμε σε βιοχημικό και λειτουργικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών TNF και BAFF του ανθρώπου εισάγοντας την αντίστοιχη αμινοξική αλλαγή από γλυκίνη σε αργινίνη. Ομοίως, δείξαμε ότι οι μεταλλαγμένες TNF^{G122R} και BAFF^{G249R} πρωτεΐνες δεν σχηματίζουν τριμερή και δεν είναι βιολογικά ενεργές. Η αναγνώριση ενός τόσο κρίσιμου αμινοξέος που συμμετέχει ενεργά στον τριμερισμό των πρωτεϊνών της TNF υπεροικογένειας αποτελεί δυνητικά ένα σημαντικό φαρμακευτικό στόχο στην λογική σχεδιασμού νέων φαρμάκων για την αναστολή του τριμερισμού. Το μικρό μόριο SPD-304 έχει χαρακτηριστεί ως ένας αναστολέας του τριμερισμού του TNF ωστόσο η δραστηριότητά του έναντι του RANKL δεν ήταν γνωστή. Δείξαμε ότι το SPD-304 αλληλεπιδρά με την RANKL πρωτεΐνη προκαλώντας αναστολή σε δοκιμές οστεοκλαστογένεσης. Όμως η υψηλή τοξικότητα του SPD-304 το καθιστά ακατάλληλο για φαρμακευτική χρήση. Έτσι, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν συνολικά 72 ενώσεις ανάλογα του SPD-304 από τις οποίες ταυτοποιήσαμε 7 ενώσεις με τα εξής χαρακτηριστικά: 1) αποτελούν ισχυροί αναστολείς σε δοκιμές οστεοκλαστογένεσης, 2) παρουσιάζουν σημαντικά μικρότερη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με το SPD304, και 3) παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση με την πρωτεΐνη-στόχο RANKL. Επίσης, βιοχημικός έλεγχος έδειξε ότι τα SPD-304 ανάλογα αποδιατάσσουν το τριμερές του RANKL. Επόμενος στόχος είναι η αξιολόγηση αυτών των αναστολέων του RANKL σε προκλινικό επίπεδο με τη χρήση κατάλληλων ζωικών μοντέλων οστεοπόρωσης. Πάνω σε αυτή την λογική, προχωρήσαμε στην δημιουργία και χαρακτηρισμό ενός καινοτόμου γενετικού μοντέλου οστεοπόρωσης με την υπερέκφραση του RANKL του ανθρώπου σε διαγονιδιακά ποντίκια. Χαρακτηρίσαμε 2 διαγονιδιακές σειρές, την Tg5516 που φέρει ένα αντίγραφο του διαγονιδίου και την Tg5519 με δέκα επιπλέον αντίγραφα. Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL έδειξε έκφραση στην Tg5516 σειρά και ακόμη υψηλότερα επίπεδα στην Tg5519 σειρά κυρίως σε οστά, σπλήνα και εγκέφαλο. Επίσης, η υπερέκφραση του huRANKL

στις δύο διαγονιδιακές σειρές ακολουθεί το ίδιο πρότυπο έκφρασης με το ενδογενές γονίδιο (μ RANKL). Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός έδειξε ότι η Tg5516 σειρά αποτελεί ένα μοντέλο ήπιας οστεοπόρωσης με οστική απώλεια του σπογγώδους οστού, ενώ η Tg5519 σειρά εμφανίζει έντονη οστεοπόρωση με κύρια χαρακτηριστικά την πλήρη απώλεια του σπογγώδους οστού, πορώδη δομή στο φλοιώδες οστό, αυξημένη οστεοκλαστογένεση, σταδιακή καταστροφή της αυξητικής πλάκας και αυξημένη λιπογένεση στο μυελό των οστών. Τέλος, με την θεραπεία της οστεοπόρωσης στα Tg5519 ποντίκια έπειτα από χορήγηση του αντισώματος denosumab, διαπιστώσαμε ότι τα TgRANKL ποντίκια αποτελούν κατάλληλα μοντέλα οστεοπόρωσης για την αξιολόγηση νέων φαρμάκων, όπως των SPD-304 αναλόγων, σε προκλινικό επίπεδο.

ABSTRACT

Bone remodeling is a continuous process of renewal of the bone by sequential activation and function of osteoclasts and osteoblasts, cells responsible for bone resorption and production, respectively. Normally, both processes are in dynamic equilibrium with each other, ensuring the skeletal integrity. Disruption of this balance is the primary cause of skeletal diseases, such as osteoporosis. The cytokine RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand), a TNF superfamily member (Tumor Necrosis Factor), is the main mediator in the process of bone resorption as it induces differentiation, survival and activity of osteoclasts. As trimer RANKL binds to its receptor, RANK, induces trimerization and activation of intracellular pathways leading to the generation of mature and functional osteoclasts, while the action of RANKL is inhibited by osteoprotegerin (OPG), a soluble decoy receptor. The ratio between RANKL and OPG determines the availability and activity of RANKL in biological systems. The significance of RANKL in bone biology derives from the evidences that mutations in the RANKL gene lead to autosomal recessive osteopetrosis due to lack of osteoclasts. Conversely, increased production of RANKL is linked to excess osteoclast activity and bone loss diseases, such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, multiple myeloma, bone metastases and periodontal diseases. The inhibition of RANKL is considered a promising therapeutic approach for the prevention of bone loss diseases and it has already been approved, through the administration of a monoclonal antibody against RANKL (denosumab), in postmenopausal osteoporosis, and in men with bone metastases derived from the prostate. This makes it necessary to find new inhibitors of RANKL and evaluate them in appropriate animal models.

Within the present PhD Thesis we studied two new animal models which have been created by the research team of the Assistant Professor Eleni Douni. The first genetic model is characterized by autosomal recessive osteopetrosis due to a point mutation in the mouse RANKL gene that causes an amino acid substitution from glycine to arginine at position 278, (G278R) making the RANKL protein inactive (Douni et al. 2012). The study of the responsible mutation has led to the understanding of the molecular pathogenesis and design of new inhibitors against RANKL. In particular we showed by immunoblot experiments and cross-linking of RANKL^{G278R} that the mutant protein does not form homotrimers and has lost its biological activity. In addition, the RANKL^{G278R} does not induce osteoclast formation and exerts a dominant

negative effect on the activity of wild type mouse RANKL. The amino acid glycine at position 278 shows high conservation among the members of the TNF superfamily. By introducing the corresponding amino acid change, from glycine to arginine, in human TNF and BAFF proteins, we have shown that the mutant TNF^{G122R} and BAFF^{G249R} proteins do not form trimers and are biologically inactive. The recognition of such an amino acid that is actively involved in the trimerization of the TNF superfamily members constitutes a potentially drug target for the rational design of new drugs that disrupt trimerization. The SPD-304 has been identified as small molecule inhibitor of TNF trimerization but its activity against RANKL was unknown. We showed that SPD-304 interacts with RANKL inducing osteoclastogenesis inhibition. However, the high toxicity of SPD-304 makes it unsuitable for pharmaceutical use. So, we designed and synthesized 72 new compounds depending on SPD-304 structure, 7 of which have been identified with the following characteristics: 1) inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis, 2) exhibit considerably less cytotoxicity compared with the SPD-304, and 3) display high specificity to the target protein RANKL. Biochemical assays showed that such inhibitors disrupt the trimer formation of RANKL. The evaluation of these potent small molecule inhibitors of RANKL in preclinical level presupposes the use of appropriate animal models of osteoporosis.

In this context, we developed and characterized novel genetic models of osteoporosis by overexpression of human RANKL in transgenic mice. We characterized two transgenic lines, the Tg5516 transgenic line that carries one copy of the transgene and the Tg5519 line with ten extra copies. Quantitative analysis of huRANKL gene showed expression in the Tg5516 mice with even higher levels in the Tg5519 mice mainly in bone, spleen and brain. Moreover, the overexpression of the huRANKL in both transgenic lines follows the same pattern of expression of the endogenous gene (muRANKL). Phenotypic characterization showed that the Tg5516 line represents a mild model of osteoporosis with bone loss of trabecular bone, while the Tg5519 line develops severe osteoporosis characterized by complete loss of trabecular bone, cortical porosity, increased osteoclastogenesis, progressive destruction of the growth plate and increased bone marrow adiposity. Finally, upon the effective therapy of osteoporosis in Tg5519 mice with denosumab, we concluded that the TgRANKL mice are appropriate models of osteoporosis for the preclinical evaluation of new drugs, such as the SPD-304 analogues.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ARO	Autosomal Recessive Osteopetrosis Αυτοσωμική Υπολειπόμενη Οστεοπέτρωση
BAC	Bacterial Artificial Chromosome Βακτηριακό τεχνητό χρωμόσωμα
BAFF	B-cell activating factor Παράγοντας ενεργοποίησης των Β-λεμφοκυττάρων
DSS	Disuccinimidyl suberate Εστέρας του υδροξυηλεκτριμίδιου
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea αιθυλνιτροζουρία
GST	Glutathione S-Transferase Τρανσφεράση της γλουταθειόνης
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor Παράγοντας διέγερσης αποικιών μακροφάγων
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells Πυρηνικός Παράγοντας-κΒ
NFATc1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 Πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων, κυτοπλασματικού 1
OPG	Osteoprotegerin Οστεοπροτεγερίνη
OVX	Ovariectomy Ωοθηκεκτομή
PTH	Parathyroid Hormone παραθυροειδής ορμόνη
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κB Υποδοχέας Ενεργοποίησης του Πυρηνικού Παράγοντα-κΒ
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand Προσδέτης του Υποδοχέα Ενεργοποίησης του Πυρηνικού Παράγοντα-κΒ
Tg	Transgenic διαγονιδιακό
tlcs	toothless
TNF	Tumor Necrosis Factor Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό
WT	Wild type άγριου-τύπου
μCT	Micro-Computed Tomography Μικρο-υπολογιστική τομογραφία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΟΣΤΑ	2
1.1.1 ΔΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ.....	2
1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	4
1.2.1 ΟΣΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ (BONE MODELING)	4
1.2.2 ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ (BONE REMODELING)	5
1.3 ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ ΣΤΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	9
1.3.1 ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΕΣ.....	9
1.3.2 ΟΣΤΕΟΚΥΤΤΑΡΑ	10
1.3.3 ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ.....	11
1.4 Η ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF).....	14
1.4.1. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΜΕΝΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ TNF ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ	14
1.4.2. Η ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ TNF ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ	16
1.5 ΠΡΟΣΔΕΤΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ-KB (RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR-KB LIGAND – RANKL)	17
1.5.1 ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗΣ RANKL.....	17
1.5.2 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗΣ RANKL	19
1.5.3 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ RANKL.....	20
1.5.4 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΤΗΣ RANKL ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΖΩΪΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ.....	21
1.5.5 RANKL ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ	22
1.5.6 RANK	24
1.5.6.1 Εντοπισμός του υποδοχέα RANK	25
1.5.6.2 Μεταλλάξεις στον RANK σε ασθενείς και ζωικά πρότυπα	26
1.5.7 OPG	26
1.5.7.1 Εντοπισμός της OPG.....	28
1.5.7.2 Ρύθμιση της έκφρασης της OPG.....	29
1.5.7.3 Μεταλλάξεις της OPG σε ασθενείς και ζωικά μοντέλα	29
1.5.7.4 Μηχανισμός δράσης της OPG στον οστικό μεταβολισμό	29
1.5.8 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΤΟΥ RANKL.....	31
1.6 RANKL ΚΑΙ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ	32
1.7 ΟΣΤΕΟΠΕΤΡΩΣΗ	33
1.7.1 RANKL-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΟΣΤΕΟΠΕΤΡΩΣΗ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ (ARO)	34
1.7.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ RANKL-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗΣ ΟΣΤΕΟΠΕΤΡΩΣΗΣ	34
1.7.3 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΣ RANKL-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗΣ ΟΣΤΕΟΠΕΤΡΩΣΗΣ (ARO)	36
1.8 ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ	37
1.8.1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ.....	38
1.8.2 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ.....	40
1.8.2.1 Οσteo-καταβολικά Φάρμακα.....	40
1.8.2.2 Οσteo-αναβολικά Φάρμακα	43
1.8.3 ΝΕΟΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ	44
1.8.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ	48
1.9 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	53
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	54
2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΤΟΥ RANKL ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ	54
2.1.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ RANKL ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΣΤΟ ΡGEX-6P1	54
2.1.2 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ RANKL ^{G278R} ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΣΤΟ ΡGEX-6P1	56
2.2 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΤΙΚΗΣ RANKL ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	57
2.2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ RANKL ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΣΤΟ ΡGEX-6P1	57
2.3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΤΟΥ HUMAN TNF	62
2.3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ TNF ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΣΤΟ ΡGEX-6P1	62
2.3.2 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ TNF^{G249R} ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΣΤΟ ΡGEX-6P1.....	63
2.4 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΩΝ ΤΟΥ HUMAN BAFF	65
2.4.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ BAFF ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΣΤΟ ΡGEX-6P1.....	65
2.4.2 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ BAFF ^{G249R} ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΣΤΟ ΡGEX-6P1	67
2.5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΚΤΙΚΩΝ XL-1 ΒΛΕΒ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΗΛΕΚΤΡΟΠΟΡΩΣΗΣ	69
2.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR Η ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΙΩΔΙΟΥΧΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ (ΝΑΙ)	70
2.7 ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΜΕ ΛΙΓΑΣΗ	71
2.8 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ XL-1 ΒΛΕΒ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΠΟΡΩΣΗ	71
2.9 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MINI PREP-BOILING METHOD).....	72
2.10 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MIDI PREP)	73
2.11 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ	73
2.12 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΚΤΙΚΩΝ BL21 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΜΕ ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΟΚ.....	74
2.13 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ BL21 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΟΚ.....	75
2.14 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΚΚΡΙΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	76
2.14.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD.....	79
2.15 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS, PAGE) ΚΑΙ ΑΝΟΣΟ-ΣΤΥΠΩΜΑ WESTERN (WESTERN IMMUNO - BLOT)	80
2.15.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΜΕ ΔΩΔΕΚΥΛΟ ΘΕΪΙΚΟ ΝΑΤΡΙΟ (SODIUM DODECYL SULFATE, SDS) ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS, PAGE)	80
2.15.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΜΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (NATIVE GEL ELECTROPHORESIS, NATIVE-PAGE)	82
2.15.3 ΜΕΤΑΦΟΡΑ (TRANSFER) ΚΑΙ ΑΝΟΣΟ-ΣΤΥΠΩΜΑ WESTERN	83
2.15.4 ΧΡΩΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ (COOMASSIE STAINING)	86
2.16 CROSS-LINKING	87
2.16.1 CROSS LINKING - ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	87
2.17 ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΕΩΣ ΜΕ ΣΥΝΔΕΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ (ELISA)	88
2.18 ΔΟΚΙΜΗ RANKL ΕΠΑΓΩΜΕΝΗΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΠΡΟΔΡΟΜΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ.....	90
2.18.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΙΘΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΑΠΟ ΜΑΚΡΑ ΟΣΤΑ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ C57/BL6	91
2.18.2 ΔΟΚΙΜΗ ΜΕΣΩ RANKL ΕΠΑΓΩΜΕΝΗΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ-TRAP	92
2.18.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ RANKL ΣΕ ΔΟΚΙΜΕΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗΣ	94
2.19 ΔΟΚΙΜΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΩΝ (TRAP ACTIVITY ASSAY).....	94

2.20 ΔΟΚΙΜΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ ΜΤΤ (ΜΤΤ ΤΟΧΙCITY ASSAY)	96
2.21 ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΟΝΤΙΚΩΝ	97
2.22 ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΖΩΑ	98
2.23 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	105
2.23.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΟΥΡΕΣ ΠΟΝΤΙΚΩΝ	105
2.23.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR).....	105
2.23.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	106
2.24 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ MRNA.....	108
2.24.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΟΥΡΙΑΣ / ΧΛΩΡΙΟΥΧΟΥ ΛΙΘΙΟΥ	108
2.24.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ RNA –ΈΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΚΕΡΑΙΟΤΗΤΑΣ	109
2.24.3 ΣΥΝΘΕΣΗ CDNA	110
2.24.4 ΠΟΣΟΤΙΚΟ PCR ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (qPCR).....	111
2.25 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	113
2.25.1 ΣΚΙΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΜΗΣΗ	113
2.25.2 ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗΣ/ΗΩΣΙΝΗΣ	113
2.26 ΜΙΚΡΟΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (MCT ANALYSIS)	114
2.26.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΣΑΡΩΣΗ	115
2.26.2 ΣΑΡΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟΓΡΑΦΟ SKYSCAN1172	115
2.26.3 ΑΝΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΑΡΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ NRECON.....	117
2.26.4 ΚΥΡΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΟΥ ΣΠΟΓΓΩΔΟΥΣ ΚΑΙ ΦΛΟΙΩΔΟΥΣ ΟΣΤΟΥΝ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ CTAN	118
2.27 ΧΡΩΣΗ ΛΙΠΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΟΥ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΜΕ ΤΕΤΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΟΣΜΙΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟΓΡΑΦΟ ΥΨΗΛΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	118
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	120
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ 1^ο	120
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ 1^ο: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΙΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ RANKL ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΟΣΤΕΟΠΕΤΡΩΣΗ.....	121
3.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ TLES ΠΟΝΤΙΚΩΝ	121
3.2 ΕΥΡΕΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ	123
3.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ G278R ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ.....	125
3.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ RANKL^{G278R} ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΕΜΠΟΔΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ RANKL ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ.....	131
3.5 ΠΑΡΟΜΟΙΑ ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΑΛΛΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ TNF ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΡΙΜΕΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑΣ	135
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο	141
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ 2^ο.....	141
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ 2^ο: ΔΟΚΙΜΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ RANKL ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ ΤΟΝ ΤΡΙΜΕΡΙΣΜΟ ΤΟΥ.....	142
4.1 ΤΟ ΜΙΚΡΟ ΜΟΡΙΟ SPD-304 ΑΝΑΣΤΕΛΛΕΙ ΤΗΝ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ RANKL.....	142
4.2 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ SPD-304 ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ RANKL ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	145
4.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ PRA2.2	152
4.4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ PRA6.2.12 ΚΑΙ PRA6.2.13.....	156
4.5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ PRA5.2.8	158
4.6. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ PRA8.2.8	159

4.7. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ PRA9.2.8	160
4.8. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΩΝ SPD-304 ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ RANKL ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	161
4.9. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ SPD-304 ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ-ΣΤΟΧΟ RANKL ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	162
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο	164
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ 3 ^ο	164
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ 3 ^ο : ΝΕΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΟ HURANKL.....	165
5.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ RANKL ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	165
5.2 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ RANKL ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ ΣΤΑ TG5516 ΚΑΙ TG5519 ΠΟΝΤΙΚΙΑ	167
5.3 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ TG5516 ΠΟΝΤΙΚΩΝ.....	172
5.4 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΠΟΓΓΩΔΟΥΣ ΟΣΤΟΥ ΣΤΑ TG5516 ΠΟΝΤΙΚΙΑ ΜΕ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	173
5.5 ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ TG5519 ΠΟΝΤΙΚΩΝ.....	177
5.6 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΠΟΓΓΩΔΟΥΣ ΚΑΙ ΦΛΟΙΩΔΟΥΣ ΟΣΤΟΥ ΣΤΑ TG5519 ΠΟΝΤΙΚΙΑ ΜΕ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	181
5.7 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΣΠΟΓΓΩΔΟΥΣ ΟΣΤΟΥ ΣΤΟΥΣ ΣΠΟΝΔΥΛΟΥΣ ΤΗΣ ΟΣΦΥΪΚΗΣ ΜΟΙΡΑΣ ΤΩΝ TG5519 ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	184
5.8 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΛΙΠΩΔΟΥΣ ΙΣΤΟΥ ΣΤΟ ΜΗΡΙΑΙΟ ΟΣΤΟ ΤΩΝ TG5519 ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	187
5.9 ΔΙΑΣΩΣΗ ΤΟΥ RANKL ^{TLES/TLES} ΟΣΤΕΟΠΕΤΡΩΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΜΕ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ HURANKL ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.....	189
5.10 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ DENOSUMAB ΣΤΟ TG5519 ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ	191
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο -ΣΥΖΗΤΗΣΗ	193
6.1 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ G278R ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΑΠΟΤΡΙΜΕΡΙΣΜΟ ΤΗΣ RANKL ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	194
6.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ RANKL ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ ΤΟΝ ΤΡΙΜΕΡΙΣΜΟ ΤΟΥ	200
6.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΠΟΝΤΙΚΩΝ ΠΟΥ ΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΟΝ HURANKL ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ RANKL.....	205
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	212
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	227

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

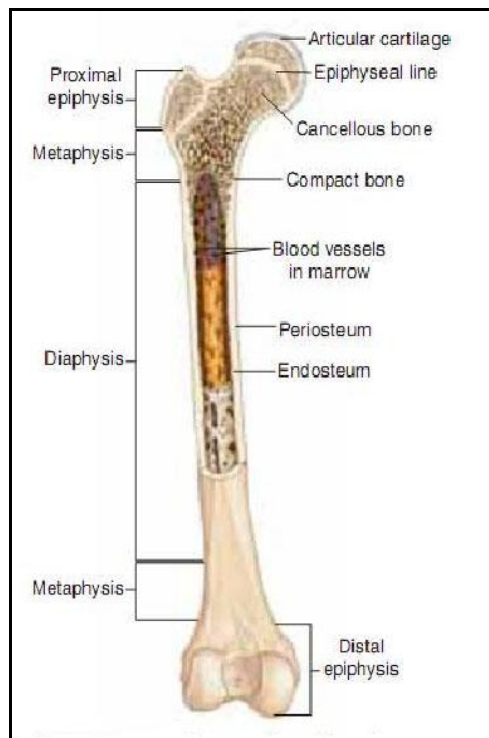
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οστά

1.1.1 Δομικά στοιχεία των Οστών

Το ανθρώπινο σκελετικό σύστημα αποτελείται συνολικά από 213 οστά, τα οποία διακρίνονται ανάλογα με το σχήμα τους σε 4 κατηγορίες: τα μακρά (Εικ. 1), τα βραχέα, τα πλατιά και τα ακανόνιστου σχήματος οστά (Steele DG 1988). Τα οστά δεν είναι ούτε μορφολογικά ούτε μηχανικά ομοιογενή, αλλά η ανομοιογένειά τους όχι μόνο δεν εμποδίζει την λειτουργική τους προσαρμογή, αλλά αντίθετα συνεισφέρει σ' αυτή.

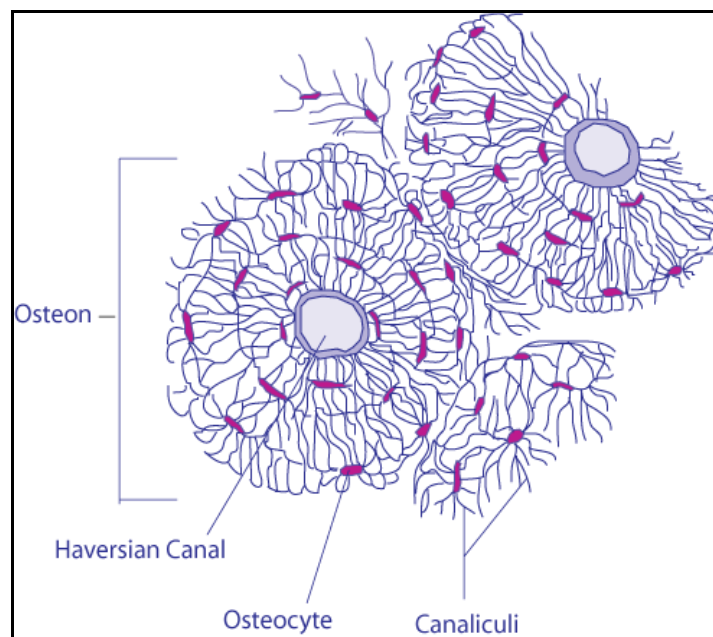


Εικόνα 1.1. Ανατομία μακρών οστών (Bianco,1992).

Διακρίνονται δύο τύποι οστίτη ιστού, το φλοιώδες (cortical or compact) και το σπογγώδες (trabecular or cancellous). Το φλοιώδες οστό είναι σκληρό, ικανό να αντέξει το βάρος και τις μηχανικές πιέσεις και περιβάλλει την κοιλότητα του μυελού των οστών. Στις κεφαλές των οστών βρίσκεται το σπογγώδες οστό το οποίο σχηματίζει ένα κυψελοειδές πλέγμα από μικροδοκίδες διάσπαρτες μέσα στο χώρο του μυελού των οστών και έχει την ιδιότητα να μπορεί να απορροφά την ενέργεια από τους κραδασμούς. Το ανθρώπινο σκελετικό σύστημα αποτελείται από 80% φλοιώδους οστού και 20% σπογγώδους οστού (Clarke 2008). Ανάμεσα στα διαφορετικά οστά αλλά και περιοχές του σκελετού παρατηρούνται διαφορετικές

αναλογίες του φλοιώδους και σπογγώδους οστού. Για παράδειγμα, οι σπόνδυλοι αποτελούνται από φλοιώδες και σπογγώδες οστό σε αναλογία 25:75. Αυτή η αναλογία φτάνει 50:50 στην περιοχή της κεφαλής του μηριαίου και 95:5 στην περιοχή της μέσο-διάφυσης του μηριαίου. Τόσο οι περιοχές του φλοιώδους όσο και του σπογγώδους αποτελούνται από οστεώνες (Clarke 2008).

Ο φλοιώδης οστεώνας ονομάζεται Σύστημα Havers και αποτελεί την δομική του μονάδα. Έχει κυλινδρική δομή και σχηματίζει ένα δίκτυο ομόκεντρων πετάλων οστού μέσα στο φλοιώδες οστό (Eriksen EF, Axelrod DW 1994). Στο κέντρο διαθέτει αβέρσιο σωλήνα με αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και χαλαρό (αραιό) συνδετικό ιστό. Στο τοίχωμά του είναι ορατές οστικές κοιλότητες με οστεοκύτταρα και οστικά τριχοειδή σωληνάκια (οστικά σωληνάκια) με αποφύσεις οστεοκυττάρων. Οι σωλήνες Havers επικοινωνούν μεταξύ τους διαμέσου των σωληνών Volkmann οι οποίοι διατρύπουν λοξά ή κάθετα τους αβέρσιους σωλήνες (Εικ. 2). Ο σπογγώδης οστεώνας έχει ημισεληνοειδή δομή πάχους περίπου 35mm με ομόκεντρη στιβαδοειδή δομή. Υπολογίζεται ότι ένας υγιής ενήλικας έχει περίπου 14×10^6 σπογγώδεις οστεώνες που καλύπτουν μία έκταση περίπου 7 m^2 (Eriksen EF, Axelrod DW 1994).



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση της δομής του συστήματος Havers (Clarke 2008).

Το φλοιώδες οστό αποτελείται από μία εξωτερική επιφάνεια την περι-οστική και μία εσωτερική την ενδο-οστική. Στην περι-οστική επιφάνεια παρατηρείται αυξημένη οστική δράση που συμβάλλει σημαντικά στην σκελετική ανάπτυξη αλλά και την αποκατάσταση καταγμάτων. Η οστική παραγωγή συνήθως είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την οστική απορρόφηση στην περιοστική επιφάνεια του φλοιώδους, με αποτέλεσμα την αύξηση της

διαμέτρου των οστών. Αντίθετα, στην ενδο-οστική επιφάνεια του φλοιώδους παρατηρείται μεγαλύτερη οστική ανακατασκευή με έντονη οστική απορρόφηση και μειωμένη οστική παραγωγή, φαινόμενο που ίσως αποδίδεται σε ισχυρές εμβιομηχανικές πιέσεις αλλά και στην άμεση επαφή της ενδο-οστικής επιφάνειας με τα κύτταρα του μυελού των οστών. Το περίοστεο (periosteum) είναι ένα ινώδες έλυτρο συνδετικού ιστού που περιβάλλει την εξωτερική επιφάνεια του φλοιώδους οστού το οποίο περιέχει αιμοφόρα αγγεία, νευρικές απολήξεις, οστεοβλάστες και οστεοκλάστες. Το περίοστεο προσκολλάται πολύ στενά με την εξωτερική επιφάνεια του φλοιώδους μέσω ινών κολλαγόνου. Το ενδόστεο (endosteum) από την άλλη είναι μεμβρανικής φύσεως όπου καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια του φλοιώδους και σπογγώδους οστού καθώς και τα κανάλια των αιμοφόρων αγγείων που διαπερνούν τα οστά και είναι σε επαφή με τον χώρο του μυελού των οστών, τους οστεοβλάστες και οστεοκλάστες (Clarke 2008).

Τα οστά παρότι θεωρούνται οι σκληρότερες δομές σε έναν οργανισμό, αποτελούν μια δυναμική δομή από οστίτη ιστό, αγγεία, νεύρα και οστικά 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, ίχνη από κολλαγόνο τύπου III και V, τα οποία του παρέχουν ελαστικότητα, ενώ το ανόργανο μέρος από κρυστάλλους υδροξυαπατίτη ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) με άλατα, κυρίως φωσφορικού ασβεστίου, φωσφορικού μαγνησίου και ανθρακικά άλατα του ασβεστίου, νατρίου και καλίου. Τα άλατα παρέχουν στα οστά την απαραίτητη ανθεκτικότητα και σκληρότητα (Steele DG 1988).

1.2 Βιολογία των Οστών

1.2.1 Οστική Κατασκευή (Bone Modeling)

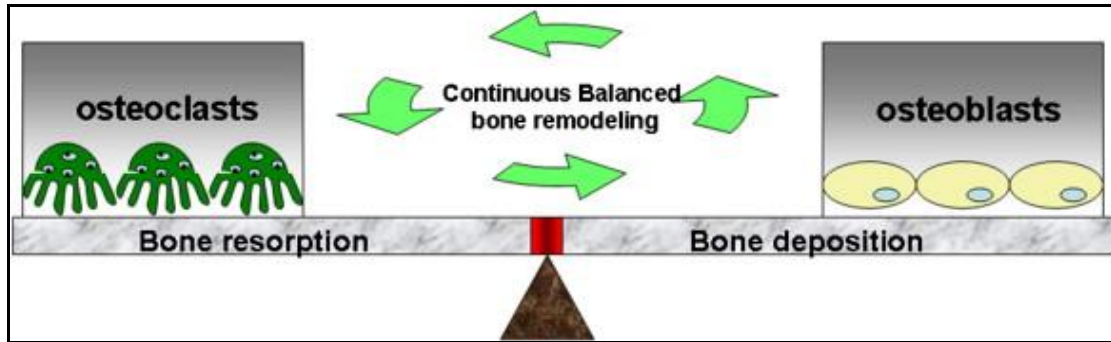
Τα οστά υφίστανται μία συνεχή ανάπτυξη τόσο κατά μήκος όσο και ακτινωτά κατά την διάρκεια της παιδικής και εφηβικής ηλικίας. Η κατά μήκος ανάπτυξη των οστών λαμβάνει μέρος στην αναπτυξιακή πλάκα (growth plate) όπου παρατηρείται έντονος πολλαπλασιασμός των κυττάρων του χόνδρου στην επιφυσσιακή και μεταφυσσιακή περιοχή των μακρών οστών. Ακολουθώντας πραγματοποιείται επιμετάλλωση και ο σχηματισμός νέου πρωτογενούς οστού.

Η οστική παραγωγή είναι μία διαδικασία κατά την οποία τα οστά αναπτύσσονται αλλάζοντας σε μέγεθος και σχήμα συναρτήσει φυσιολογικών επιδράσεων και μηχανικών καταπονήσεων. Τα οστά μπορεί να αυξάνονται σε πάχος ή να τροποποιείται ο άξονας ανάπτυξής τους με την

προσθήκη ή αφαίρεση οστίτη ιστού από τις επιφάνειες μέσω της δράσης των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών, αντίστοιχα, σε απόκριση εμβιομηχανικών πιέσεων. Κατά την διάρκεια της οστικής κατασκευής, η οστική παραγωγή υπερτερεί της οστικής απορρόφησης. Αυξημένη οστική παραγωγή παρατηρείται ακόμη και σε παθήσεις όπως υποπαραθυροειδισμός (Ubara et al. 2005), νεφρική οστεοδυστροφία (Ubara et al. 2003) ή σε θεραπείες με αναβολικούς παράγοντες (Lindsay et al. 2006).

1.2.2 Οστική Ανακατασκευή (Bone Remodeling)

Κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής ενός σπονδυλόζωου, τα οστά του ανακατασκευάζονται μονίμως από τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες που βρίσκονται σε συνεχή συνεργασία. Η δομική ακεραιότητα των οστών διατηρείται μέσω μιας δυναμικής διαδικασίας που είναι γνωστή ως οστική ανακατασκευή (Bone Remodeling). Μέσω αυτής επιτυγχάνεται η ανανέωση του σκελετού, η επιδιόρθωση των μικροφθορών των μικρομονάδων του, η σταθερότητα των τιμών του ιονισμένου ασβεστίου του εξωκυττάριου χώρου και η προσαρμογή της ποσότητας του οστού στις εκάστοτε μηχανικές ανάγκες του σκελετού. Η οστική ανακατασκευή είναι το αποτέλεσμα δύο αντίρροπων λειτουργικών διαδικασιών, της οστικής παραγωγής που επιτελείται από τους οστεοβλάστες και της οστικής απορρόφησης που επιτελείται από τους οστεοκλάστες. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι δύο διαδικασίες βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους εξασφαλίζοντας την σκελετική ακεραιότητα. 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 τριαντάχρονου ενήλικα ανανεώνεται πλήρως κάθε 10 χρόνια, ενώ ανά πάσα στιγμή ανακατασκευάζεται το 4% της ολικής οστικής επιφάνειας. Η συνεργασία αυτή μεταξύ οστεοκλαστών-οστεοβλαστών ονομάζεται φαινόμενο σύζευξης (coupling) και αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της σωστής οστικής ανακατασκευής (Εικ.3) (Hill 1998). Η οστική ανακατασκευή συνήθως λαμβάνει μέρος σε τυχαίες θέσεις ή στοχευμένα σε θέσεις που χρήζουν αποκατάστασης έπειτα από κάποιο κάταγμα (Burr 2002; Parfitt 2002). Η διατάραξη, αντίθετα, αυτής της ισορροπίας ονομάζεται αποσύζευξη και αποτελεί την κύρια αιτία πρόκλησης μεταβολικού νοσήματος όπως είναι η οστεοπόρωση που χαρακτηρίζεται από αυξημένη οστική απώλεια (Trouvin & Goëb 2010).



Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου σύζευξης (coupling) κατά την οστική ανακατασκευή μεταξύ οστεοκλαστών και οστεοβλαστών υπό φυσιολογικές συνθήκες (Hill 1998).

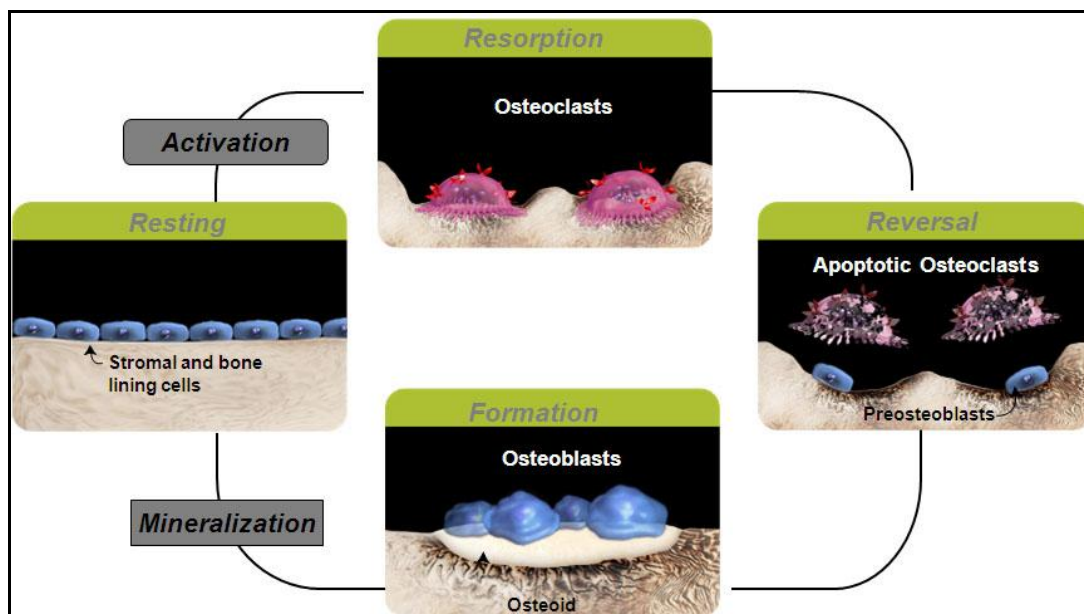
Η διαδικασία της οστικής ανακατασκευής διενεργείται σε 4 φάσεις (Εικ. 1.4) : α) τη φάση ενεργοποίησης, β) τη φάση οστικής απορρόφησης, γ) τη φάση κυτταρικής αναστροφής και δ) τη φάση οστικής παραγωγής (Raggatt & Partridge 2010). Ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή των φάσεων αυτών.

A) Φάση ενεργοποίησης (Activation phase): Ενεργοποιείται η οστική επιφάνεια μέσω απομάκρυνσης των επενδυματικών κυττάρων και πέψης της μεμβράνης του ενδόστεου από τη δράση της πρωτεάσης κολλαγενάσης. Παράλληλα, οι πρόδρομοι οστεοκλάστες ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, συντήκονται σε πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα, τους ώριμους οστεοκλάστες, οι οποίοι τελικά συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του οστού. Η φάση της ενεργοποίησης διαρκεί τόσο στο σπογγώδες όσο και στο φλοιώδες οστό 5-7 ημέρες.

B) Φάση οστικής απορρόφησης (Resorption phase): Οι επιστρατευμένοι οστεοκλάστες προσκολλούνται στην οστική επιφάνεια και με την δράση οστεολυτικών οξέων και πρωτεϊνολυτικών ξεκινούν προοδευτικά την οστική αποικοδόμηση. Στο σπογγώδες οστό η φάση της οστικής απορρόφησης διαρκεί 10 ημέρες ενώ στο φλοιώδες 6-10 εβδομάδες.

Γ) Φάση κυτταρικής αναστροφής (Reversal phase): οι οστεοκλάστες αποκολλώνται και απομακρύνονται από το πυθμένα της κοιλότητας που δημιουργείται κατά την οστική απορρόφηση (βοθρίο του Howship) μόλις κορεσθούν από ιόντα ασβεστίου ή πεθαίνουν με απόπτωση, και στη θέση τους εμφανίζονται οι οστεοβλάστες. Στην φάση αυτή μονοπύρρηνα κύτταρα αδιευκρίνιστης ακόμα προέλευσης, απομακρύνουν τα υπολείμματα κολλαγόνου και προετοιμάζουν την οστική επιφάνεια για την επόμενη φάση της οστικής παραγωγής.

Δ) Φάση οστικής παραγωγής και επιμετάλλωσης (Formation phase): Οι προ-οστεοβλάστες προσελκύονται χημειοτακτικά από τους αυξητικούς παράγοντες (TGF-β, IGF-I, IGF-II, BMPs) που έχουν απελευθερωθεί στην οστική θεμέλια ουσία και διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες οι οποίοι συνθέτουν και εναποθέτουν προοδευτικά θεμέλια ουσία (κυρίως κολλαγόνου τύπου I) που δεν έχει επιμεταλλωθεί ακόμα (οστεοειδές). Το νεοσυντιθέμενο οστό είναι ισόποσο εκείνου που απορροφήθηκε στις προηγούμενες φάσεις. Η φάση οστικής παραγωγής διαρκεί 3 μήνες. Η μεταβολική μονάδα του οστού αδρανοποιείται, επιστρώνεται ξανά από επενδυματικά κύτταρα και λειτουργεί σαν μικροκατασκευαστική μονάδα του οστού. Η φάση της επιμετάλλωσης, όπου ενσωματώνεται υδροξυαπατίτης στο οστεοειδές, ξεκινά 30 ημέρες μετά την απόθεση του οστεοειδούς και σταματά την 90η ημέρα για το σπογγώδες οστό και την 130η ημέρα για το φλοιώδες οστό. Ακολουθεί η φάση ηρεμίας και η διαδικασία ολοκληρώνεται.



Εικόνα 1.4. Οι φάσεις της οστικής ανακατασκευής και τα κύτταρα του οστικού μεταβολισμού που συμμετέχουν σε κάθε φάση (Raggatt, 2010).

Η οστική ανακατασκευή ρυθμίζεται από γενετικούς, συστηματικούς (Πιν.1.Ι) και τοπικούς παράγοντες (Πιν. 1.ΙΙ). Κυριότεροι είναι οι αυξητικοί παράγοντες και οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που με την έκκρισή τους μπορούν να προκαλέσουν τόσο θετικό όσο και αρνητικό ισοζύγιο οστού *in vivo* και *in vitro*. Όπως έχει αποδειχτεί τα τελευταία χρόνια, τον σημαντικότερο ρόλο στην ρύθμιση της οστικής απορρόφησης διαδραματίζει ο προσδέτης του υποδοχέα ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα-κΒ (Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand, RANKL), που ανήκει στην υπερικογένεια του Παράγοντα Νέκρωσης

Όγκων, TNF (Tumor Necrosis Factor), παράλληλα με τον υποδοχέα του RANK και τον ανταγωνιστή του υποδοχέα, την οστεοπροτεγερίνη (OPG). Η κυτταροκίνη RANKL αποτελεί μόριο «κλειδί» στην οστική απορρόφηση καθώς διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην δημιουργία, επιβίωση και ενεργότητα των οστεοκλαστών (Boyce & Xing 2008; Kim et al. 2005).

Συστημικοί Παράγοντες	Οστική Απορρόφηση	Οστική Παραγωγή
Οιστρογόνα	↓	↓
Καλσιτονίνη	↓	—
Θυροειδείς Ορμόνες	↑	↑
Κορτικοστεροειδή	↑	↓
Αυξητική Ορμόνη	↑	↑
Παραθορμόνη	↑	↑
1,25 (OH) ₂ Βιταμίνη D	↑	↑

Πίνακας 1.1. Συστημικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την οστική ανακατασκευή. (↑) αύξηση, (↓) μείωση, (-) αμετάβλητη (Lawrence G. Raisz , 1999).

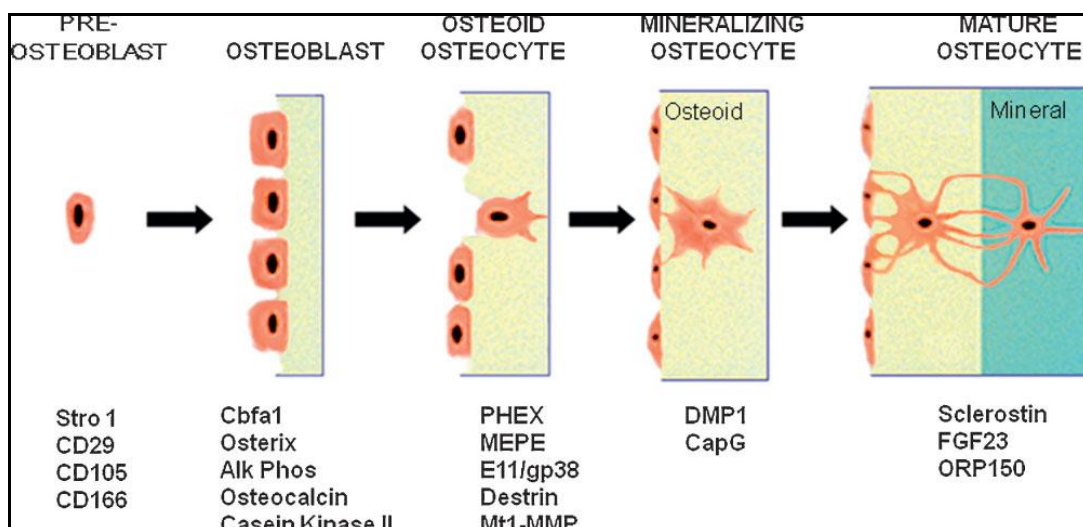
Τοπικοί Παράγοντες	Οστική Απορρόφηση	Οστική Παραγωγή
OPG/RANKL/RANK	↑	↓
TNF- α	↑	
MCSF-1	↑	
IFN- γ	↓	
TGF- β		↑
BMPs		↑
IGF-I, IGF-II		↑
PDGF		↑
IL-1, IL-4, IL-6, IL-11	↑	
IL-18	↓	

Πίνακας 1.11. Τοπικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την οστική ανακατασκευή. (↑) αύξηση, (↓) μείωση, (-) αμετάβλητη (Lorenzo 2008).

1.3 Κύτταρα που συμμετέχουν στις μεταβολικές διεργασίες των Οστών

1.3.1 Οστεοβλάστες

Οι οστεοβλάστες είναι τα μοναδικά κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την οστική παραγωγή. Προέρχονται από πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες (Pittenger et al. 1999; Dennis et al. 1999). Διακρίνονται 4 στάδια διαφοροποίησης των οστεοβλαστών: 1) προ-οστεοβλάστες, 2) ώριμοι οστεοβλάστες, 3) οστεοκύτταρα και 4) κύτταρα που επενδύουν τα οστά (bone-lining cells) (Εικ. 1.5).



Εικόνα 1.5. Σχηματική απεικόνιση των σταδίων διαφοροποίησης των οστεοβλαστών. Σε κάθε στάδιο διαφοροποίησης απεικονίζονται τα γονίδια-δείκτες που εκφράζονται (Bonewald 2011).

Κάτω από κατάλληλες επιδράσεις τα πρόδρομα κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης διαφοροποιούνται σε προ-οστεοβλάστες τα οποία εκφράζουν αλκαλική φωσφατάση, ωστόσο δεν φέρουν χαρακτηριστικά λειτουργικά στοιχεία ώριμων οστεοβλαστών όπως είναι η επιμετάλλωση του οστίτη ιστού (Takahashi et al. 2008). Από προ-οστεοβλάστες διαφοροποιούνται σε ώριμους οστεοβλάστες που διακρίνονται για την κυβοειδή μορφολογία τους και τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης της αλκαλικής φωσφατάσης. Στο στάδιο αυτό προσέρχονται στην επιφάνεια των οστών σε θέσεις όπου επιτελείται ενεργή οστική παραγωγή. Οι οστεοβλάστες παράγουν κολλαγόνο τύπου I, βασική δομική μονάδα για τον οστίτη ιστό καθώς και άλλες πρωτεΐνες όπως την οστεοκαλσίνη και την αλκαλική φωσφατάση τα οποία είναι χρήσιμα κατά την διαδικασία της επιμετάλλωσης (Clarke 2008). Οι ώριμοι οστεοβλάστες αφού επιτελέσουν την βιολογική τους δράση ακολουθούν τρεις

διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες: είτε πεθαίνουν με απόπτωση, είτε διαφοροποιούνται περαιτέρω σε οστεοκύτταρα, είτε τέλος παραμένουν αδρανή κύτταρα κοντά στην επιφάνεια του οστού. Περίπου το 50-70% των οστεοβλαστών περνούν το στάδιο της απόπτωσης (Lynch et al. 1998). Ένα από τα σημαντικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την οστική παραγωγή στους οστεοβλάστες είναι το Wnt/ β -catenin μονοπάτι. Το Wnt μόριο προσδέεται σε ένα σύμπλοκο με τους υποδοχείς frizzled και LRP5/6 συνυποδοχείς. Απουσία πρόσδεσης του Wnt μορίου, η κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου (GSK-3 β) φωσφορυλιώνει το μόριο της β -κατενίνης με αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση και ακολούθως την αποδόμησή του στο πρωτεάσωμα. Αντίθετα, πρόσδεση του Wnt μορίου προκαλεί ενεργοποίηση του Dishevelled μορίου που παρεμποδίζει την δράση της GSK-3 β κινάσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μη αποδόμηση της β -κατενίνης και την μεταφορά της στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση και ενεργότητα των οστεοβλαστών (Westendorf et al. 2004; Huang & He 2008; Kubota et al. 2009). Άλλα σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν αναγνωριστεί και εμπλέκονται στην διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και στην οστική παραγωγή είναι τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TGF- β (Transforming growth factor-beta) και BMPs (bone morphogenic protein) (Chen et al. 2012).

Οι κυριότερες βιολογικές δράσεις των οστεοβλαστών είναι η οστική παραγωγή, ρυθμίζοντας την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών μέσω των μορίων M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), RANKL και OPG που παράγουν (Takahashi et al. 1999). Επίσης, ρυθμίζουν την μετακίνηση των πρόδρομων οστεοκλάστων με την απελευθέρωση χημειοτακτικών παραγόντων όπως της οστεοκαλσίνης και του κολλαγόνου τύπου I (Malone et al. 1982). Τέλος, άλλοι παράγοντες που εκλύονται από τους οστεοβλάστες έχειδειχθεί ότι επηρεάζουν έμμεσα την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών όπως η παραθυροειδής ορμόνη (PTH), η PTHrP, TNF- α , IL-1, 1,25-(OH) $_2$ βιταμίνη D $_3$ (Horwood et al. 1998; Martin 2005).

1.3.2 Οστεοκύτταρα

Οι οστεοβλάστες τελικώς διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα τα οποία ενσωματώνονται μέσα στην νεοσχηματισμένη θεμέλια ουσία του οστίτη ιστού (Bonewald 2011). Τα οστεοκύτταρα είναι μικρότερα σε μέγεθος από τους οστεοβλάστες και χαρακτηρίζονται από απουσία οργανιδίων στο κυτταρόπλασμα (Aubin 1998). Εντοπίζονται μέσα σε σχισμές (lacunae) στον οστίτη ιστό και όπου παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα έως ότου τελικώς γίνεται απόπτωσή τους. Μορφολογικά, τα οστεοκύτταρα σχηματίζουν ένα δίκτυο από δενδροειδείς απολήξεις, πλούσιες σε ακτίνη (Dudley & Spiro 1961; Tanaka-Kamioka et

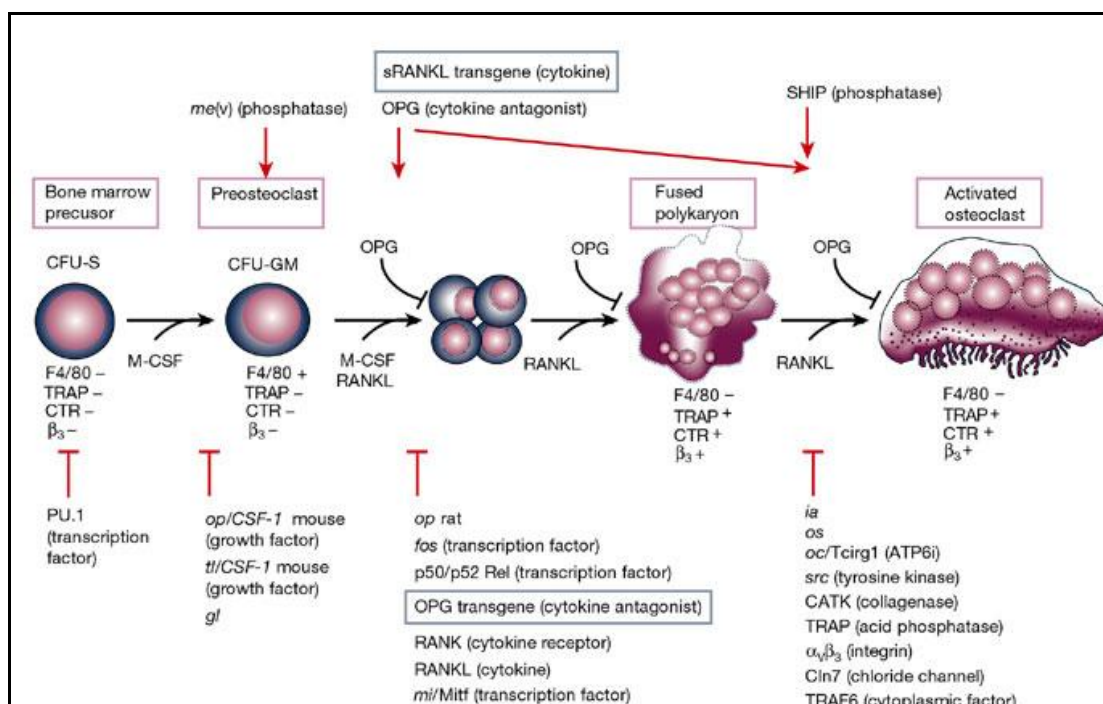
al. 1998). Η βασική λειτουργική τους δράση εστιάζεται στην απόκριση σε μια σειρά μηχανικών επιδράσεων ως βιοαισθητήρες (Cowin et al. 1991). Μικροκατάγματα του οστίτη ιστού οδηγούν στην απόπτωση των οστεοκυττάρων με αποτέλεσμα αύξηση της οστικής ανακατασκευής. Τα οστεοκύτταρα παράγουν RANKL και μπορούν με την σειρά τους να διεγείρουν την ενεργότητα των οστεοκλαστών, οδηγώντας σε αυξημένη οστική ανακατασκευή. Ειδικότερα, τα ποντίκια στα οποία έχει γίνει απαλειφή του RANKL μόνο στα οστεοκύτταρα εμφανίζουν οστεοπετρωτικό φαινόμενο, αποδεικνύοντας ότι τα οστεοκύτταρα αποτελούν την βασική πηγή παραγωγής RANKL κατά την διάρκεια της οστικής ανακατασκευής (Nakashima et al. 2011). Τέλος, έχει δειχθεί ότι τα οστεοκύτταρα παράγουν το μόριο της σκληροστίνης (sclerostin) που παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των οστικών αποκρίσεων έναντι εμβιομηχανικών επιδράσεων (Gaudio et al. 2010). Η σκληροστίνη «ταξιδεύει» μέσω του δικτύου των οστεοκυττάρων στην επιφάνεια του οστού, αναστέλλοντας την δράση του σηματοδοτικού Wnt/ β -catenin μονοπατιού με αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού και της βιολογικής δράσης των οστεοβλαστών, ενώ ακόμη ενισχύει την απόπτωσή τους (Li et al. 2005; van Bezooijen et al. 2007). Μία πρόσφατη μελέτη προτείνει ακόμη ότι η σκληροστίνη διεγείρει την δράση και τον σχηματισμό των οστεοκλαστών (Wijenayaka et al. 2011). Έτσι, φαίνεται ότι τα οστεοκύτταρα μέσω της δράσης της σκληροστίνης μπορούν να ρυθμίζουν την ενεργότητα τόσο των οστεοβλαστών όσο και των οστεοκλαστών.

1.3.3 Οστεοκλάστες

Η διαφοροποίηση και η σύντηξη των οστεοκλαστών αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία με την συμμετοχή διάφορων ρυθμιστικών παραγόντων. Υπό την παρουσία του παράγοντα διέγερσης αποικιών μακροφάγων (Macrophage Colony Stimulating Factor M-CSF), ο RANKL επάγει την οστεοκλαστογένεση. Ο M-CSF παράγεται από τους οστεοβλάστες και τα κύτταρα του στρώματος και είναι σημαντικός παράγοντας για την ωρίμανση των μακροφάγων ενώ πρόσδεσή του στον υποδοχέα c-Fms που εκφράζεται σε πρόδρομους οστεοκλάστες επάγει την διαφοροποίηση και επιβίωσή τους.

Ο M-CSF ανιχνεύθηκε αρχικά σαν ένας από τους σημαντικότερους παράγοντας της οστεοκλαστογένεσης καθώς είναι υπεύθυνος για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των πρόδρομων οστεοκλαστών και των μακροφάγων. Επάγει την έκφραση του RANK στην επιφάνεια των πρόδρομων οστεοκλαστών, καθιστώντας ικανή την πρόσδεση του RANKL σε αυτόν (Lagasse & Weissman 1997a). Οι οστεοκλάστες προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα της αιμοποιητικής σειράς (Εικ. 1.6). Η οστεοκλαστογένεση ξεκινά με τον πολλαπλασιασμό

και την επιστράτευση πρόδρομων οστεοκλαστών, τα οποία προέρχονται από την μυελική σειρά (Walsh et al. 2006). Ορμονικοί παράγοντες και κυτταροκίνες ρυθμίζουν την παραγωγή των οστεοκλαστών. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι μεταγραφικοί παράγοντες PU.1, FOS, NF-κB και MI καθώς και η κυτταροκίνη M-CSF και η SRC κινάση της τυροσίνης (Boyle et al. 2003). Στην συνέχεια, διαφοροποιούνται σε μονοπύρηνους προ-οστεοκλάστες, που σε μια πρώτη φάση είναι αρνητικοί για την ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) και ακολούθως γίνονται θετικοί (Εικ. 1.6). Ακολουθεί η σύντηξη των μονοπύρηνων οστεοκλαστών σε πολυπύρηνους οστεοκλάστες ή η σύντηξή τους με προϋπάρχοντες οστεοκλάστες ή ακόμα και σύντηξη πολυπύρηνων οστεοκλαστών σε μεγαλύτερους.

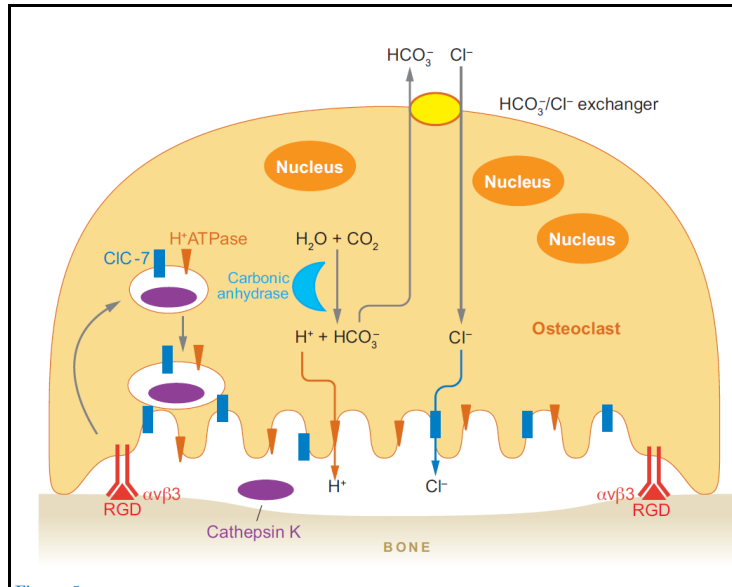


Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού οστεοκλαστογένεσης. Διακρίνονται τα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των οστεοκλαστών στα οποία ασκούν θετική επίδραση οι κρίσιμοι παράγοντες M-CSF και RANKL. Αντίθετα, ο OPG αναστολέας του RANKL ασκεί αρνητική επίδραση στην διαδικασία διαφοροποίησης των οστεοκλαστών. Κάτω σημειώνονται διάφορες σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδια τα οποία προκαλούν παρεμποδιστική επίδραση και από πάνω μεταλλάξεις σε γονίδια που έχουν θετική επίδραση στον μηχανισμό οστεοκλαστογένεσης (Boyle et al. 2003).

Οι ώριμοι οστεοκλάστες παρουσιάζουν κυτταρική πόλωση, δηλαδή μπορούν να απορροφούν οστό μόνο από την κροσσωτή τους επιφάνεια μέσα από την οποία εκκρίνονται οστεολυτικά οξέα, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υδρογόνου και πρωτεολυτικά ένζυμα όπως οι υδρολάσες και κυστεοπρωτεϊνάσες (καθεψίνη K) που επιτελούν την οστική απορρόφηση. Οι οστεοκλάστες όπως προαναφέρθηκε είναι μεγάλα πολυπύρηννα κύτταρα (10-20 πυρήνες) τα

οποία προέρχονται από κύτταρα της μυελικής σειράς (Suda et al. 1997). 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 μεμβράνη τους στο σημείο που βρίσκεται σε στενή επαφή με την προς απορρόφηση οστική επιφάνεια (Tilman B. Drüeke 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 (Väänänen 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 του οστού γίνεται από υδροχλωρικό οξύ (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 λυσοσωμικά 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 (Εικ. 1.7).

Άλλοι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την οστεοκλαστογένεση είναι ορισμένες 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).



Εικόνα 1.7. Σχηματική απεικόνιση της δομής των οστεοκλαστών και των μορίων που συμμετέχουν στη διαδικασία της οστικής απορρόφησης (Novack & Teitelbaum 2008).

1.4 Η ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)

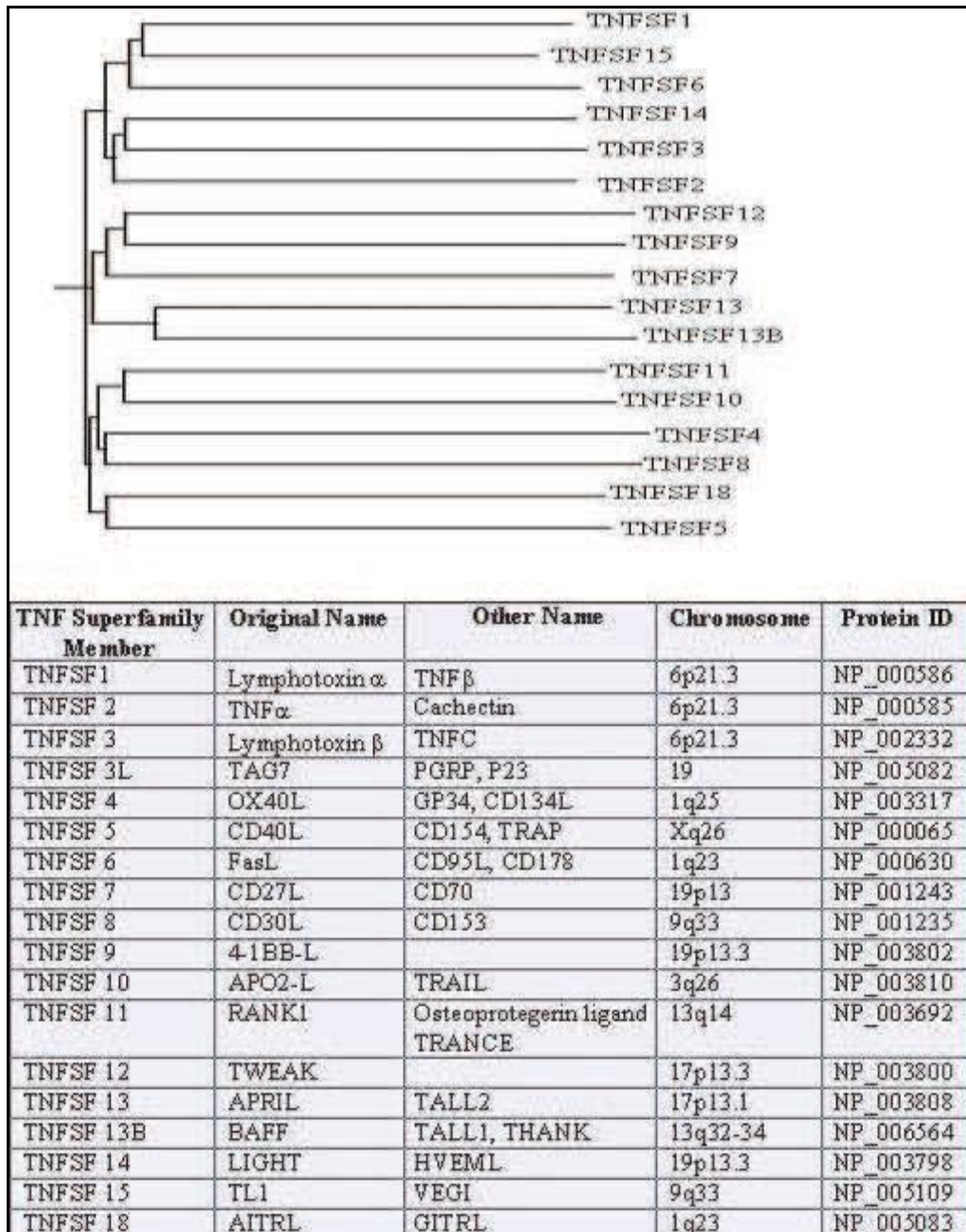
1.4.1. Αναγνωρισμένα μέλη της TNF υπεροικογένειας

Η TNF υπεροικογένεια σήμερα αποτελείται από 18 μέλη που μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά (Εικ. 1.8). 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.

Τα περισσότερα μέλη της TNF υπεροικογένειας συντίθενται ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου II, δηλαδή το άμινο τελικό άκρο τους εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Gruss & Dower 1995). Δομικά, χαρακτηρίζονται για μία μικρή κυτταροπλασματική περιοχή και ένα σχετικά μεγάλο εξωκυτταρικό τμήμα που μπορεί να διασπαστεί με τη δράση ειδικών πρωτεασών με την απελευθέρωση της εκκριτικής μορφής της πρωτεΐνης. Γενικά, ως εκκριτικές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες είναι ενεργές σαν ομοτρίμερη, παρότι ορισμένα μέλη μπορούν επίσης να υπάρχουν ως ετεροτρίμερη.

Τα μέλη της TNF υπεροικογένειας 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 1.8. 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 δενδρογράμματος. 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).

1.4.2. Η Υπεροικογένεια των TNF υποδοχέων

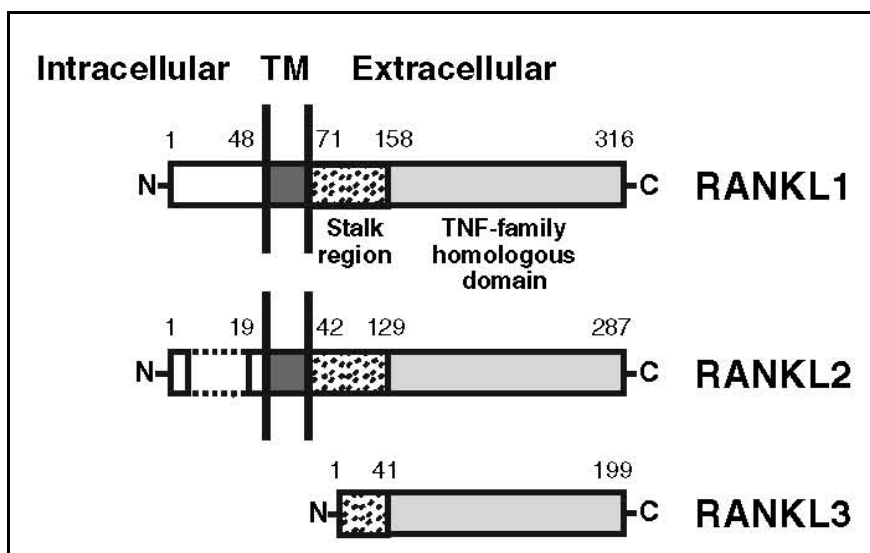
Περίπου 30 υποδοχείς για τις πρωτεΐνες της TNF υπεροικογένειας έχουν αναγνωριστεί στον άνθρωπο και το ποντίκι, αποτελώντας την υπεροικογένεια των TNF υποδοχέων (TNF receptor superfamily). Αυτοί οι υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I και χαρακτηρίζονται από την παρουσία χαρακτηριστικών περιοχών πλούσιων σε κυστεΐνες στο εξωκυτταρικό τμήμα τους (Aggarwal 2003). Κάθε μέλος της TNF υπεροικογένειας δένεται σε έναν ή περισσότερους εξειδικευμένους υποδοχείς με μεγάλη συγγένεια. 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.

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. 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, RANK CD40, CD30, CD27, LT-βR, OX40, 4-1BB, και BCMA. 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.

1.5 Προσδέτης του Υποδοχέα Ενεργοποίησης του Πυρηνικού Παράγοντα-κΒ (RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR-κΒ LIGAND – RANKL)

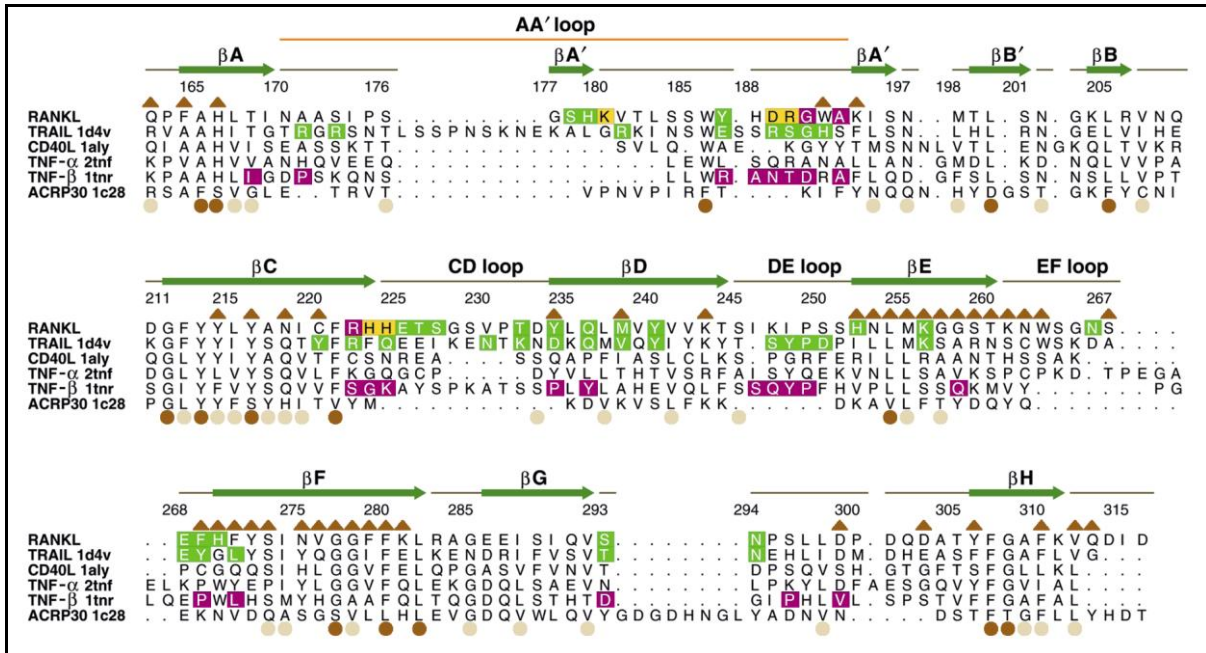
1.5.1 Δομή της κυτταροκίνης RANKL

Ο RANKL είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II όπου το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και το καρβοξυτελικό στην εξωκυττάρια περιοχή. Έχουν αναγνωρισθεί 3 ισομορφές για τον RANKL του ανθρώπου (Εικ. 1.9). Η κυριότερη ισομορφή, η RANKL1, είναι η διαμεμβρανική μορφή της πρωτεΐνης, μήκους 316 αμινοξέων. Η RANKL2 είναι επίσης διαμεμβρανική μορφή της πρωτεΐνης, από την οποία όμως, λείπει ένα μικρό ενδοκυττάριο τμήμα, μήκους 287 αμινοξέων. Τέλος, υπάρχει η RANKL3, η οποία είναι η εκκριτική μορφή της πρωτεΐνης, μήκους 199 αμινοξέων. Η εκκριτική μορφή της RANKL πρωτεΐνης που κυκλοφορεί στα βιολογικά υγρά 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.



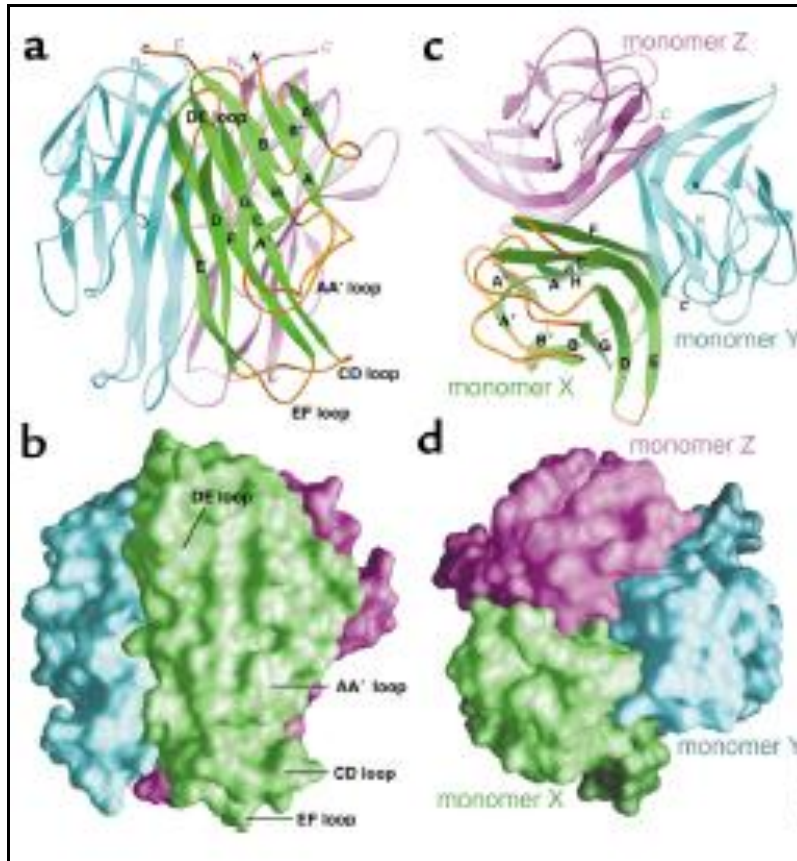
Εικόνα 1.9. Οι 3 ισομορφές της πρωτεΐνης RANKL. Οι RANKL1 και RANKL2 είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, ενώ η RANKL3 αποτελεί την εκκριτική μορφή της πρωτεΐνης (Ikeda et al. 2003).

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 φύλλο σχηματίζεται από τις 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 (Εικ. 1.10) (Lam et al. 2001).



Εικόνα 1.10. Δομική ευθυγράμμιση της εξωκυττάριας περιοχής των TRAIL, CD40L, TNF-α, TNF-β, και ACRP30 με την RANKL του ποντικού. Σχηματική απεικόνιση δευτεροταγών δομών στην πρωτεϊνική ακολουθία του RANKL όπως των 11 β-επιφανειών καθώς και οι θέσεις των τεσσάρων λούπων AA', CD, DE και EF (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 (Εικ. 1.11). 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 1.11. Κρυσταλλική δομή της RANKL πρωτεΐνης. Σχηματική απεικόνιση του τριμερούς της RANKL πρωτεΐνης είτε με κορδέλες (a,c) ή επιφάνειες (b,d) με προσανατολισμό από το πλάι (a, b) και από πάνω (c, d). Στην δομή με κορδέλες με πράσινο χρώμα παριστάνονται οι β-πτυχωτές επιφάνειες και πορτοκαλί οι λούπες ενός μονομερούς.

1.5.2 Ρύθμιση της κυτταροκίνης RANKL

Η έκφραση του RANKL από τα κύτταρα του στρώματος και τους οστεοβλάστες ρυθμίζεται από πληθώρα κυτταροκινών και ορμονικών παραγόντων (Πιν. 1.III). Μόρια που επάγουν οστεοκλαστογένεση, όπως η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), η ιντερλευκίνη-11 (IL-11), ο TNF καθώς η παραθορμόνη (PTH) και η 1,25-διυδροξυβιταμίνη D3, αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης του RANKL, ενώ οι κυτταροκίνες που αναστέλλουν την οστεοκλαστογένεση όπως η ιντερλευκίνη-13 (IL-13), η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και ο TGF-β1 με την καταστολή της έκφρασης του RANKL (Walsh et al. 2006).

	OPG	RANKL	RANK
TNF- α	↑	↑	
PTH	↓	↑	
Estrogen	↑	-	
CD40L	↑		↑
IGF-I	↓		
BMP-2	↑		
PROSTAGLANDIN	↓	↑	
IL-1	↑	↑	
IL-4		↑	↑
IL-6	↑	↑	↓
IL-11	↑	↑	
IL-17		↑	
Calcium (Ca)	↑	↑	
Glycocorticoids	↓	↑	
Cyclosporins	↓	↑	
TGF- β	↑	↓	
Vitamin D ₃	↑	↑	-

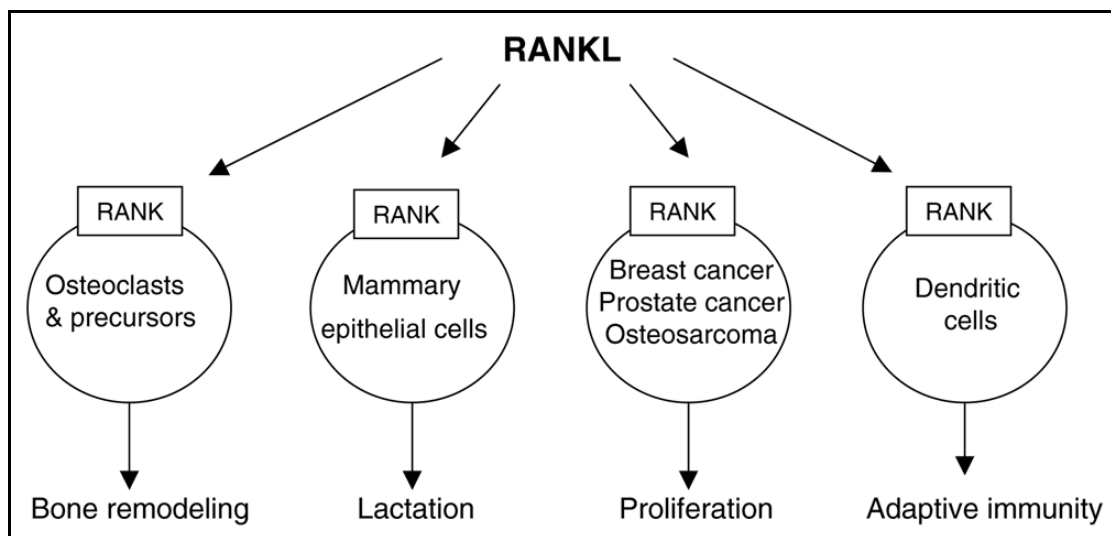
Πίνακας 1.III. Ρυθμιστές της έκφρασης των OPG, RANKL, RANK. (↑) αυξημένη έκφραση, (↓) μειωμένη έκφραση, (-) αμετάβλητη έκφραση (Kearns et al. 2008).

1.5.3 Βιολογικές Δράσεις του RANKL

Ο RANKL αποτελεί το μόριο «κλειδί» στην διαδικασία της οστικής απορρόφησης καθώς επάγει την διαφοροποίηση, επιβίωση και ενεργότητα των οστεοκλαστών δίνοντας το έναυσμα για την έναρξη της οστικής απορρόφησης (Boyce & Xing 2008; Kim et al. 2005; Wong et al. 1997). Σε αυτόν αποδόθηκαν ποικίλα ονόματα από τις τέσσερις διαφορετικές ερευνητικές ομάδες καθεμία από τις οποίες ακολούθησε διαφορετική προσέγγιση για τον προσδιορισμό και χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης. Τον συναντάμε ως ODF (Osteoclast differentiation factor) (Yasuda et al. 1998), TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) (Wong et al. 1997), ως OPG (osteoprotegerin-ligand) (Lacey et al. 1998) και ως TNFSF11 (Anderson et al. 1997) καθώς αποτελεί το ενδέκατο μέλος της υπερ-οικογένειας του TNF.

Η πρωτεΐνη RANKL εκφράζεται στα 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 διαφόρους 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 στον σπλήνα και τον μυελό των οστών (Lacey et al. 1998).

Πέρα από την αναδόμηση των οστών, η πρωτεΐνη RANKL φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και σε άλλα συστήματα (Εικ. 1.12) όπως το ανοσοποιητικό, 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 (Armstrong et al. 2008; Jones et al. 2006). 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).



Εικόνα 1.12. Οι βιολογικές δράσεις του RANKL/RANK συστήματος στα οστά και σε εξωσκελετικούς ιστούς (Boyce & Xing 2007).

1.5.4 Μεταλλάξεις της RANKL σε ασθενείς και ζωικά πρότυπα

Η κατανόηση της βιολογικής δράσης και σημασίας της RANKL έγινε εφικτή μέσω της μελέτης πειραματικών μοντέλων στα οποία είχε αδρανοποιηθεί το RANKL γονίδιο. Ειδικότερα, από 2 ανεξάρτητες μελέτες σε RANKL knockout ποντίκια διαπιστώθηκε η κρίσιμότητα του RANKL στην διαδικασία της οστικής απορρόφησης καθώς

τα ποντίκια εμφάνιζαν έντονη οστεοπέτρωση λόγω μη σχηματισμού οστεοκλαστών (Kong et al. 1999; Kim et al. 2000a). Μία ακόμη γενετική μετάλλαξη στο RANKL γονίδιο, που εντοπίστηκε από την ερευνητική ομάδα της Δρ. Ε. Ντούνη, προκάλεσε υποκατάσταση του αμινοξέος της γλυκίνης στην θέση 278 από αργινίνη (G278R) με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας μη λειτουργικής RANKL πρωτεΐνης και την εμφάνιση έντονης οστεοπέτρωσης στα RANKL^{ties/ties} ποντίκια (Douni et al. 2012). Τέλος, έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις στο RANKL γονίδιο και σε ασθενείς με οστεοπέτρωση. Τρεις διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί σε παιδιά με αυτοσωμική υπολειπόμενη οστεοπέτρωση (ARO) ωστόσο δεν έχει μελετηθεί ο μοριακός μηχανισμός των μεταλλάξεων αυτών (Sobacchi et al. 2007). Οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι ο RANKL είναι απαραίτητος για τον σχηματισμό οστεοκλαστών, και η απουσία του οδηγεί σε οστεοπέτρωση.

1.5.5 RANKL και Οστεοανοσολογία

Πρόσφατες μελέτες σε knockout ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο του RANKL, έδειξαν ότι ο RANKL διαδραματίζει σημαντικό ρόλο πέραν του σκελετικού συστήματος και στο ανοσοποιητικό αποτελώντας την «γέφυρα» που συνδέει τα δύο συστήματα και εγκαθιδρύοντας έτσι, το διεπιστημονικό πεδίο έρευνας της Οστεοανοσολογίας (Lorenzo et al. 2008; Walsh et al. 2006; Takayanagi 2009).

Αν και ο RANKL είχε αρχικά αναφερθεί ως παράγοντας επιβίωσης των δενδριτικών κυττάρων (Anderson et al. 1997), αξίζει να σημειωθεί ότι τα δενδριτικά κύτταρα δεν φάνηκαν να επηρεάζονται σε ποντίκια στα οποία δεν εκφράζεται η πρωτεΐνη RANKL. Ωστόσο, τα ποντίκια αυτά παρουσίαζαν άλλες ανοσολογικές δυσλειτουργίες όπως μειωμένο μέγεθος θύμου, σπληνομεγαλία, έλλειψη λεμφαδένων και μικρότερα Peyer's patches και ελλιπή παραγωγή κυτταροκινών (Kong et al. 1999; Kim et al. 2000a). Αυτά τα αποτελέσματα, ταιριάζουν με τις ποικίλες λειτουργίες στις οποίες συμμετέχει ο RANKL στο ανοσοποιητικό σύστημα. Κατά την οργανογένεση των λεμφαδένων, μαζί με την λεμφοτοξίνη-αβ (LTαβ), ρυθμίζουν την αποίκιση των πρόδρομων κυττάρων (D. Kim et al. 2000). Επίσης, ο RANKL είναι υπεύθυνος για την επιλογή των θυμοκυττάρων μέσω της ρύθμισης των επιθηλιακών κυττάρων (D. Kim et al. 2000). Ειδικότερα, στον θύμο είναι απαραίτητος 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). Υπάρχουν ακόμη αναφορές για εμπλοκή του RANKL στην αρνητική επιλογή των T-λεμφοκυττάρων και στην γενικότερη ανοσολογική ισορροπία του οργανισμού (Yao et al. 2009; Gravallesse 2002; Firestein 2003). Στο έντερο,

ενεργοποιεί την δημιουργία των αντιγόνο-δειγματοληπτικών (antigen-sampling) Μ κυττάρων στο εντερικό επιθήλιο και είναι απαραίτητος για την ωρίμανση των CXCL13- εξαρτώμενων κρυπτοδομών (cryptopatches) σε απομονωμένους λεμφικούς αδένες στο μικρό έντερο (Knopp et al. 2011).

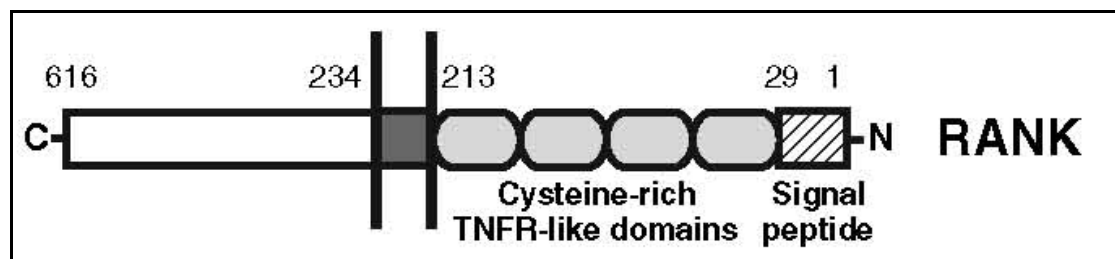
Πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος εκφράζουν τον RANKL και τον υποδοχέα RANK. Όντως, αρχικά ο RANKL είχε υποκλωνοποιηθεί από cDNA T-λεμφοκυττάρων και ο υποδοχέας RANK από τα δενδριτικά κύτταρα. Ο RANKL εκφράζεται επίσης από τα Β και γδΤ κύτταρα, ενώ ο RANK από μακροφάγα και μονοκύτταρα. *In vitro* χορήγηση ανασυνδυασμένης RANKL πρωτεΐνης βελτιώνει την προσκόλληση και την επιβίωση των δενδριτικών κυττάρων, καθώς και την παραγωγή κυτταροκινών, με αποτέλεσμα να διεγείρεται η ανοσοαπόκριση των T-λεμφοκυττάρων. Ωστόσο, τόσο τα RANKL όσο και τα RANK knockout ποντίκια (Ashcroft et al. 2003) εμφανίζουν φυσιολογικούς πληθυσμούς των δενδριτικών κυττάρων το οποίο ίσως εξηγείται από την παρουσία του σηματοδοτικού μηχανισμού CD40L-CD40R που αντισταθμίζει την απώλεια του σηματοδοτικού μονοπατιού του RANKL. Πειραματική επιβεβαίωση της παραπάνω θεωρίας προέκυψε όταν σε CD40 knockout ποντίκια όπου έγινε παρεμπόδιση του RANKL με τον φυσικό του υποδοχέα OPG είχε σαν αποτέλεσμα την καταστολή της ανοσοαπόκρισης των T-λεμφοκυττάρων ύστερα από επιμόλυνση με ιό (Bachmann et al. 1999). Στα IL-2 knockout ποντίκια τα οποία έχουν όλα τα T-κύτταρα ενεργοποιημένα και εμφανίζουν φλεγμονώδη κολίτιδα, βελτιώνονται τα συμπτώματα ύστερα από χορήγηση του αναστολέα OPG (Ashcroft et al. 2003). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν τον ανοσοδιεγερτικό ρόλο του RANKL. Παρόλα αυτά άλλες μελέτες αναφέρουν τον ανοσοκατασταλτικό ρόλο του RANKL και την ικανότητα να ρυθμίζει την παραγωγή των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (T-regulatory) ρυθμίζοντας την λειτουργία των κυττάρων του Langerhans και καταστέλλοντας αυτοάνοσες αντιδράσεις σε περιοχές όπως το δέρμα (Loser et al. 2006). Η χορήγηση Fc-RANK σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον RANKL κάτω από τον μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή keratin-14 (K14) παρεμποδίζει την ανοσοκατασταλτική δράση του ενισχύοντας αυτοάνοσες αντιδράσεις του δέρματος (inflammatory cutaneous contact hypersensitivity) .

Επίσης, ο RANKL παίζει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων αφού τα RANKL knockout ποντίκια εμφανίζουν μειωμένο αριθμό ώριμων Β λεμφοκυττάρων (Lagasse & Weissman 1997b) ενώ παρουσιάζουν αδυναμία στην μετάβαση στα διάφορα στάδια διαφοροποίησης των Β λεμφοκυττάρων (Raggatt & Partridge 2010). Παρ' όλα αυτά ο ακριβής μηχανισμός που εμπλέκει τον RANKL στην κυτταρική ανάπτυξη των Β λεμφοκυττάρων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Τέλος, η χορήγηση του RANKL στις κοιλίες του εγκεφάλου τόσο σε ποντίκια όσο και σε αρουραίους έδειξε ότι ο RANKL εμπλέκεται στα μονοπάτια ρύθμισης του πυρετού στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, ενώ βρέθηκε ότι είναι υπεύθυνος για την ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος στις γυναίκες κατά την διάρκεια της ωορρηξίας (Hanada et al. 2009).

1.5.6 RANK

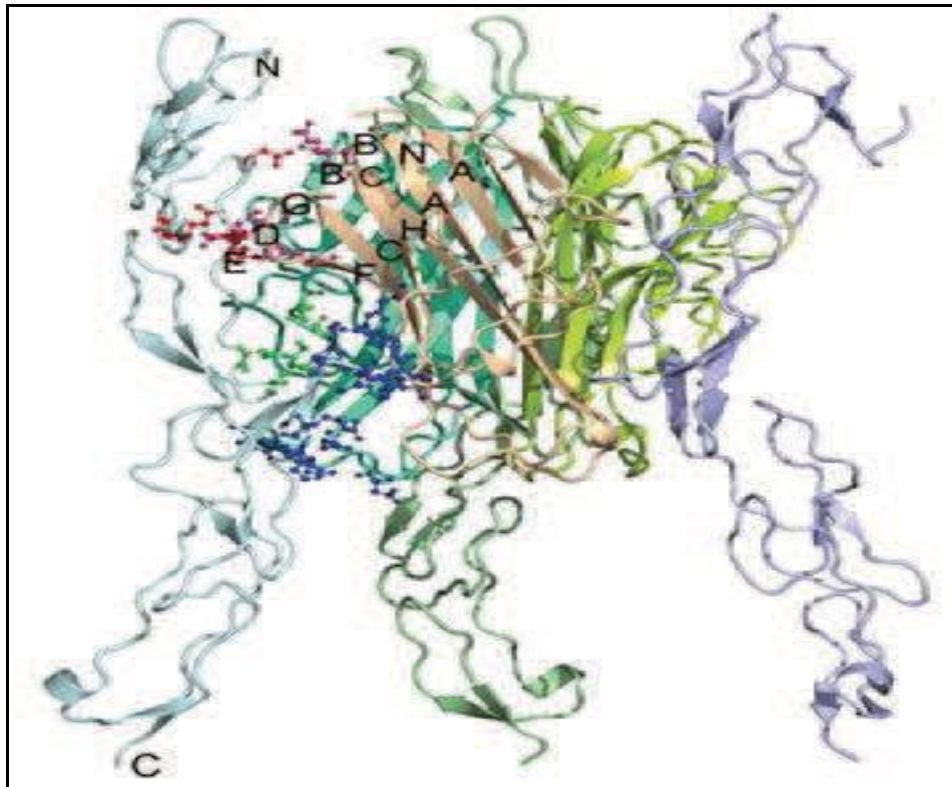
Ο υποδοχέας RANK είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I που στον άνθρωπο συντίθεται από 616 αμινοξικά κατάλοιπα (Anderson et al. 1997). Η πρωτεΐνη RANK αποτελεί το φυσικό υποδοχέα του RANKL και εκφράζεται σε κύτταρα της σειράς των μονοκυττάρων/μακροφάγων, συμπεριλαμβανομένων των πρόδρομων οστεοκλαστών, B και T λεμφοκύτταρα, 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 (Εικ. 1.13) (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).



Εικόνα 1.13. Απεικόνιση του RANK υποδοχέα. Σχηματική απεικόνιση της δομής του RANK που περιλαμβάνει στο καρβοξύ τελικό άκρο μία μεγάλη κυτταροπλασματική περιοχή και στο άμινο τελικό άκρο μία εξωκυτταρική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη στην οποία προσδέεται ο RANKL (Kearns et al. 2008).

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 (Εικ. 1.14). 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 περιοχές αυτές διαφοροποιούνται από τα υπόλοιπα ζεύγη υποδοχέα-προσδέτη, υποδηλώνοντας την κρίσιμότητά τους για εξειδίκευση της σύνδεσης (Liu et al. 2010).



Εικόνα 1.14. 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 RANKL τριμερές (Ta et al., 2010).

1.5.6.1 Εντοπισμός του υποδοχέα RANK

Η έκφραση του RANK ρυθμίζεται από κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος του οστού. Συγκεκριμένα, ο παράγοντας TGF-β επάγει την έκφραση του RANK ενώ η IL-4 αναστέλλει την έκφρασή του, γεγονός που συμφωνεί με τη δράση των δύο παραγόντων στην διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Yun et al. 2001). Ο υποδοχέας RANK εκφράζεται σε πρόδρομους οστεοκλάστες, στα δενδριτικά κύτταρα (Anderson et al. 1997),

στα κύτταρα του μαστικού αδένου (Fata et al. 2000), στον θύμο, στο ήπαρ, στο έντερο αλλά και σε κάποιες σειρές καρκινικών κυττάρων που εμπλέκονται σε κακοήθειες όπως ο καρκίνος του μαστού (Kim et al. 2006) και του προστάτη (Chen et al. 2006) καθώς και σε κυτταρικές σειρές μελανώματος σε ποντίκια (Jones et al. 2006). Η σύνδεσή του με τον RANKL προκαλεί τον τριμερισμό του πυροδοτώντας τα κυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν στην έκφραση των γονιδίων που ευθύνονται για την έναρξη της οστεοκλαστογένεσης.

1.5.6.2 Μεταλλάξεις στον RANK σε ασθενείς και ζωικά πρότυπα

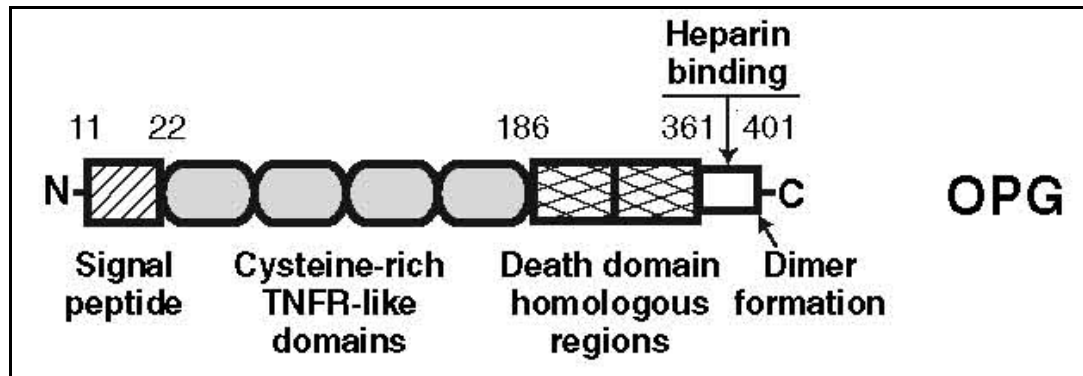
Μεταλλάξεις στο γονίδιο TNFRSF11A που κωδικοποιεί τον RANK οδηγούν σε ένα σπάνιο αυτοσωμικό επικρατές νόσημα που παρουσιάζει κοινά στοιχεία με την νόσο Paget, την Οικογενή Διασταλτική Οστεόλυση (Familial Expansile Osteolysis, FEO) (Whyte & Mumm 2004). Μελετώντας την νόσο ανιχνεύθηκε διπλασιασμός μιας περιοχής 18 kb στο γονίδιο αυτό. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου είναι η καταστροφή των δοντιών, η προοδευτική εξάπλωση της οστεόλυσης με γενικευμένο πόνο, παραμορφωτικά κατάγματα και αυξημένο ρυθμό οστικής ανακατασκευής που οφείλεται σε συνεχή ενεργοποίηση του RANK (Hughes et al. 2000). Αντίθετα, έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον RANK υποδοχέα σε ασθενείς με οστεοπέτρωση (Guerrini et al. 2008).

Τέλος, η αδρανοποίηση του γονιδίου του RANK σε knockout ποντίκια οδηγεί σε σοβαρή οστεοπέτρωση. Τα οστεοπετρωτικά ποντίκια χαρακτηρίζονται από έλλειψη περιφερικών λεμφαδένων, ελαττωματική ωρίμανση των B και T λεμφοκυττάρων, ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με τα ποντίκια στα οποία έχει γίνει αδρανοποίηση του γονιδίου του RANKL, με την μόνη διαφορά ότι παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη του θύμου αδένου (Khosla 2001; Li et al. 2000).

1.5.7 OPG

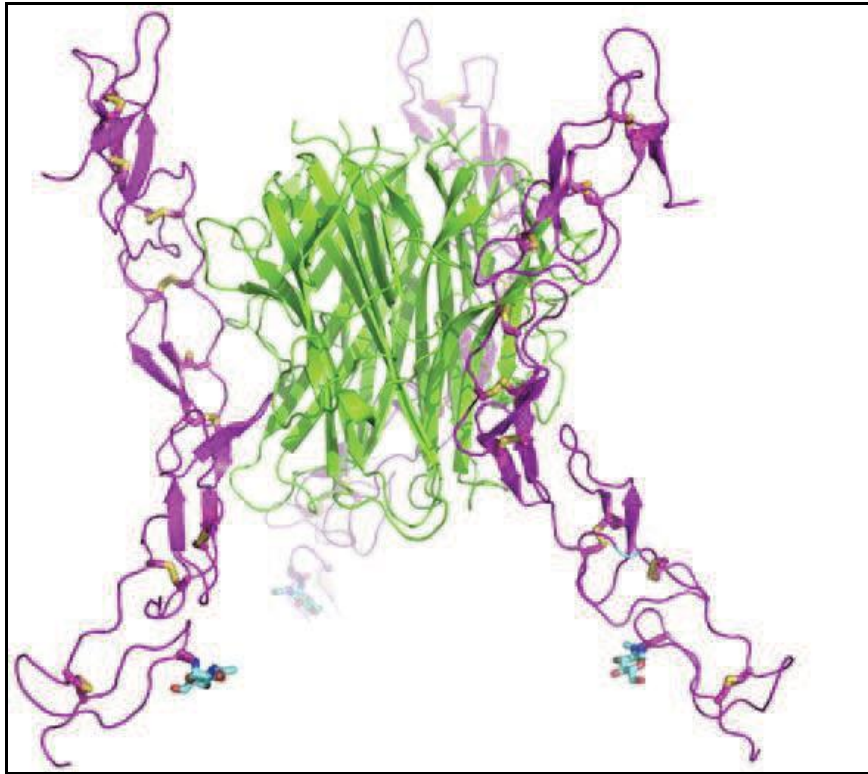
Ο υποδοχέας OPG είναι ένα άτυπο μέλος της TNFR οικογένειας, καθώς δεν διαθέτει διαμεμβρανική περιοχή και παράγεται μόνο ως εκκριτική πρωτεΐνη. Ο OPG παράγεται από κύτταρα του στρώματος του μυελού των οστών, οστεοβλάστες, δενδριτικά, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, μονοκύτταρα, B- και T-λεμφοκύτταρα και μεγακαρυοκύτταρα. Περιέχει τέσσερις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες στο αμινο-τελικό άκρο, ενώ στο καρβοξυ-τελικό περιέχει δύο περιοχές με δομή θανάτου, και μία περιοχή πρόσδεσης της ηπαρίνης (Εικ. 1.15) που πιθανόν μειώνει το χρόνο ημιζωής του OPG μέσω της πρόσδεσής του στην

επιφάνεια των κυττάρων. Οι δομές θανάτου και η περιοχή πρόσδεσης της ηπαρίνης πιθανόν σχετίζονται με τον διμερισμό του OPG.



Εικόνα 1.15. Απεικόνιση της δομής του OPG. Σχηματική απεικόνιση της δομής του OPG που περιλαμβάνει το οδηγό πεπτίδιο, την πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή πρόσδεσης του RANKL, τη δομή θανάτου και τέλος την περιοχή πρόσδεσης ηπαρίνης που συμμετέχει στον διμερισμό της OPG (Kearns et al. 2008).

Η ανάλυση της δομής του συμπλόκου RANKL-OPG, υποδεικνύει πως οι τέσσερις περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνες 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 (Εικ. 1.16). Η ερευνητική ομάδα που ανέλυσε τη δομή, προτείνει πως το διμερές του OPG σχηματίζει μία δομή που μοιάζει με «Y», 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 1.16. Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου OPG-RANKL με μορφή κορδέλας. Το τριμερές της πρωτεΐνης RANKL (πράσινο) συνδεδεμένο με διμερή του υποδοχέα OPG. Στην εικόνα παρατηρείται και η χαρακτηριστική δομή «Y» που διαμορφώνουν τα διμερή του OPG για να συνδεθούν στο τριμερές (Luan et al., 2012).

1.5.7.1 Εντοπισμός της OPG

Σε κυτταρικό επίπεδο η οστεοπροτεγερίνη εκκρίνεται κυρίως από τους προ-οστεοβλάστες/κύτταρα του στρώματος, ενώ έχει βρεθεί ότι τα Β λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για το 64% της συνολικής παραγωγής της οστεοπροτεγερίνης από τον μυελό των οστών (Yun et al. 1998). Επίσης, βρέθηκε ότι εκκρίνεται τόσο από τα δενδριτικά κύτταρα όσο και από τα θυλακοειδή δενδριτικά κύτταρα (Yun et al. 1998), τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα της αορτής, τους ινοβλάστες, τα δενδριτικά κύτταρα και τις λεμφικές κυτταρικές σειρές. Σε *in vivo* μελέτες έχει αναφερθεί εντοπισμός της οστεοπροτεγερίνης σε κύτταρα οστεοβλαστικής προέλευσης, αλλά ο εντοπισμός της στη θεμέλια ουσία του οστού είναι υπό αμφισβήτηση (Nakamura et al. 2002). Το mRNA της οστεοπροτεγερίνης ανιχνεύεται στα οστά, στον αρθρικό χόνδρο, στην αορτή, στο δέρμα, στους πνεύμονες, στην καρδιά, στους νεφρούς, στο ήπαρ, στον εγκέφαλο καθώς επίσης σε όργανα του αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος δείχνοντας ποικίλες πιθανές δράσεις (Simonet et al. 1997; Boyce & Xing 2007).

1.5.7.2 Ρύθμιση της έκφρασης της OPG

Η έκφραση της οστεοπροτεγερίνης ρυθμίζεται κατασταλτικά από διεγερτικούς παράγοντες της οστεοκλαστογένεσης, όπως η 1,25-(OH)₂ D₃, η προσταγλαδίνη E₂ (PGE₂), η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και η παραθυροειδής ορμόνη (PTH). Αντιθέτως, τα οιστρογόνα, ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGF-β₁) και η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 2 (Bone morphogenetic protein-2) αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης της οστεοπροτεγερίνης στα κύτταρα των οστεοβλαστών. Συνεπώς, η οστεοπροτεγερίνη λειτουργεί ως φυσιολογικός ρυθμιστής της οστικής απορρόφησης κατά τη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής (Nakamura et al. 2002).

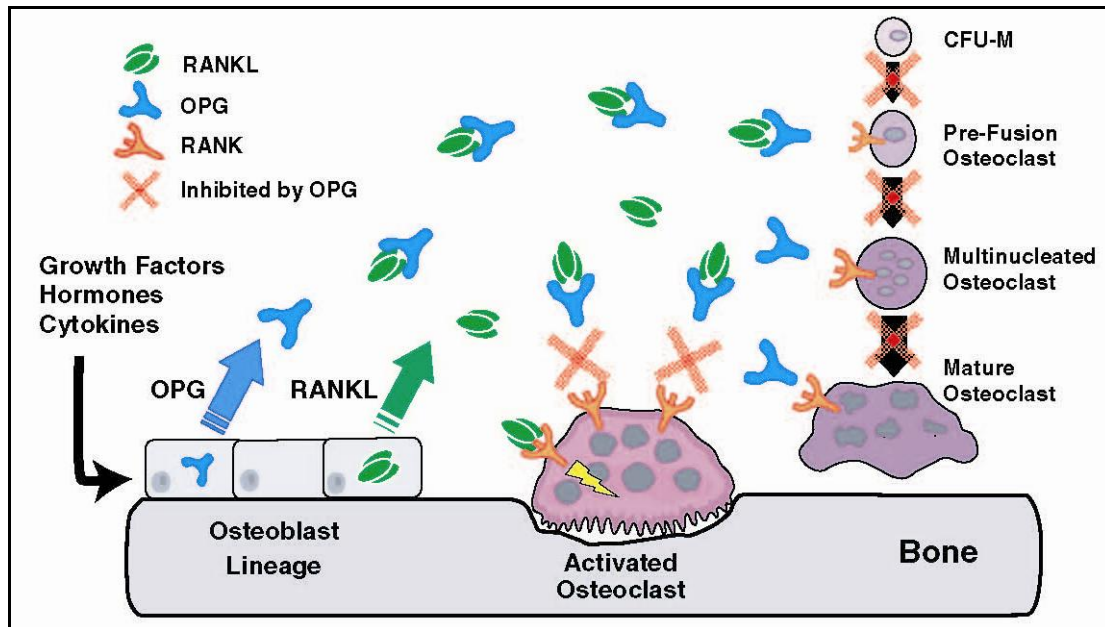
1.5.7.3 Μεταλλάξεις της OPG σε ασθενείς και ζωικά μοντέλα

Διαγονιδιακά ποντίκια με υπερέκφραση OPG παρουσιάζουν σοβαρή οστεοπέτρωση και μειωμένο δείκτη οστικής εναλλαγής σχετιζόμενη με μείωση του αριθμού των οστεοκλαστών στη σπογγώδη μοίρα της μετάφυσης των οστών (Simonet et al. 1997). Αντίθετα, ποντίκια στα οποία έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο της οστεοπροτεγερίνης (OPG^{-/-}) παρουσιάζουν βαριά οστεοπόρωση με διάχυτα κατάγματα λόγω αυξημένης οστεοκλαστικής δραστηριότητας και αυξημένης επιβίωσης των οστεοκλαστών, γενική μείωση της ολικής οστικής πυκνότητας, σκελετικές παραμορφώσεις ενώ είναι χαρακτηριστική η ασβεστοποίηση της αορτής και των νεφρικών αρτηριών (Bucay et al. 1998; Min et al. 2000), ένας φαινότυπος που θυμίζει την μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση στον άνθρωπο. Ο Whyte και οι συνεργάτες του το 2002, ανακάλυψαν μεταλλάξεις σε ανθρώπους που αφορούν το γονίδιο TNFRSF11B που κωδικοποιεί για την οστεοπροτεγερίνη (OPG). Πρόκειται για μία ομόζυγη απαλειφή και των δύο αλληλόμορφων, εντοπισμένη στο χρωμόσωμα 8, με συνέπεια την εμφάνιση σοβαρής υπερφωσφαταιμίας και νόσο γνωστή ως Νεανική Νόσος του Paget που προσβάλλει κυρίως παιδιά με κύρια χαρακτηριστικά τον γενικευμένο πόνο, αυξημένο ρυθμό οστικής ανακατασκευής, παραμορφωτικά κατάγματα, απώλεια δοντιών και αυξημένη θνησιμότητα λόγω αύξησης των επιπέδων ελεύθερου RANKL (Whyte & Mumm 2004).

1.5.7.4 Μηχανισμός δράσης της OPG στον οστικό μεταβολισμό

Η πρωτεΐνη OPG είναι ο φυσικός ανταγωνιστικός υποδοχέας του RANKL καθώς αναστέλλει την δράση του εμποδίζοντας την πρόσδεσή του στον υποδοχέα RANK και επομένως την οστεοκλαστογένεση. Όπως φαίνεται και από το όνομα της ασκεί με τον τρόπο αυτό

προστατευτική δράση στα οστά. Η οστεοπροτεγερίνη λειτουργεί ως εκκρινόμενος αναστολέας του RANK σηματοδοτικού μονοπατιού μέσω πρόσδεσης της στον παράγοντα RANKL, αναστέλλοντας συναγωνιστικά την αλληλεπίδραση του συστήματος RANKL/RANK (Εικ. 1.17) στους οστεοκλάστες και στις πρόδρομες μορφές τους (Min et al. 2000).



Εικόνα 1.17. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των OPG, RANKL και RANK (Kearns et al. 2008).

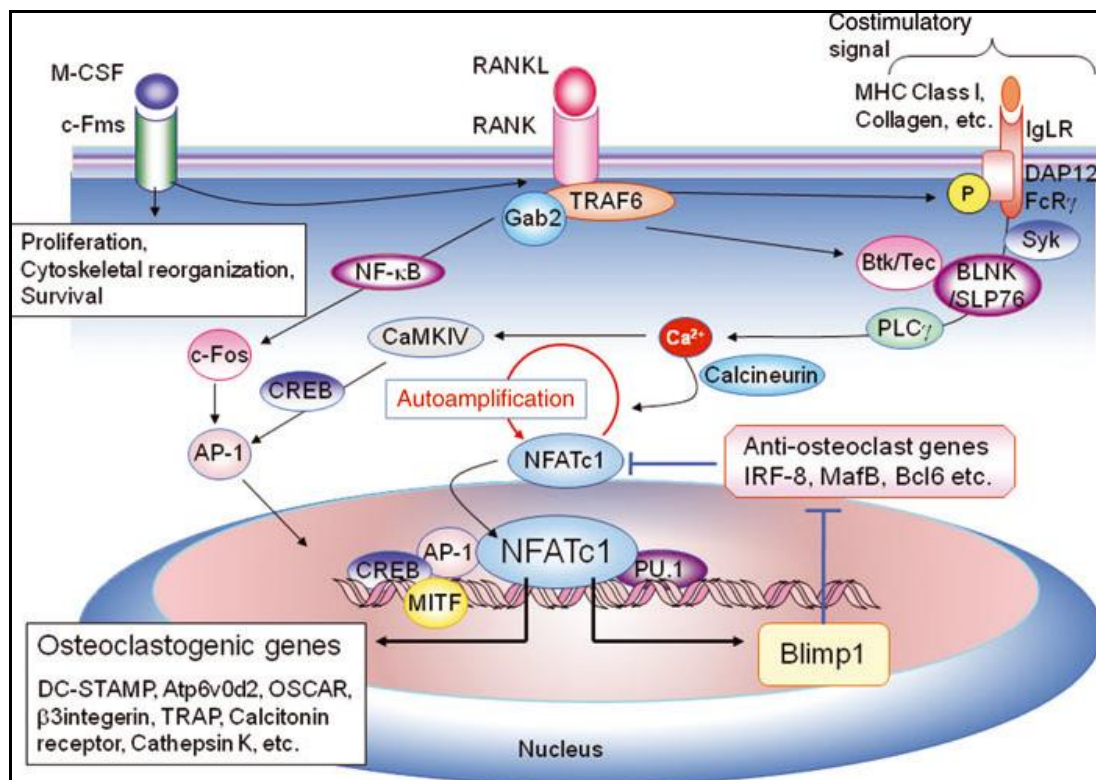
Η *in vivo* χορήγηση OPG προκαλεί αύξηση της οστικής πυκνότητας και του οστικού όγκου και ταυτόχρονη μείωση του αριθμού των ενεργών οστεοκλαστών (Yun et al. 2001). Η προσθήκη OPG σε καλλιέργειες οστεοκλαστών αναστέλλει τη διαφοροποίηση των πρόδρομων οστεοκλαστών σε ώριμους πολυπύρηνους οστεοκλάστες (Yun et al. 2001). Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η OPG προλαμβάνει αποτελεσματικά την οστεόλυση σε ένα πειραματικό πρότυπο κακοήθους υπερασβεστιαμίας (Nakamura et al. 2002) και παράλληλα διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση της OPG σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχει προκαλέσει ισχυρή αναστολή της οστικής απώλειας (Bekker et al. 2001a). Ωστόσο, δεν ενδείκνυται πλέον η χορήγηση της OPG σε ασθενείς για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών λόγω του σύντομου χρόνου ημίσειας ζωής της στην κυκλοφορία του αίματος (Kostenuik 2005). Επιπλέον, η συγγένεια σύνδεσης που παρουσιάζει με τον προσδέτη TRAIL, που επίσης ανήκει στην υπεροικογένεια του TNF, καθιστά την OPG ως μια μη προτεινόμενη θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης αφού μπορεί να εμπλέκεται σε μηχανισμούς καρκινογένεσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι παρεμποδίζει την δράση του

TRAIL που αποτελεί σημαντική κυτταροκίνη για την επαγωγή απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα (Wiley et al. 1995; Emery et al. 1998).

1.5.8 Κυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης του RANKL

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 (Εικ. 1.18). 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 οστεοκλαστογένεσης, 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). 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 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1), (Εικόνα 1.18). 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 & Wagner 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 Z, Matsuo K, Nishimura R, Xing L 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 (Thiébaud 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 1.18. Σχηματική απεικόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού RANKL/RANK που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών (Nakashima & Takayanagi 2011).

1.6 RANKL και Παθήσεις των Οστών

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μια χρόνια συστηματική φλεγμονώδης νόσος που χαρακτηρίζεται από υπερπλασία του αρθρικού υμένα οδηγώντας σε προοδευτική καταστροφή της άρθρωσης (Okamoto & Takayanagi 2011; Schett 2007). Οι ινοβλάστες του αρθρικού υμένα σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα παράγουν πλήθος προφλεγμονωδών κυτταροκινών που εμπλέκονται στην καταστροφή του αρθρικού χόνδρου και του οστού όπως είναι η IL-1, IL-6, IL-11, IL-17 και ο TNF (Firestein 2003). Τα ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα όπως και οι ινοβλάστες του αρθρικού υμένα αποτελούν τις κύριες πηγές παραγωγής του RANKL που είναι υπεύθυνος για την αυξημένη οστική απορρόφηση στις αρθρώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η οστική καταστροφή που παρατηρείται στις αρθρώσεις αυτών των ασθενών οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία ενός υποπληθυσμού των T λεμφοκυττάρων τον λεγόμενο Th17, που

εμπλέκεται στην παθογένεση πολλών φλεγμονωδών ασθενειών (Sato et al. 2006). Τα Th17 λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα στις αρθρώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα καθώς βρέθηκε ότι έχουν μεγαλύτερη έκφραση του RANKL σε σύγκριση με τις υποομάδες Th1 και Th2 των T λεμφοκυττάρων (Nakashima & Takayanagi 2008; Takayanagi 2007). Για το λόγο αυτό τα Th17 κύτταρα θεωρούνται σημαντικός θεραπευτικός στόχος για την παρεμπόδιση της οστικής καταστροφής στους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα.

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 επικρατές τρόπο κληρονομικότητας. Οι ασθενείς φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες RANK, OPG και SQSTM1, μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του RANKL-RANK μονοπατιού (Whyte 2006; Roodman 2010). Επίσης, αυξημένα επίπεδα RANKL συναντώνται στην οστεοπόρωση ενώ λειτουργικές μεταλλάξεις στο RANKL γονίδιο έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με οστεοπέτρωση.

1.7 Οστεοπέτρωση

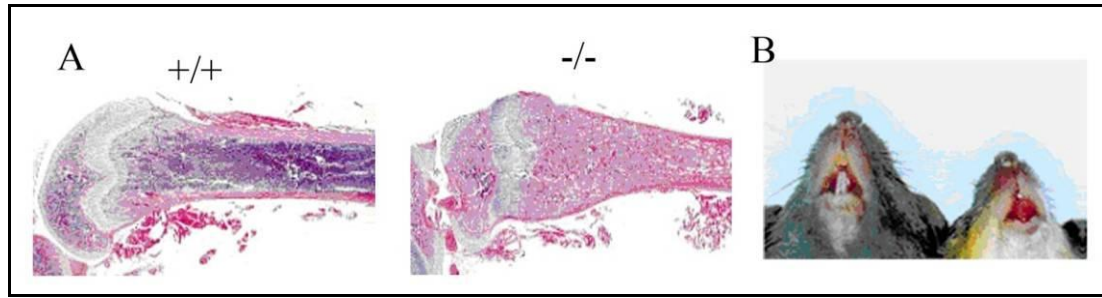
Ο όρος οστεοπέτρωση αναφέρεται σε μία μεγάλη ποικιλία κληρονομικών νοσημάτων των οστών που χαρακτηρίζονται από αδυναμία απορρόφησης του οστίτη ιστού από τους οστεοκλάστες, η οποία οδηγεί σε εξασθένιση της οστικής δόμησης και ανακατασκευής. Η αυξημένη οστική μάζα που παρατηρείται σε αυτές τις ασθένειες χαρακτηρίζεται από διάφορα φαινοτυπικά στοιχεία όπως μακροκεφαλία, τροποποιήσεις στην κρανιοπροσωπική μορφολογία αλλά έχει επιδράσεις και σε άλλα όργανα και ιστούς όπως το μυελό των οστών και το νευρικό σύστημα. Άλλα κλινικά συμπτώματα είναι όπως απώλεια όρασης και ακοής, αδυναμία έκφυσης των δοντιών και πιθανότητα ανάπτυξης υπασβεστιαϊμίας. Η οστεοπέτρωση χαρακτηρίζεται από περιορισμένη ή καθολική απώλεια της ενεργότητας των οστεοκλαστών ενώ μέχρι τώρα γενετικά έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις διάφορων γονιδίων (TCIRG1, CLCN7, OSTM1, PLEKHM1, CAII, IKBKG, Kindlin-3, CalDAG-GEF1, CTSK, LEMD3, RANKL, RANK) που συσχετίζονται με την οστεοπέτρωση στους ανθρώπους. (Stark & Savarirayan 2009).

1.7.1 RANKL-εξαρτώμενη Οστεοπέτρωση σε ασθενείς (ARO)

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 (Lo Iacono et al. 2013). Η Sobacchi και οι συνεργάτες της για πρώτη φορά αναγνώρισαν μεταλλάξεις στο γονίδιο RANKL και πιο συγκεκριμένα εντόπισαν 3 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο RANKL σε παιδιά με αυτοσωμική υπολειπόμενη οστεοπέτρωση (ARO): M199K (αμινοξική υποκατάσταση σε μια υψηλά συντηρημένη περιοχή), del145-177AA (προκαλεί απομάκρυνση της Α β-αλυσίδας και της μισής AA' λούπας με αποτέλεσμα την μη πρόσδεση στον υποδοχέα RANK) και V277WfX5 (απώλεια της F αλυσίδας, η οποία είναι σημαντική για τον τριμερισμό της RANKL) (Sobacchi et al. 2007). Ωστόσο, δεν έχει πραγματοποιηθεί ο βιοχημικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός των μεταλλάξεων του RANKL σε ασθενείς με ARO. Πολύ πιθανόν οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στην παραγωγή μη λειτουργικής RANKL πρωτεΐνης με αδυναμία πρόσδεσης στον υποδοχέα RANK και τελικώς στην μη διαφοροποίηση πρόδρομων κυττάρων σε ώριμους οστεοκλάστες.

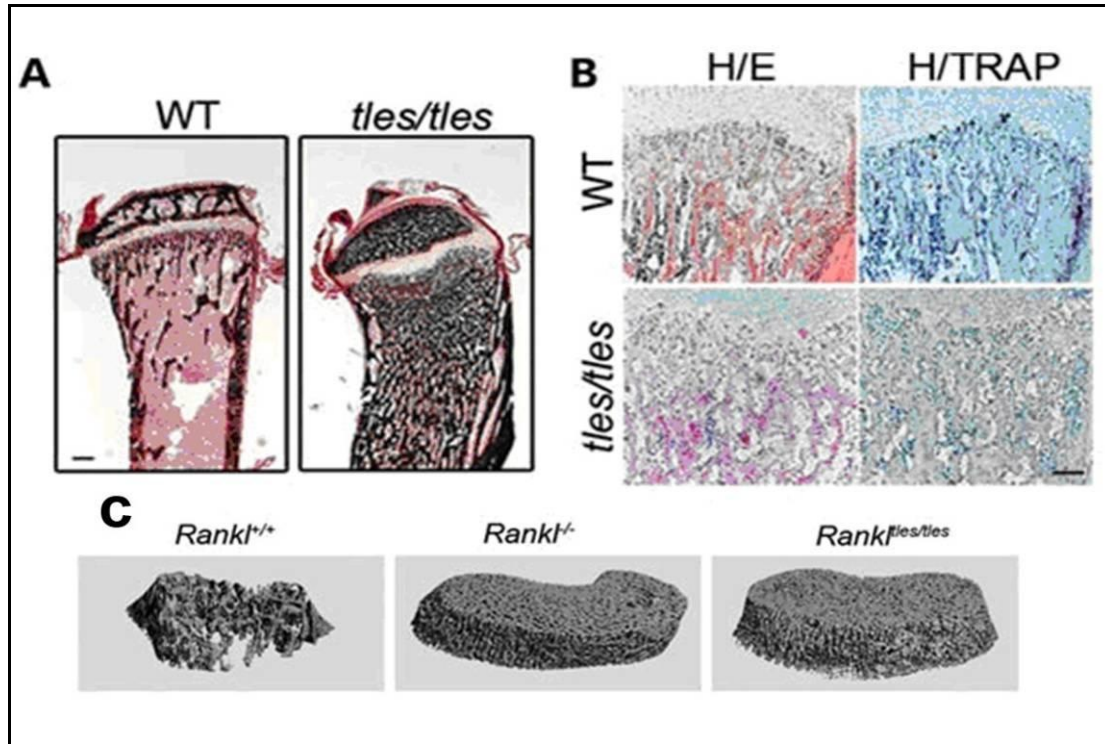
1.7.2 Πειραματικά Μοντέλα RANKL-εξαρτώμενης Οστεοπέτρωσης

Στο πεδίο της έρευνας μέχρι σήμερα 3 είναι τα πειραματικά μοντέλα RANKL-εξαρτώμενης οστεοπέτρωσης. Το δύο πρώτα μοντέλα πρόκειται για knockout ποντίκια στα οποία αδρανοποιήθηκε το *Rankl* γονίδιο (RANKL^{-/-}) με γονιδιακή στόχευση (Kong et al. 1999; Kim et al. 2000a). Τα RANKL^{-/-} ποντίκια δεν παράγουν την πρωτεΐνη RANKL, παρουσιάζουν έντονη μορφή οστεοπέτρωσης με πλήρη απουσία οστεοκλαστών, αυξημένη οστική μάζα και πυκνότητα και αδυναμία έκφυσης των δοντιών (Εικ.1.19). Επιπλέον τα RANKL^{-/-} ποντίκια εμφανίζουν πλήρη αδυναμία σχηματισμού λεμφαδένων και επιπλοκές στην διαφοροποίηση των T και B λεμφοκυττάρων (D. Kim et al. 2000).



Εικόνα 1.19. Απεικόνιση οστεοπετρωτικών RANKL^{-/-} ποντικών. (A) Ιστολογική ανάλυση των μακρών οστών όπου εντοπίζεται αυξημένη οστική μάζα στην κοιλότητα του μυελού των οστών στα RANKL^{-/-} ποντίκια. (B) Αδυναμία έκφυσης των δοντιών στα RANKL^{-/-} ποντίκια (δεξί ποντίκι) (Kong et al. 1999).

Το τρίτο μοντέλο οστεοπέτρωσης, που δημιουργήθηκε από την ερευνητική μας ομάδα με τυχαία χημική μεταλλαξογένεση με αιθυλνιτροζουρία (ENU), οφείλεται σε μία σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *Rankl* που οδηγεί σε υποκατάσταση του αμινοξέος της γλυκίνης στην θέση 278 από αργινίνη (G278R). Τα RANKL^{*tes/tes*} ποντίκια εμφανίζουν έντονη μορφή οστεοπέτρωσης όμοια με τα RANKL^{-/-} ποντίκια, με απουσία σχηματισμού οστεοκλαστών, αυξημένη οστική μάζα στην κοιλότητα του μυελού των οστών και απώλεια έκφυσης των δοντιών (Douni et al. 2012) (Εικ. 1.20). Επιπλέον, τα RANKL^{*tes/tes*} ποντίκια χαρακτηρίζονται από πρόωρη θνησιμότητα, υποπλασία του θύμου, ευμεγέθη σπλήνα και απουσία λεμφαδένων. Όλα τα παραπάνω φαινοτυπικά ευρήματα έρχονται σε πλήρη συμφωνία με εκείνα που αναφέρθηκαν στα RANKL^{-/-} ποντίκια κατά το παρελθόν και RANKL^{*tes/tes*} ποντίκια αποτελούν τα μοναδικά μοντέλα RANKL-εξαρτώμενης οστεοπέτρωσης που οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη.



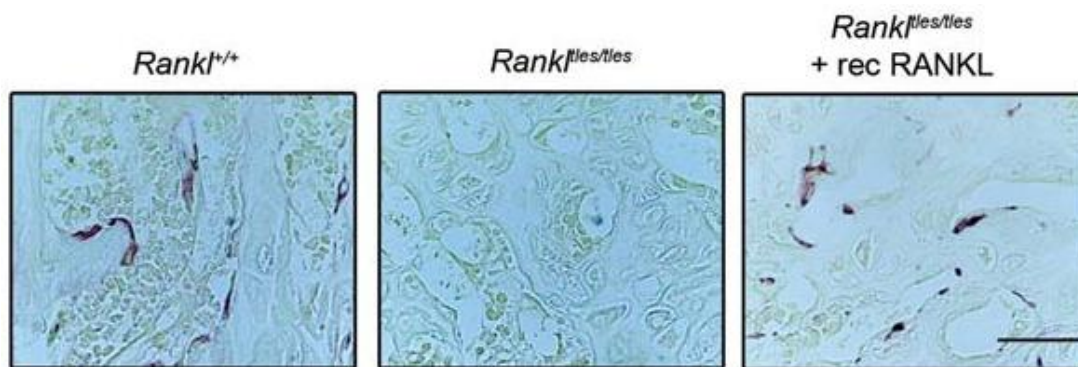
Εικόνα 1.20. Τα RANKL^{fles/fles} ποντίκια εμφανίζουν έντονη οστεοπέτρωση. (A) Εικόνες από την περιοχή της κνήμης που φαίνεται χαρακτηριστικά η οστεοποίηση στην περιοχή του μυελού των οστών (χρώση von Kossa). (B) Απουσία οστεοκλαστών στην περιοχή του ισχίου στα RANKL^{fles/fles} ποντίκια (χρώση TRAP). (C) Τρισδιάστατες εικόνες του σπογγώδους οστού στην περιοχή της μετάφυσης του μηριαίου μεταξύ WT, RANKL^{-/-} και RANKL^{fles/fles} με μικροτομογραφία υψηλής ανάλυσης (Douni et al. 2012).

1.7.3 Θεραπευτική προσέγγιση κατά της RANKL-εξαρτώμενης Οστεοπέτρωσης (ARO)

Από την στιγμή που κατανοήθηκε η σημασία του RANKL ως κεντρικού ρυθμιστή της οστεοκλαστογένεσης, πολλές πειραματικές προσεγγίσεις ακολούθησαν μελετώντας τις επιδράσεις που έχει η εξωγενής χορήγηση της εκκριτικής μορφής του RANKL στην δομή και τον μεταβολισμό των οστών σε πειραματικά μοντέλα ποντικών και αρουραίων (Lacey et al. 1998; Lloyd et al. 2008; Tomimori et al. 2009; Yuan et al. 2008). Η εκκριτική μορφή του RANKL προκαλεί σημαντική μείωση της οστικής μάζας και της οστικής πυκνότητας σε ποντίκια και αρουραίους άγριου τύπου όταν χορηγείται υποδόρια ή ενδοφλέβια για διάστημα 7 ημερών προκαλώντας ταυτόχρονα αύξηση του αριθμού των οστεοκλαστών. Με βάση τα *in vivo* δεδομένα και παρατηρήσεις γίνεται κατανοητό ότι μία φαρμακευτική προσέγγιση για την θεραπεία ασθενών με RANKL-εξαρτώμενη οστεοπέτρωση θα μπορούσε να είναι η χορήγηση ανασυνδυασμένης RANKL πρωτεΐνης. Σε προκλινικό επίπεδο, έγινε χορήγηση ανασυνδυασμένου RANKL σε RANKL^{-/-} ποντίκια κάθε 2 ημέρες για συνολικό διάστημα

ενός μήνα. Τα αποτελέσματα έδειξαν πλήρη διάσωση του φαινοτύπου των οστών, αύξηση οστεοκλαστογένεσης και της οστικής απορρόφησης. Ταυτόχρονα παρατηρείται επαναφορά και της αιμοποιητικής λειτουργίας στο μυελό των οστών και βελτίωση της δομής του σπλήνα και του θύμου (Lo Iacono et al. 2013). Επιπλέον, στα οστεοπετρωτικά $RANKL^{tles/tles}$ ποντίκια, η υποδόρια χορήγηση ανασυνδυασμένης GST-RANKL πρωτεΐνης για 2 εβδομάδες, προκαλεί σχηματισμό TRAP⁺ οστεοκλαστών στο σπογγώδες και φλοιώδες οστό (Εικ. 1.21) (Douni et al. 2012).

Οι προκλινικές μελέτες σε $RANKL^{-/-}$ και $RANKL^{tles/tles}$ ποντίκια κατέδειξαν την σημασία και την σπουδαιότητα μιας θεραπευτικής προσέγγισης χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη RANKL πρωτεΐνη για την θεραπεία της RANKL εξαρτώμενης-οστεοπέτρωσης σε ARO ασθενείς. Ωστόσο, μέχρι τώρα δεν έχουν πραγματοποιηθεί κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με RANKL εξαρτώμενη-οστεοπέτρωση ενώ απαιτείται διερεύνηση για τον προσδιορισμό πιθανών τοξικολογικών επιδράσεων της χορήγησης RANKL σε οστεοπετρωτικούς ασθενείς.



Εικόνα 1.21. Χορήγηση ανασυνδυασμένης RANKL πρωτεΐνης στα $RANKL^{tles/tles}$ ποντίκια οδήγησε σε σχηματισμό οστεοκλαστών στην περιοχή του σπογγώδους οστού (χρώση TRAP) (Douni et al. 2012).

1.8 Οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση ως νόσος των οστών περιγράφηκε στις αρχές του 19^{ου} αιώνα από έναν διακεκριμένο Άγγλο χειρουργό τον Sir Astley Cooper, ο οποίος επισήμανε ότι η λέπτυνση και η μαλακότητα που αποκτούν τα οστά με το πέρασμα της ηλικίας ευνοούν την πρόκληση καταγμάτων (Rosen 2005). Το 1940, ο Αμερικανός ενδοκρινολόγος Fuller Albright περιέγραψε την μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση και διατύπωσε την άποψη ότι είναι το αποτέλεσμα εξασθένησης της οστικής παραγωγής λόγω την έλλειψης οιστρογόνων (Riggs et al. 1982). Ως συνέπεια, προτάθηκε η θεωρία ότι υπάρχουν δύο τύποι οστεοπόρωσης, η σχετιζόμενη με την έλλειψη οιστρογόνων κατά την εμμηνόπαυση (οστεοπόρωση τύπου I) και

η σχετιζόμενη με την έλλειψη ασβεστίου και γήρανσης του σκελετού (οστεοπόρωση τύπου II).

Η οστεοπόρωση συχνά δεν διαγιγνώσκεται 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. 1941). 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).

Η οστεοπόρωση είναι μια συστηματική πολυπαραγοντική νόσος που χαρακτηρίζεται από μειωμένη οστική πυκνότητα και αλλοίωση της μικροαρχιτεκτονικής δομής των οστών οδηγώντας σε αυξημένη ευθραυστότητα και επιρρέπεια για κατάγματα. Είναι η πιο συχνή μεταβολική πάθηση των οστών και χαρακτηρίζεται από παράλληλη ελάττωση των αλάτων και της οργανικής θεμέλιας ουσίας του οστίτη ιστού. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση της ποσότητας του οστίτη ιστού χωρίς όμως να επηρεάζεται η κανονική του σύσταση. Η οστεοπόρωση είναι ασυμπτωματική νόσος, χαρακτηρίζεται συχνά ως η «σιωπηλή» νόσος των οστών και προκαλεί κατάγματα (συνήθως συμπιεστικό κάταγμα των σπονδύλων ή κάταγμα του καρπού, του ισχίου, των πλευρών, της πυέλου ή του βραχιόνιου οστού) και παραμορφώσεις. Το οστεοπορωτικό κάταγμα μπορεί να προκαλείται από τραύμα (π.χ. πτώση) ή και αυτόματα, δηλαδή χωρίς την παρουσία τραύματος. Μία στις δύο γυναίκες και ένας στους τέσσερις άντρες πάνω από την ηλικία των πενήντα ετών μπορεί να εμφανίσει οστεοπορωτικό κάταγμα (Gullberg et al. 1997).

1.8.1 Φυσιολογία Οστεοπόρωσης

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).

Σύμφωνα με το Εθνικό Ίδρυμα Οστεοπόρωσης και Νοσημάτων των Οστών των Ηνωμένων Πολιτειών (The National Osteoporosis Foundation of the United States) μπορεί να μην γνωρίζουμε ότι τα οστά μας έχουν γίνει οστεοπορωτικά μέχρι που μια ξαφνική πτώση μας οδηγήσει σε κάταγμα. Η οστεοπόρωση μπορεί να είναι ιδιοπαθής ή δευτεροπαθής. Η ιδιοπαθής εμφανίζεται σε σχετικά νεαρές γυναίκες στα πρώτα 15 χρόνια μετά την εμμηνόπαυση. Προσβάλλει το σπογγώδες οστό και κυρίως τα σπονδυλικά σώματα και το περιφερειακό άκρο της κερκίδας. Αποτέλεσμα είναι τα σπονδυλικά κατάγματα της κερκίδας (κατάγματα Colles). Από τα σπονδυλικά κατάγματα προκαλείται έντονη ραχιαλγία και προοδευτική απώλεια αναστήματος που συνοδεύεται από κύφωση. Τα σπονδυλικά κατάγματα προκαλούν αναπηρικές καταστάσεις και δυσλειτουργία. Η δευτεροπαθής οστεοπόρωση προκαλείται όταν κάποιος από τους παράγοντες κινδύνου είναι κυρίαρχος και αποκλειστικός σχεδόν παράγων πρόκλησης της οστεοπόρωσης. Μπορεί, λοιπόν, να προκληθεί δευτερογενής οστεοπόρωση από εξωγενή χορήγηση κορτικοστεροειδών, από υπερπαραθυρεοειδισμό ή τοξική δράση της εξωγενώς χορηγούμενης θυροξίνης, από συστηματική ακινητοποίηση, από πρωτοπαθή αμηνόρροια, από ψυχογενή ανορεξία, από διαβήτη τύπου I και από αλκοολισμό. Στην οστεοπόρωση τύπου I ο μηχανισμός που οδηγεί στην οστική απώλεια είναι η έλλειψη οιστρογόνων. Η έλλειψη οιστρογόνων αυξάνει την τοπική παραγωγή κυτταροκινών όπως είναι η IL-1, IL-6 και ο TNF που διεγείρουν την έκφραση του RANKL, μειώνει την έκφραση της OPG επάγοντας την οστική απορρόφηση.

1.8.2 Θεραπευτική Προσέγγιση κατά της Οστεοπόρωσης

1.8.2.1 Οστεο-καταβολικά Φάρμακα

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. 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. 1970). Λόγω της μεγάλης ομοιότητάς τους με το ασβέστιο, τα διφωσφονικά φάρμακα μεταφέρονται με ταχύτητα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και συσσωρεύονται στις επιφάνειες όπου πραγματοποιείται οστική αναδόμηση (Masarachia et al. 1996).

Η χορήγηση των διφωσφονικών αλάτων γίνεται ενδοφλέβια ή στοματικώς και διακρίνονται σε δύο ομάδες: τα μη αζωτούχα και τα αζωτούχα διφωσφονικά. Όλα τα διφωσφονικά άλατα φέρουν δύο φωσφονικές ομάδες ενωμένες σε κεντρικό άνθρακα (P-C-P δομή) που προσομοιάζουν τη δομή του πυροφωσφορικού οξέως και 2 πλευρικές αλυσίδες (R_1 και R_2). Τα μη αζωτούχα διφωσφονικά έχουν μία απλή πλευρική αλυσίδα όπου μεταβολίζονται σε μη υδρολυτά ανάλογα της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) προκαλώντας την απόπτωση των οστεοκλαστών (Frith et al. 2001). Ένα πολύ επιτυχημένο διφωσφονικό της κατηγορίας αυτής αποτελεί η ετιδρονάτη που κυκλοφορεί με το εμπορικό όνομα Didronel® για την θεραπεία της οστεοπόρωσης (Watts et al. 1990; Francis & Valent 2007).

Τα αζωτούχα διφωσφονικά φέρουν μία πλευρική αλυσίδα R_1 ως υδροξύλιο και μία δεύτερη πλευρική αλυσίδα R_2 η οποία είναι είτε ένα αζωτούχο μόριο ενωμένο με μία ανθρακική αλυσίδα (alendronate, pamidronate) ή ένας ετεροκυκλικός δακτύλιος (risedronate και zoledronate). Τα αζωτούχα διφωσφονικά παρεμποδίζουν την δράση του ενζύμου της

συνθάσης του φωσφορικού φαρσενύλιου (FPPS) που συμμετέχει στην πρενυλίωση και την υποκυτταρική χωροθέτηση των πρωτεϊνών (Luckman et al. 1998; Fisher et al. 1999), όπως τις μικρές GTPases οι οποίες ρυθμίζουν κρίσιμες διεργασίες για την λειτουργικότητα των οστεοκλαστών (Itzstein et al. 2011). Αποτέλεσμα αυτής της παρεμποδιστικής δράσης των αζωτούχων διφωσφονικών συσχετίζεται με την ικανότητα παρεμπόδισης της οστικής απορρόφησης in vivo. Τα πιο δραστικά διφωσφονικά της κατηγορίας αυτής είναι η αλενδρονάτη (Fosamax®) και η ζολενδρονάτη (Aclasta®) που βελτιώνουν σημαντικά την κλινική εικόνα του ασθενή (Black et al. 2000; Räkel et al. 2011; Black et al. 2012). Ωστόσο, παρατεταμένη χρήση των διφωσφονικών μπορεί να προκαλέσει αποδυνάμωση των οστών με σοβαρές παρενέργειες όπως καρκίνο του οισοφάγου και οστεονέκρωση της κάτω γνάθου (Whitaker et al. 2012).

Η καλσιτονίνη (Calcitonin) είναι μία φυσική ορμόνη που παράγεται και εκκρίνεται από τα θυροειδή C-κύτταρα και ρυθμίζει τα επίπεδα ασβεστίου σε περιόδους φυσιολογικού στρες όπως κατά την εγκυμοσύνη και την γαλουχία (Kirk & Hepfinger 2005). Η καλσιτονίνη δρα άμεσα επηρεάζοντας την ενεργότητα των οστεοκλαστών (Chambers & Magnus 1982) και έχει εγκριθεί η κυκλοφορία του για την θεραπεία της οστεοπόρωσης όμως δεν είναι τόσο δραστικό σε σύγκριση με τα διφωσφονικά άλατα (Downs et al. 2000). Ωστόσο, νεότερα δεδομένα θέλουν να συσχετίζουν την χρήση της καλσιτονίνης με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, οπότε έγιναν συστάσεις για την μη συνταγογράφηση του φαρμάκου έναντι της οστεοπόρωσης.

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 (Ominsky et al. 2007) και αντισωμάτων κατά της RANKL (Ominsky et al. 2011), 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. 2001b) αλλά και του γεγονότος ότι ο OPG προσδένεται και σε ένα άλλο μέλος της TNF υπερικογένειας, το TRAIL (Emery et al. 1998).

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 μεταγωγής 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. 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 $\leq 0,1$ 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).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν πως το denosumab θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με ασφάλεια στην θεραπεία ασθενειών που σχετίζονται με την απώλεια οστικής μάζας. Τον

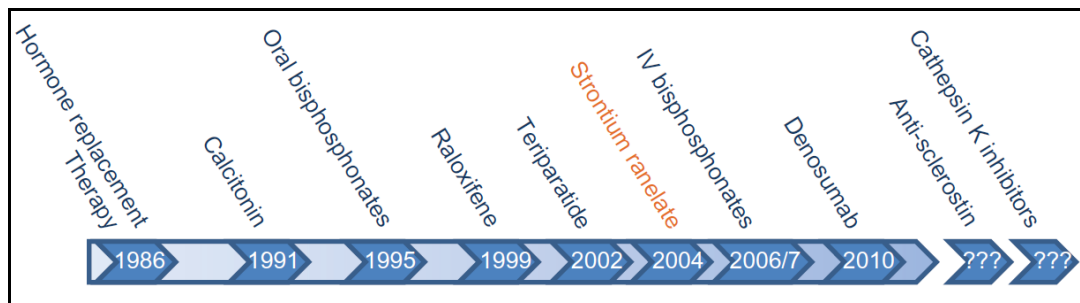
Ιούνιο του 2010 η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (United States Food and Drug Administration – FDA) και της Ευρώπης (European Medicines Agency in Europe, EMA) ενέκρινε την χρήση του αντισώματος denosumab για την θεραπεία της οστεοπόρωσης σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες και σε περιπτώσεις απώλειας οστικής μάζας λόγω αφαίρεσης ορμονών σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη. Το αντίσωμα κυκλοφόρησε ως εμπορικό προϊόν με την ονομασία Prolia (Perrone M 2010) και κυκλοφορεί στην Ελλάδα από το καλοκαίρι του 2010, ενώ πρόσφατα εγκρίθηκε η χρήση του και στην Ιαπωνία.

1.8.2.2 Οστεο-αναβολικά Φάρμακα

Η παραθυροειδής ορμόνη (Parathyroid hormone-1–84; PTH) παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία του ασβεστίου στον οργανισμό και διατηρεί τα επίπεδα του σταθερά σε ένα φυσιολογικό εύρος, αφού διεγείροντας τους οστεοκλάστες προκαλεί οστική απορρόφηση και απελευθέρωση ασβεστίου (Fitzpatrick & Bilezikian 2006). Μολονότι φαίνεται ότι η PTH έχει καταβολική δράση εντούτοις φαίνεται ότι έχει και αναβολική επίδραση στην οστική παραγωγή όταν χορηγείται ενδιάμεσα σε χαμηλές δόσεις (Reeve et al. 1980). Η περιπαρατίδη (Teriparatide) είναι ένα ανάλογο της ανθρώπινης παραθυροειδούς ορμόνης (1–34 amino acid peptide) που εμπορικά κυκλοφορεί με το όνομα Forteo® και χορηγείται για την θεραπεία της οστεοπόρωσης σε περιπτώσεις με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης κατάγματος. Η περιπατίδη χορηγείται υποδόρια (20μg/ημέρα) είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική όταν συνδυάζεται με κάποιο άλλο αντι-οστεοπορωτικό φάρμακο όπως την αλενδρονάτη βελτιώνοντας την οστική πυκνότητα των σπονδύλων και των κάτω άκρων σε περιπτώσεις μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης και γλυκοκορτικοειδούς επαγόμενης οστεοπόρωσης (Saag et al. 2007; Finkelstein et al. 2009; Yamamoto et al. 2013).

Ένα ακόμη οστεο-αναβολικό φάρμακο για την θεραπεία της οστεοπόρωσης είναι το ρανελικό στρόντιο (Strontium ranelate). Τα ιόντα του ρανελικού στρόντιου έχουν την τάση να υποκαθιστούν τα ιόντα ασβεστίου από τον οστίτη ιστό χωρίς να επηρεάζει την διαδικασία επιμετάλλωσης του οστίτη ιστού (Boivin et al. 1996). Το ρανελικό στρόντιο κυκλοφορεί με το εμπορικό όνομα Protelos® και βελτιώνει την οστική πυκνότητα των σπονδύλων και του ισχίου μειώνοντας την πιθανότητα πρόκλησης καταγμάτων (Meunier et al. 2002; Meunier et al. 2004; Reginster et al. 2005). Η προστατευτική δράση του φαρμάκου είναι αποτέλεσμα της αύξησης της αναβολικής δράσης των οστεοβλαστών και της ταυτόχρονης μείωσης της ενεργότητας των οστεοκλαστών (Bonnelye et al. 2008). Ο μοριακός μηχανισμός δράσης του ρανελικού στρόντιου δεν είναι απόλυτα ξεκάθαρος, ωστόσο φαίνεται ότι επηρεάζει τον υποδοχέα CaSR που ρυθμίζει τα επίπεδα του ασβεστίου στον εξωκυττάριο χώρο (Hurtel-

Lemaire et al. 2009; Fromigu et al. 2009). Η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (United States Food and Drug Administration – FDA) ωστόσο δεν εγκρίνει την κυκλοφορία του ρανελικού στρόντιου μετά από αναφορές για διάφορες παρενέργειες του φαρμάκου όπως εξανθήματα στο δέρμα και φλεβική θρόμβωση (Rizzoli & Reginster 2011). Μόνο η Ευρωπαϊκή Υπηρεσία επιτρέπει την περιορισμένη χρήση του φαρμάκου σε ασθενείς που έχει αποτύχει η θεραπεία με διφωσφονικά με σκοπό την αποτροπή οστεοπορωτικών καταγμάτων. Η εφαρμογή της θεραπείας ορμονικής αντικατάστασης με οιστρογόνα για μεγάλο χρονικό διάστημα έναντι της οστεοπόρωσης είχε σαν αποτέλεσμα την πρόκληση σοβαρών παρενεργειών όπως δυσλειτουργίες του καρδιαγγειακού συστήματος και εμφάνιση καρκίνου του μαστού και της μήτρας. Έτσι, πλέον έχει εγκαταληφθεί η θεραπεία ορμονικής αντικατάστασης με οιστρογόνα και έχει εστιαστεί η έρευνα στην ανάπτυξη και αξιολόγηση Εκλεκτικών Ρυθμιστών των Οιστρογονικών Υποδοχέων (SERM). Το raloxifene (Evista®) αποτελεί ένα πετυχημένο παράδειγμα εκλεκτικού ρυθμιστή των οιστρογονικών υποδοχέων που έχει εγκριθεί η κυκλοφορία του για την πρόληψη κατά της οστεοπόρωσης στις γυναίκες το 1997. Το raloxifene χορηγείται στοματικά (60 mg) και είναι εξίσου αποτελεσματικό όπως η αλενδρονάτη. Παρακάτω δίνεται σχηματικά (Εικ. 1.22) η χρονική πορεία ανάπτυξης και κυκλοφορίας των φαρμακευτικών ουσιών για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης από το 1986 μέχρι και σήμερα.



Εικόνα 1.22. Σχηματική απεικόνιση των κύριων σταθμών στην έγκριση κυκλοφορίας νέων φαρμάκων κατά της οστεοπόρωσης από το 1986 μέχρι σήμερα

1.8.3 Νέοι Θεραπευτικοί Στόχοι κατά της Οστεοπόρωσης

Η πρόοδος που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν και ρυθμίζουν την οστική ανακατασκευή, έχει δώσει νέα ώθηση στην ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προσεγγίσεων με σκοπό την πρόληψη και θεραπεία της οστεοπόρωσης. Τα νέα φάρμακα που αναπτύσσονται διακρίνονται σε δύο κατηγορίες

ανάλογα με την αναβολική ή καταβολική τους δράση στον οστικό μεταβολισμό. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει αναστολείς που κυρίως παρεμποδίζουν την ενεργότητα των οστεοκλαστών. Μεταξύ αυτών, η καθεψίνη K εκφράζεται αποκλειστικά στους οστεοκλάστες και είναι λυσοσωμική πρωτεάση που συμμετέχει ενεργά στην αποδόμηση του κολλαγόνου τύπου I και II κατά την διεργασία της οστικής απορρόφησης. Μεταλλάξεις της καθεψίνης K έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με πυκνοδυσόστωση (runcnodysostosis), μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από μη λειτουργικούς οστεοκλάστες ενώ και σε πειραματικά μοντέλα που έχει αδρανοποιηθεί το γονίδιο της καθεψίνης K εμφανίζεται έντονος οστεοπετρωτικός φαινότυπος. Έτσι, η καθεψίνη K αποτελεί έναν δυνητικά σημαντικό θεραπευτικό στόχο έναντι της οστεοπόρωσης. Πολυάριθμα μικρά μόρια αναστολείς της καθεψίνης K έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα, πολλά από τα οποία όμως έχουν εγκαταληφθεί λόγω μειωμένης εκλεκτικότητας και εμφάνισης παρενεργειών. Το Odanacatib (MK-0822, Merck) είναι ένα ειδικό μικρό μόριο αναστολέας της καθεψίνης K με αρκετά θετικά αποτελέσματα. Το Odanacatib φέρεται αρκετά αποτελεσματικό προκαλώντας αύξηση της πυκνότητας των οστών σε ημερήσιες δόσεις των 50mg, ενώ παρουσιάζει χρόνο ημιζωής πάνω από 93 ώρες. Επιπλέον το Odanacatib μειώνει σημαντικά τον ρυθμό οστικής απορρόφησης ενώ ταυτόχρονα διατηρεί σταθερά την οστική παραγωγή. Σήμερα το Odanacatib βρίσκεται στην τρίτη φάση των κλινικών δοκιμών σε γυναίκες με οστεοπόρωση (NCT00529373 και NCT00729183). Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για τρία ακόμα μόρια αναστολείς της καθεψίνης K που είναι υπό ανάπτυξη και αξιολόγηση. Το ONO-5334 (Ono Pharmaceutical) βρίσκεται στην δεύτερη φάση των κλινικών δοκιμών, το Relacatib (SB-462795) που αναπτύσσεται από την εταιρεία GlaxoSK, ενώ το MIV-711 που αναπτύσσεται από την φαρμακευτική εταιρεία Medivir AB (Switzerland) βρίσκεται στο στάδιο I (Πίν.1.IV). Στην κατηγορία των οστεο-κατασταλτικών μελλοντικών φαρμάκων εκτός από τους αναστολείς της καθεψίνης K υπάρχει και μία αναφορά για έναν νέο αναστολέα του RANKL που παρουσιάστηκε για πρώτη φορά το 2011 από την εταιρεία Ablynx. Ο νέος αυτός αναστολέας έχει το κωδικό όνομα ALX-0141, είναι ένα νανοαντίσωμα (nanobody) το οποίο αναστέλλει πολύ αποτελεσματικά τον RANKL ενώ βρίσκεται σε φάση αξιολόγησης (Schoen et al. 2013).

a/a	Category	Target	Type	Name	Manuf/rer	Clinical Trials
1	Antiresorptive	Anti-RANKL Drug	Anti-RANKL Nanobody	ALX-0141	Ablynx	Phase I
2	Antiresorptive	Cathepsin K Inhibitor	Small Compound	Odanacatib(MK-0822)	Merck	Phase III
3	Antiresorptive	Cathepsin K Inhibitor	Small Compound	Balicatib(AAE581)	Novartis	Phase II
4	Antiresorptive	Cathepsin K Inhibitor	Small Compound	Relacatib(SB-462795)	GlaxoSK	Phase I
5	Antiresorptive	Cathepsin K Inhibitor	Small Compound	ONO-5334	Ono Pharrma/cals	Phase II
6	Osteoanabolic	Anti-Sclerostin Drug	Humanized Monoclonal Ab	AMG785	Amgen	Phase I
7	Osteoanabolic	Anti-Sclerostin Drug	Humanized Monoclonal Ab	AMG167	Amgen	Phase I
8	Osteoanabolic	Anti-Dickkopf-1 Drug	Fully Humanized Ab	BMQ-880	Novartis	Phase II
9	Antiresorptive	Src Inhibitor	Small Compound	Saracatinib (AZD0530)	AstraZeneca	Phase II
10	Osteoanabolic	CaSR antagonist		JTT-305/MK-5442	Merck	Phase II

Πίνακας 1.IV. Συνοπτικός πίνακας που περιλαμβάνει νέους φαρμακευτικούς στόχους κατά της οστεοπόρωσης που βρίσκονται σε στάδιο ανάπτυξης και κλινικών δοκιμών.

Στην κατηγορία των οστεο-αναβολικών τα περισσότερα νέα φάρμακα που αναπτύσσονται στοχεύουν στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt. Η ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού επάγει την διαφοροποίηση των οστεοβλαστών μέσω της β-κατενίνης που μεταφέρεται στον πυρήνα ενεργοποιώντας τους κατάλληλους μεταγραφικούς παράγοντες. Έτσι, το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-catenin προσφέρεται για τον σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών στόχων όπου ενεργοποίησή του έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των οστεοβλαστών και της οστικής παραγωγής. Η ανακάλυψη των θεραπευτικών στόχων του DKK-1, GSK-3b και της σκληροστίνης (sclerostin) πραγματοποιήθηκε μέσα από την μελέτη πειραματικών μοντέλων στα οποία είχε γίνει απενεργοποίηση των παραπάνω γονιδίων. Η σκληροστίνη είναι μία πρωτεΐνη που παράγεται αποκλειστικά από τα οστεοκύτταρα και μεταφέρεται στους οστεοβλάστες παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt μέσω ανταγωνιστικής πρόσδεσης στους υποδοχείς LRP5 και LRP6 (Εικ.1.23).

Προκλινικές μελέτες σε αρουραίους και πιθήκους έδειξαν ότι αναστολή της δράσης της σκληροστίνης προκαλεί σημαντική αύξηση της οστικής παραγωγής χωρίς ταυτόχρονη αύξηση της οστικής απορρόφησης. Σε φάση I κλινικής μελέτης βρίσκεται ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ανθρώπινης σκληροστίνης (AMG 785, Amgen) το οποίο δοκιμάζεται σε υγιείς ασθενείς για διάστημα 85 ημερών. Δεν παρουσιάζει κάποιες επιπλοκές και φαίνεται ότι προκαλεί αύξηση της οστικής μάζας και πυκνότητας τόσο στους σπονδύλους όσο και στα κάτω άκρα με ταυτόχρονη μείωση της οστικής απορρόφησης μετρώντας τον δείκτη CTx. Παράλληλα αναπτύσσεται ένα ακόμα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της σκληροστίνης το

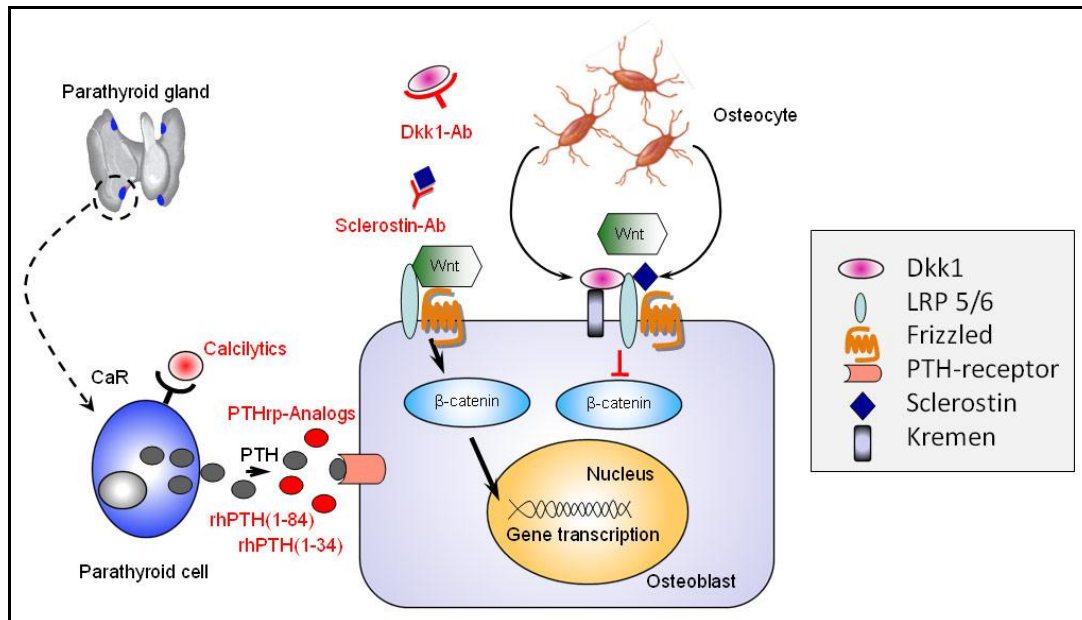
AMG 167 το οποίο βρίσκεται στην πρώτη φάση κλινικών δοκιμών για την θεραπεία της οστεοπενίας (NCT01101048).

Το DKK-1 (dickkopf-1) είναι ακόμα ένας πολλά υποσχόμενος φαρμακευτικός στόχος. Το DKK-1 είναι ένα μόριο που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα LRP5/6 και τον υποδοχέα Kremen (υποδοχέας του DKK-1) σχηματίζοντας ένα τριμερές σύμπλοκο που αναστέλλει τους υποδοχείς LRP5/6 με παρεμπόδιση του σηματοδοτικού Wnt μονοπατιού. Έτσι, η ανάπτυξη νέων αναστολέων του DKK-1 αποτελεί ιδιαίτερα μεγάλη πρόκληση καθώς θεωρητικά μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt και ενεργοποίηση των οστεοβλαστών. Θεραπεία ποντικών με πολλαπλή μυελίτιδα χορηγώντας ένα μονοκλωνικό anti-DKK-1 αντίσωμα έδειξε σημαντική αύξηση του αριθμού των οστεοβλαστών, με μειωμένο αριθμό οστεοκλαστών και μείωση του μυελώματος. Σε στάδιο ανάπτυξης και δοκιμών βρίσκεται ένα νέο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της DKK-1 του ανθρώπου (BMQ-880) σε ασθενείς με πολλαπλή μυελίτιδα.

Παρεμπόδιση του GSK-3 (glycogen synthase kinase-3b) θα μπορούσε να αποτρέψει την φωσφορυλίωση της β-κατενίνης, σταθεροποιώντας το μόριο ανεξάρτητα από τις αλληλεπιδράσεις που μπορεί να έχει με τους υποδοχείς LRP5/6. Σε ποντίκια που χορηγήθηκε χλωριούχο λίθιο, που είναι αναστολέας του GSK-3, είχε σαν αποτέλεσμα αύξηση της οστικής παραγωγής και οστικής μάζας. Επιπλέον, θεραπεία σε αρουραίους που είχαν προβεί σε ωθηκεκτομή έγινε χορήγηση ενός νέου αναστολέα διπλής δράσης, τον GSK a/b (LY603281-31-8), για διάστημα 2 μηνών. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση του αριθμού και της πυκνότητας του σπογγώδους οστού που συσχετιζόταν με αυξημένο ρυθμό οστικής παραγωγής.

Τέλος, τα ασβεστιολυτικά (calcilytics), είναι μόρια ανταγωνιστές του υποδοχέα CaR όπως το JTT-305/ MK-5442 και SB-423557 που διεγείρουν την παραγωγή της παραθυρομόνης PTH με αποτέλεσμα την αυξημένη οστική παραγωγή και αποτροπή της οστικής απώλειας σε αρουραίους με ωθηκεκτομή. Ωστόσο, οι κλινικές δοκιμές του MK-5442 σε γυναίκες με οστεοπόρωση σταμάτησαν το 2011 για λόγους που δεν έχουν ανακοινωθεί μέχρι σήμερα.

Λόγω της συνεχούς αύξησης του προσδόκιμου ζωής η οστεοπόρωση αποτελεί μια μάστιγα που προσβάλλει όλο και περισσότερους ανθρώπους. Συνεπώς, η εύρεση και αξιολόγηση νέων αντι-οστεοπορωτικών φαρμάκων σε κατάλληλα πειραματικά μοντέλα οστεοπόρωσης σε προκλινικό επίπεδο κρίνεται αναγκαία.



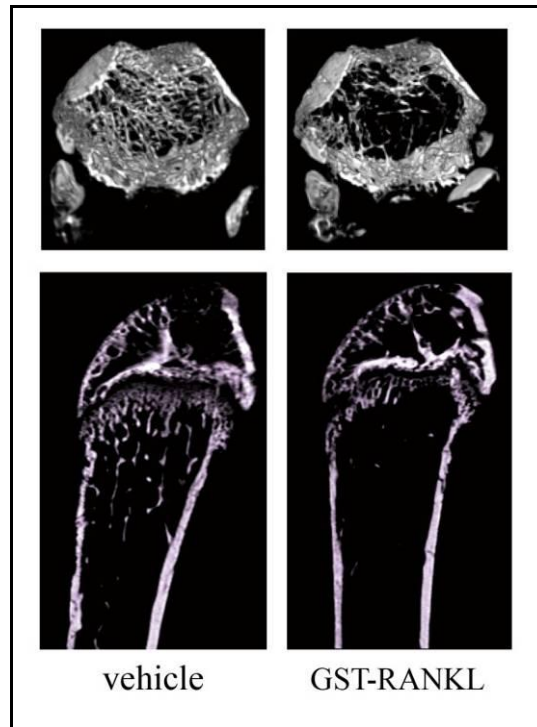
Εικόνα 1.23. Σχηματική απεικόνιση του Wnt/β-catenin μονοπατιού και των φαρμακευτικών παρεμποδιστών έναντι των DKK-1 και Sclerostin. (Lippuner 2012).

1.8.4 Πειραματικά Μοντέλα Οστεοπόρωσης

Η ανάπτυξη πειραματικών μοντέλων οστεοπόρωσης αποτελεί ένα δυναμικό ερευνητικό πεδίο και μέχρι σήμερα λίγα πειραματικά μοντέλα χρησιμοποιούνται στην πράξη. Το πιο διαδεδομένο μοντέλο οστεοπόρωσης αποτελεί η χρήση πειραματοζώων στα οποία επάγουν οστική απώλεια με την μέθοδο ωθηκεκτομής (OVX) (Kalu et al. 1989; Bouxsein et al. 2005). Με την ωθηκεκτομή προκαλείται μείωση των επιπέδων των οιστρογόνων στα θηλυκά, με αύξηση της έκφρασης του RANKL που οδηγεί σε σημαντική οστική απώλεια (Kalu et al. 1993). Η ωθηκεκτομή εφαρμόζεται σε θηλυκά ηλικίας 6-8 εβδομάδων, με επαγωγή οστικής απώλειας η οποία είναι εμφανής στο σπογγώδες οστό μετά από 4 εβδομάδες. Ωστόσο, η χρήση OVX ποντικών περιορίζεται μόνο στα θηλυκά, απαιτεί μεγάλο χρόνο εφαρμογής ενός θεραπευτικού πρωτοκόλλου και χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό που θα πραγματοποιήσει τις χειρουργικές επεμβάσεις.

Πρόσφατα, δημιουργήθηκαν νέα πειραματικά μοντέλα οστεοπόρωσης στα οποία επιτυγχάνεται οστική απώλεια σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Χορήγηση ανασυνδυασμένης ή εκκκριτικού τύπου RANKL πρωτεΐνης σε άγριου τύπου ποντίκια έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή οστικής απώλειας μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Εφαρμόζονται 3 διαφορετικές προσεγγίσεις χορήγησης RANKL. Στην πρώτη περίπτωση γίνεται ενδοπεριτονιακή χορήγηση 2mg/Kg GST-RANKL από 24 μέχρι 50 ώρες σε άγριου τύπου ποντίκια ή αρουραίους. Μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα παρατηρείται σημαντική

μείωση του σπογγώδους οστού και μείωση της οστικής πυκνότητας (Tomimori et al. 2009) (Εικ. 1.24). Το μοντέλο GST-RANKL-εξαρτώμενης οστικής απώλειας εμφανίζει περισσότερα πλεονεκτήματα συγκριτικά με το μοντέλο της ωθηκεκτομής (OVX) όπως σημαντικά μικρότερος χρόνος επίτευξης οστικής απώλειας, δεν περιορίζεται μόνο στα θηλυκά ενώ ο προκλινικός έλεγχος νέων φαρμάκων πραγματοποιείται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (Πίν. 1.V).



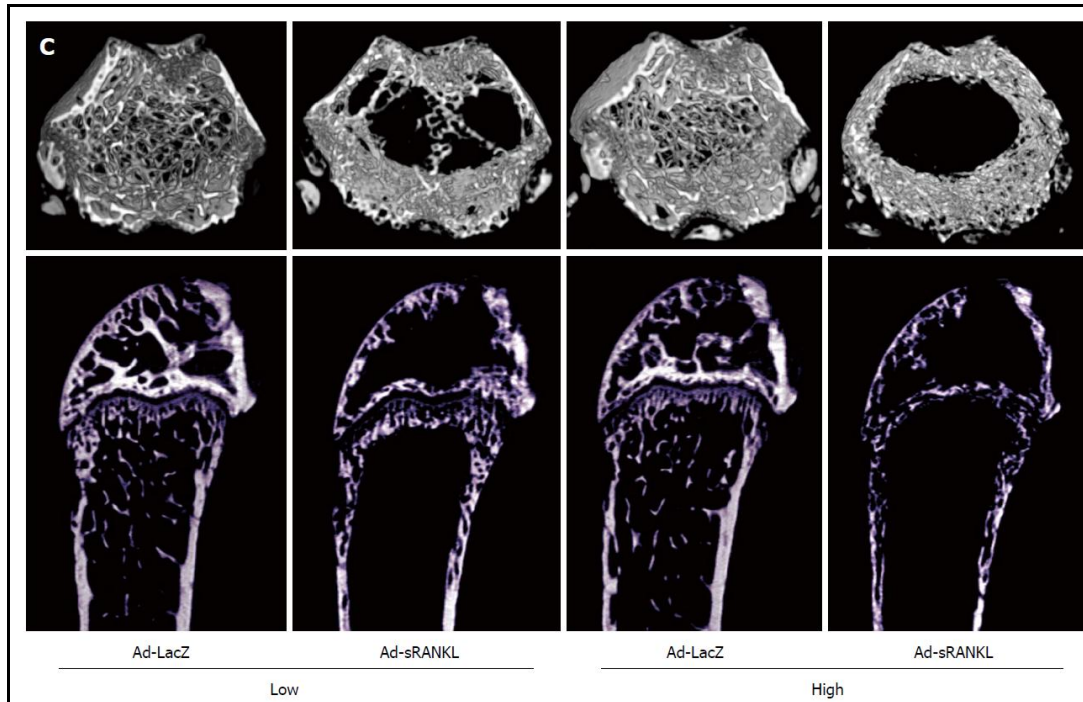
Εικόνα 1.24. Μοντέλο GST-RANKL επαγόμενης οστικής απώλειας. Τρισδιάστατες απεικονίσεις με μικροτομογραφία στην περιοχή του μηριαίου όπου διακρίνεται η απώλεια του σπογγώδους οστού στο GST-RANKL επαγόμενο μοντέλο (Yasuda 2013).

Technique	OVX model	GST-RANKL bone loss model
Technique	OVX	Intraperitoneal injections
Term for establishment	> 4 wk	24-50 h
Term for evaluation of BP	> 4 wk	3 d
Term for evaluation of PTH	> 4 wk	14 d
Term for evaluation of SERM	> 4 wk	18 d
Term for evaluation of anti-human RANKL	No	9 d
Term for evaluation of Tec tyrosine kinase inhibitor	NA	50 h
Evaluation of male animals	No	Yes
Term for pharmacological experiments	Several mon	Several wk/d
Advantages	Human disease model	Rapid, easy, simple, and inducible model

Πίνακας 1.V. Πίνακας που παρουσιάζονται συνοπτικά τα συγκριτικά πλεονεκτήματα του GST-RANKL model σε σχέση με το OVX model (Yasuda 2013).

Στη δεύτερη περίπτωση, χορηγείται υποδόρια εκκριτικού τύπου RANKL πρωτεΐνη (δύο φορές ανά ημέρα) για περίοδο 10 ημερών. Στο μοντέλο αυτό απαιτώνται μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεΐνης RANKL για να επιτευχθεί αυξημένη οστεοκλαστογένεση. Παρατηρείται σε κάποιες περιπτώσεις η εμφάνιση υπερασβεστιαμίας σε ζώα ύστερα από χορήγηση RANKL για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Lloyd et al. 2008).

Τέλος, στη τρίτη περίπτωση, πραγματοποιείται ενδοπεριτονιακή χορήγηση εκκριτικού τύπου RANKL πρωτεΐνης σε φορέα αδενιοίου (Ad-sRANKL) σε αρσενικά ποντίκια άγριου τύπου. Η αυξημένη έκφραση του RANKL προκαλεί έντονη οστεοπόρωση στα ζώα με σημαντική μείωση του σπογγώδους οστού δοκιμάζοντας είτε χαμηλή είτε υψηλή δοσολογία (Eik.1.25) (Enomoto et al. 2011).



Εικόνα 1.25. Μοντέλο Ad-sRANKL επαγόμενης οστικής απώλειας. Τρισδιάστατες απεικονίσεις με μικροτομογραφία στην περιοχή του μηριαίου όπου διακρίνεται η απώλεια του σπογγώδους οστού στο Ad-sRANKL επαγόμενο μοντέλο (χαμηλή-υψηλή δόση) (Yasuda 2013).

Ωστόσο η χρήση των παραπάνω μοντέλων οστεοπόρωσης για την αξιολόγηση αναστολέων του ανθρώπινου RANKL καθίσταται προβληματική λόγω της πειραματικής ετερογένειας. Έτσι γίνεται επιτακτική η ανάγκη δημιουργίας ενός κατάλληλου γενετικού μοντέλου το οποίο θα δίνει την δυνατότητα αξιολόγησης νέων αναστολέων του RANKL σε προκλινικό επίπεδο.

1.9 Στόχοι της διδακτορικής διατριβής

Οι στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι οι εξής:

1. Βιοχημικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός της μεταλλαγμένης RANKL^{G278R} πρωτεΐνης (ποντικού και ανθρώπου).
2. Βιοχημικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός της αντίστοιχης μετάλλαξης σε άλλα μέλη της υπερικογένειας του TNF (TNF, BAFF).
3. Αξιολόγηση της δράσης του μικρού μορίου SPD304, που αποτελεί αναστολέα του τριμερισμού του TNF, στην πιθανή αλληλεπίδραση και παρεμπόδιση του τριμερισμού του RANKL.
4. Αξιολόγηση της δράσης SPD-304 αναλόγων ως αναστολέων του RANKL σε λειτουργικές κυτταρικές δοκιμές οστεοκλαστογένεσης και σε κυτταρικές δοκιμές τοξικότητας.
5. Δημιουργία και χαρακτηρισμός του οστεοπορωτικού διαγονιδιακού μοντέλου υπερέκφρασης του RANKL με σκοπό την αξιολόγηση νέων πιθανών αναστολέων του RANKL του ανθρώπου σε προκλινικό επίπεδο.
6. Αξιολόγηση γνωστών αναστολέων του RANKL, όπως το μονοκλωνικό αντίσωμα Denosumab έναντι του RANKL του ανθρώπου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σχεδιασμός γονιδιακών κατασκευών του RANKL του ποντικού

2.1.1 Σχεδιασμός RANKL γονιδιακής κατασκευής στο pGEX-6P1

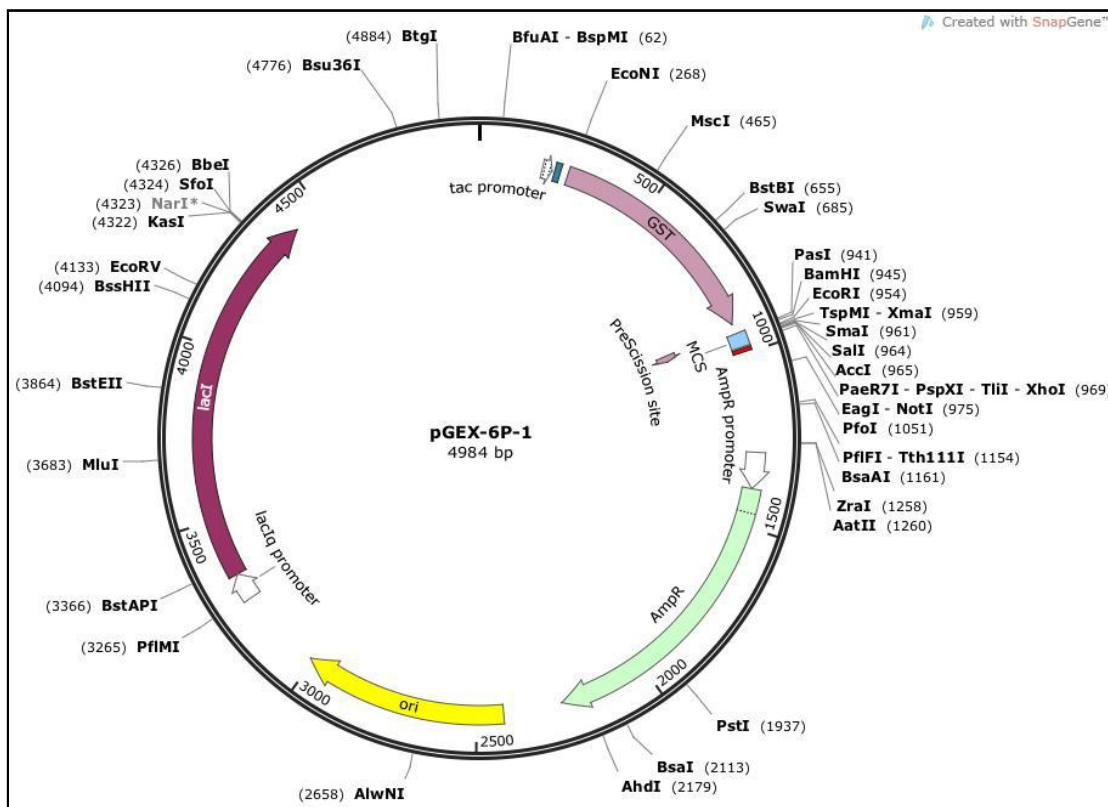
Το γονίδιο RANKL του ποντικού κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 316 αμινοξέων από την οποία παράγεται η εκκριτική της μορφή μεγέθους 158 αμινοξέων ύστερα από πρωτεολυτική αποκοπή (Εικ. 2.1).

```
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFP  
NLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGV  
RIAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALD  
VVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGG  
DHPPKSDLEVL FQGPLGSPEFPGRLE MKPEAQPFAHLTINAASIPSGSHKV  
TLS SWYHDRGWAKISNMTLSNGKLRVNQDGFYYLYANICFRHHETSGSVPTDYL  
QLMVYVVKTSIKIPSSHNL MKGGSTKNWSGNSEFH FYSINVGGFFKLRAGEE  
ISIQVSNPSLLDPDQDATYFGAFKVQDID
```

Εικόνα 2.1. Σχηματική απεικόνιση της αμινοξικής ακολουθίας του GST mouse RANKL (399aa-45kDa). Με πράσινο επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία του εκκριτικού muRANKL (160aa). Με γκρι επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία τμήματος του πλασμιδίου μετά την αποκοπή με την πρωτεάση Presscission μήκους 13aa → οπότε συνολικά **173aa** (19,2kDa).

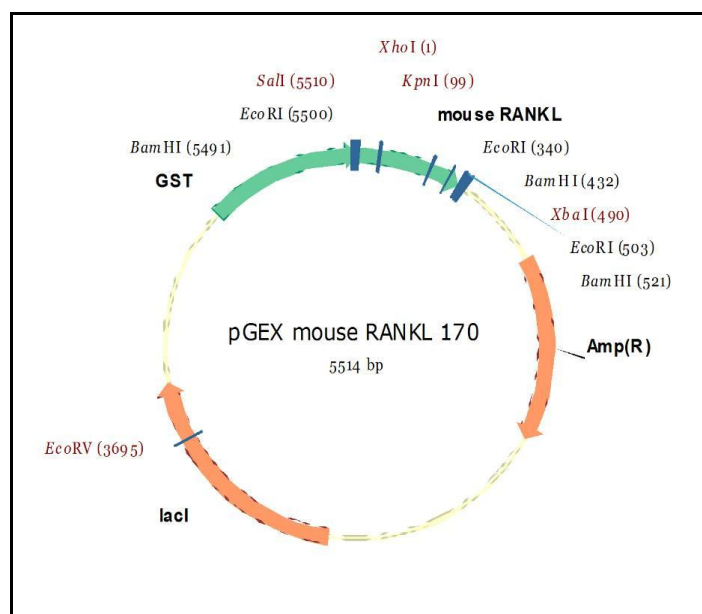
Με PCR και ως μήτρα cDNA από κύτταρα οστεοβλαστών απο ποντίκια άγριου τύπου έγινε υποκλωνοποίηση της εκκριτικής RANKL του ποντικού. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φέρουν θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων XhoI και XbaI αντίστοιχα. Ακολούθως στο PCR προϊόν έγινε καθαρισμός από το πήκτωμα αγαρόζης και στην συνέχεια πέψη με τα ένζυμα περιορισμού XhoI και XbaI. Το πλασμίδιο pGEX-6P1 κόπηκε αντίστοιχα με τα ένζυμα XhoI και NotI ενώ το άκρο της NotI με την δράση της Klenow τροποποιήθηκε σε 'τυφλό' άκρο έτσι ώστε να υπάρξει συμβατότητα με τα αντίστοιχα άκρα του ενθέματος που φέρει την RANKL. Μετά την λιγοποίηση το τελικό πλασμίδιο που προκύπτει φαίνεται στην εικόνα 2.4.

Εκκινητής	Ακολουθία
RANKLSOL.158.Xho-F	5'-TCACTCGAGATGAAGCCTGAGGCCAGCC-3'
RANKL3XbaTGA-R	5'-TCCTCTAGATCAGTCTATGTCCTGAAC-3'



Εικόνα 2.2. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη του πλασμιδιακού φορέα pGEX-6P1 όπου φαίνονται οι πολλαπλές θέσεις ενσωμάτωσης, η θέση κοπής της PreScission πρωτεάσης και η θέση της GST πρωτεΐνης

Το τελικό πλασμίδιο που προκύπτει φαίνεται στην (Εικ.2.3)



Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pGEX-6P1 που φέρει την εκκριτική RANKL πρωτεΐνη ενώ στο N άκρο της την GST πρωτεΐνη.

2.1.2 Σχεδιασμός RANKL^{G278R} γονιδιακής κατασκευής στο pGEX-6P1

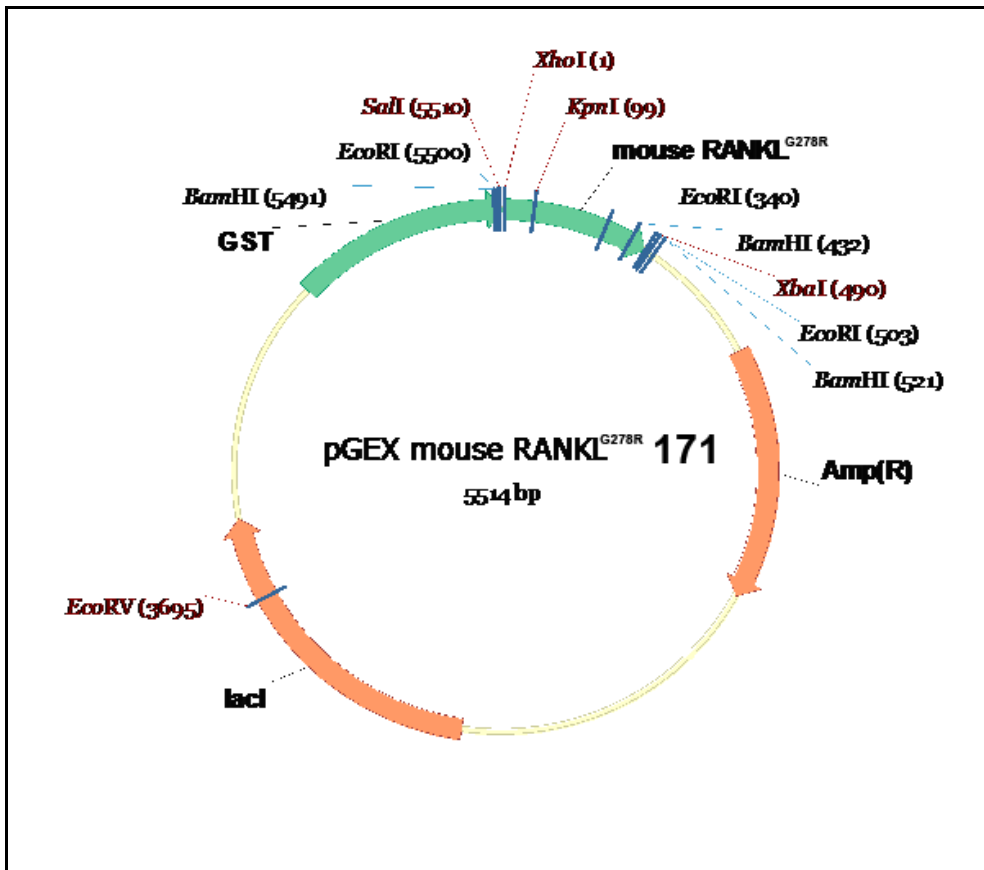
Το μεταλλαγμένο γονίδιο RANKL^{G278R} που φέρει την σημειακή μετάλλαξη έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος γλυκίνη στην θέση 278 σε αργινίνη και εμπεριέχεται στην ακολουθία της εκκριτικής πρωτεΐνης (Εικ.2.4).

```
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFP
NLPYYIDGDVKL TQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGV
SRIAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALD
VVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGG
DHPPKSDLEVL FQGPLGSPEFPGRLE MKPEAQPF AHLTINAASIPSGSHKVTL
S SWYHDRGWAKISNMTLSNGKLRVNQDGFYYLYANICFRHHETSGSVPTDYLQ
LMVYVVKTSIKIPSSHNLMKGGSTKNWSGNSEFHFYSINVG RFFKLRAGEEISI
QVSNPSSLDPDQDATYFGAFKVQDID
```

Εικόνα 2.4 . Σχηματική απεικόνιση της αμινοξικής ακολουθίας του GST mouse RANKL (399aa-45kDa). Με Πράσινο επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία του εκκριτικού muRANKL (160aa). Με Γκρι επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία τμήματος του πλασμιδίου μετά την αποκοπή με την πρωτεάση Presscission μήκους 13aa οπότε συνολικά 173aa (19,2kDa). Με κόκκινο η θέση υποκατάστασης στην θέση 278 G278R της διαμεμβρανικής RANKL .

Με PCR και μήτρα cDNA από κύτταρα οστεοβλαστών που απομονώθηκαν από τles ποντίκια έγινε υποκλωνοποίηση της εκκριτικής RANKL^{G278R} του ποντικού. Οι ίδιοι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν για την RANKL^{G278R} όπως στην περίπτωση της RANKL άγριου τύπου με θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων XhoI και XbaI αντίστοιχα. Ακολούθως στο προϊόν της αντίδρασης της PCR έγινε καθαρισμός από το πήκτωμα αγαρόζης και στην συνέχεια πέψη με τα ένζυμα περιορισμού XhoI και XbaI. Στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1 έγινε πέψη με τα ένζυμα XhoI και NotI ενώ το άκρο της NotI με την δράση της Klenow τροποποιήθηκε σε 'τυφλό' άκρο έτσι ώστε να υπάρξει συμβατότητα με τα αντίστοιχα άκρα του ενθέματος που φέρει την RANKL^{G278R}. Μετά την λιγοποίηση το τελικό πλασμίδιο που προκύπτει φαίνεται στην εικόνα 2.5.

Εκκινητής	Ακολουθία
RANKLSOL.158.Xho-F	5'-TCACTCGAGATGAAGCCTGAGGCCAGCC-3'
RANKL3XbaTGA-R	5'-TCCTCTAGATCAGTCTATGTCCTGAAC-3'



Εικόνα 2.5. Σχηματική απεικόνιση του πλασμιδιακού φορέα pGEX-6P1 που φέρει την εκκριτική RANKL^{G278R} πρωτεΐνη ενώ στο N άκρο της την GST πρωτεΐνη.

2.2 Σχεδιασμός γονιδιακής κατασκευής της εκκριτικής RANKL του ανθρώπου

2.2.1 Σχεδιασμός RANKL γονιδιακής κατασκευής στο pGEX-6P1

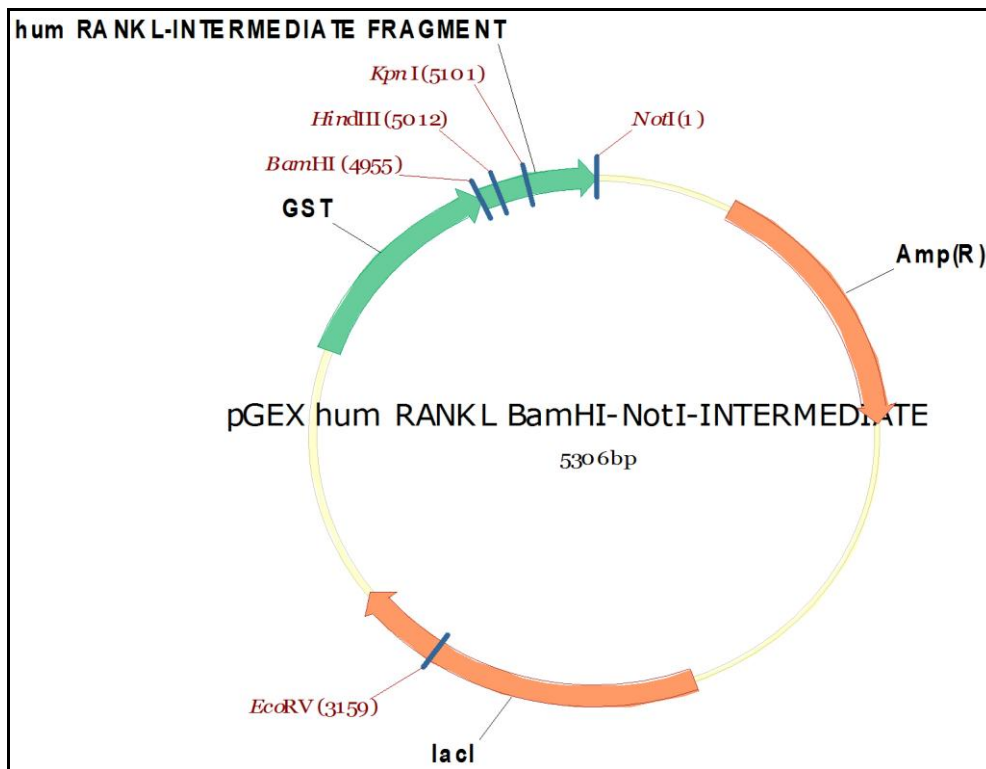
Το γονίδιο RANKL του ανθρώπου κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 317 αμινοξέων από την οποία παράγεται η εκκριτική της μορφή μεγέθους 158 αμινοξέων ύστερα από πρωτεολυτική αποκοπή (Εικ.2.6).

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKTLSMAIIRYIAD
 KHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRVIAYSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDF
 MLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLFGQP
 LGSMEKAMVDGSWLDLAKRSKLEAQPFAHLTINATDIPSGSHKVSLSWYHDRGWAKISNMTFSNGKLIVNQDGF
 YYLYANICFRHHETSGDLATEYLQLMVYVTKTSIKIPSSHTLMKGGSTKYWVSGNSEFHFYINVGFFKLRSGEIS
 IEVSNPSLLDPDQDATYFGAFKVRDID

Εικόνα 2.6 Σχηματική απεικόνιση της αμινοξικής ακολουθίας του GST hum RANKL (407aa). Με Πράσινο επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία της εκκριτικής humRANKL (176aa). Με Γκρι επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία τμήματος του πλασμιδίου μετά την αποκοπή με την πρωτεάση Presscission μήκους 5aa οπότε συνολικά 181aa (20kDa)

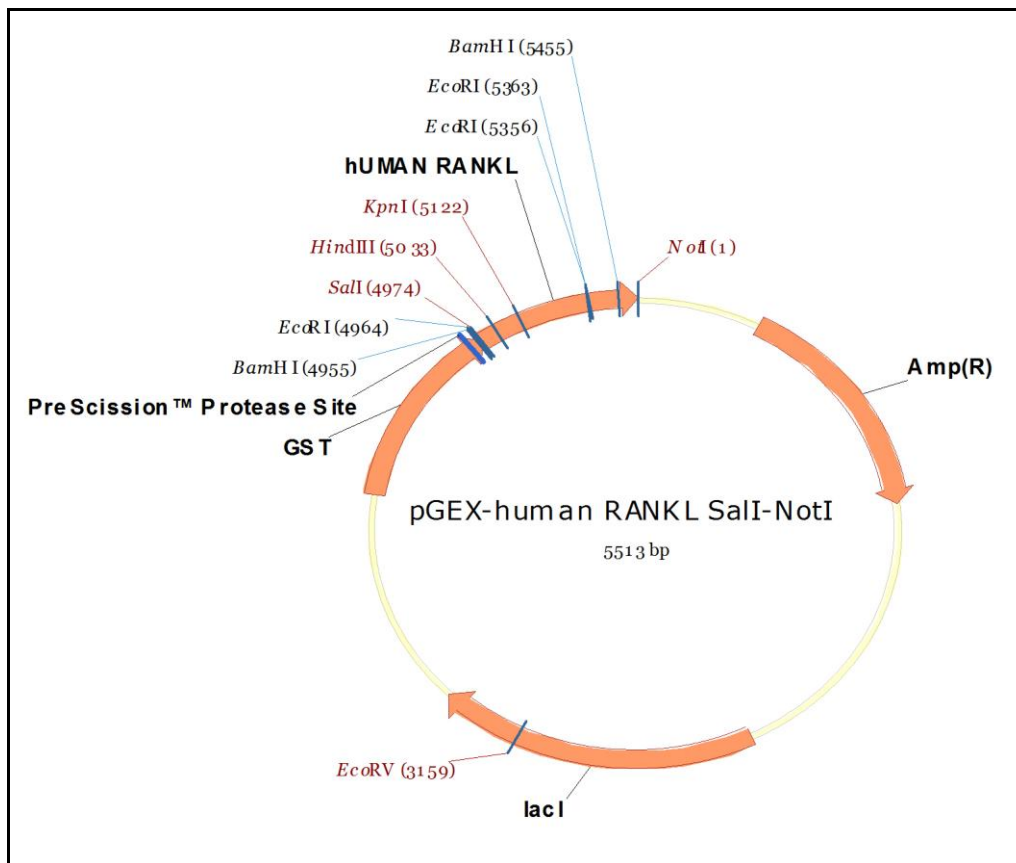
Εκκινητής	Ακολουθία
hum.RANKLBam-F	5'- CAGGGATCCATGGAGAAAGCGATGGTGGATGGGATCC -3'
hum.RANKLNot-R (internal)	5'- CAGGCGGCCGCCATCAGGGTATGAGAACTTGGG -3'

Για την υποκλωνοποίηση του ανθρώπινου RANKL χρησιμοποιήθηκε η πλήρης κωδική αλληλουχία (CDS) του cDNA (συλλογή I.M.A.G.E., κλώνος IRCMp5012B0913D) που παραλήφθηκε κλωνοποιημένο σε μορφή βακτηριακών stabs από την εταιρεία SourceBioscience. Η υποκλωνοποίηση έγινε τμηματικά για να παρακάμψουμε το πρόβλημα με την BamHI που κόβει εωτερικά στην κωδική περιοχή του RANKL. Το πρώτο τμήμα δεν περιέχει την θέση αναγνώρισης BamHI, έτσι υποκλωνοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα εκκινητή που φέρει την θέση αναγνώρισης BamHI και ένα εσωτερικό που φέρει την θέση NotI. Ακολούθως στο PCR προϊόν έγινε καθαρισμός από το πήκτωμα αγαρόζης και στην συνέχεια πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NotI. Ομοίως και στο πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1 έγινε πέψη με τα ίδια ένζυμα περιορισμού ώστε να έχουν συμβατά άκρα και λιγοποίηση των τμημάτων αυτών. Το τελικό πλασμίδιο φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 2.7.



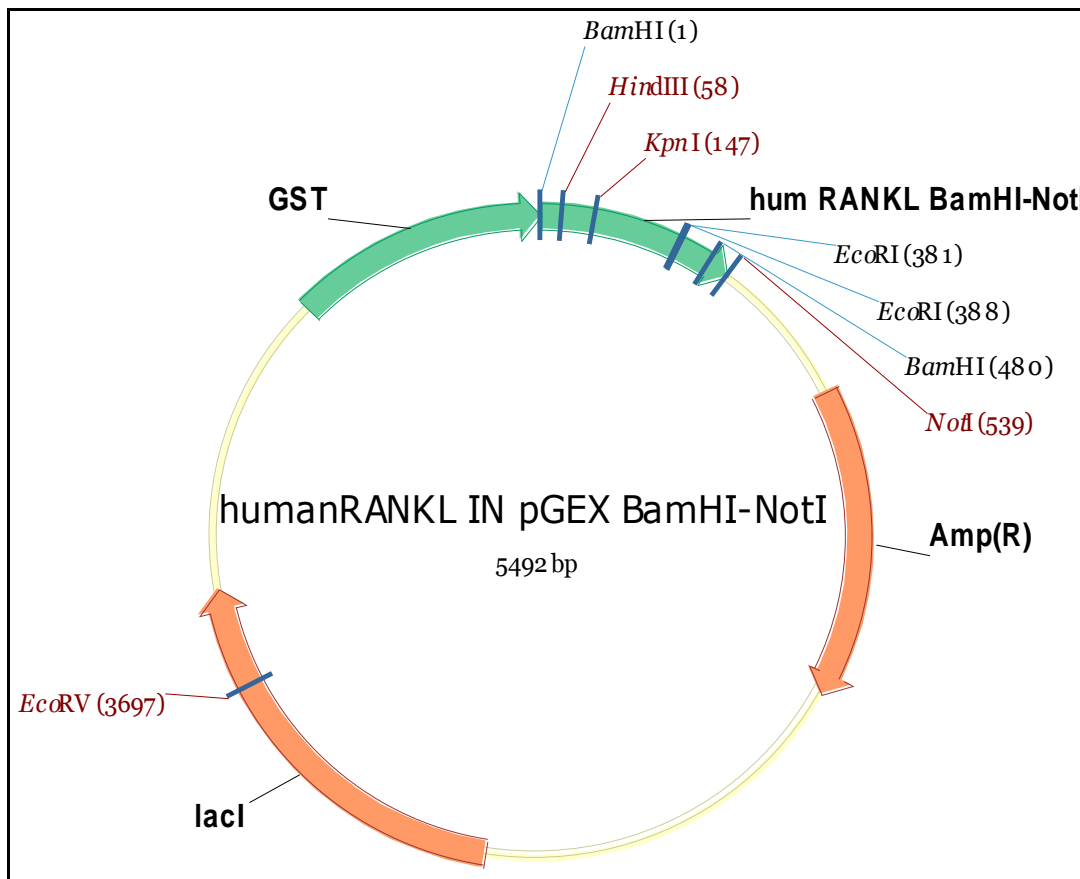
Εικόνα 2.7. Σχηματική απεικόνιση της ενδιάμεσης πλασμιδιακής κατασκευής που φέρει τμήμα του εκκριτικού RANKL του ανθρώπου στο πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1.

Στην συνέχεια έγινε πέψη του ενδιάμεσου πλασμιδιακού φορέα (Δέκτης) με τα ένζυμα περιορισμού HindIII και NotI απομακρύνοντας μία ενδιάμεση περιοχή του humRANKL και αντίστοιχα πέψη με τα ίδια ένζυμα ενός άλλου πλασμιδιακού φορέα που φέρει το humRANKL με θέσης ένθεσης στα άκρα SalI-NotI (Εικ. 2.8)



Εικόνα 2.8 Σχηματική απεικόνιση του εκκριτικού RANKL του ανθρώπου στο πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1 με θέσης αναγνώρισης-ένθεσης SalI-NotI.

Στην συνέχεια έγινε λιγοποίηση του πλασμιδιακού ενδιάμεσου φορέα με το τμήμα που προήλθε από την πλασμιδιακή κατασκευή (Εικ.2.8). Το τελικό πλασμίδιο φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 2.9.



Εικόνα 2.9 Σχηματική απεικόνιση του εκκριτικού RANKL του ανθρώπου στο πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1 με θέσης αναγνώρισης-ένθεσης BamHI-NotI.

2.3 Σχεδιασμός γονιδιακών κατασκευών του human TNF

2.3.1 Σχεδιασμός TNF γονιδιακής κατασκευής στο pGEX-6P1

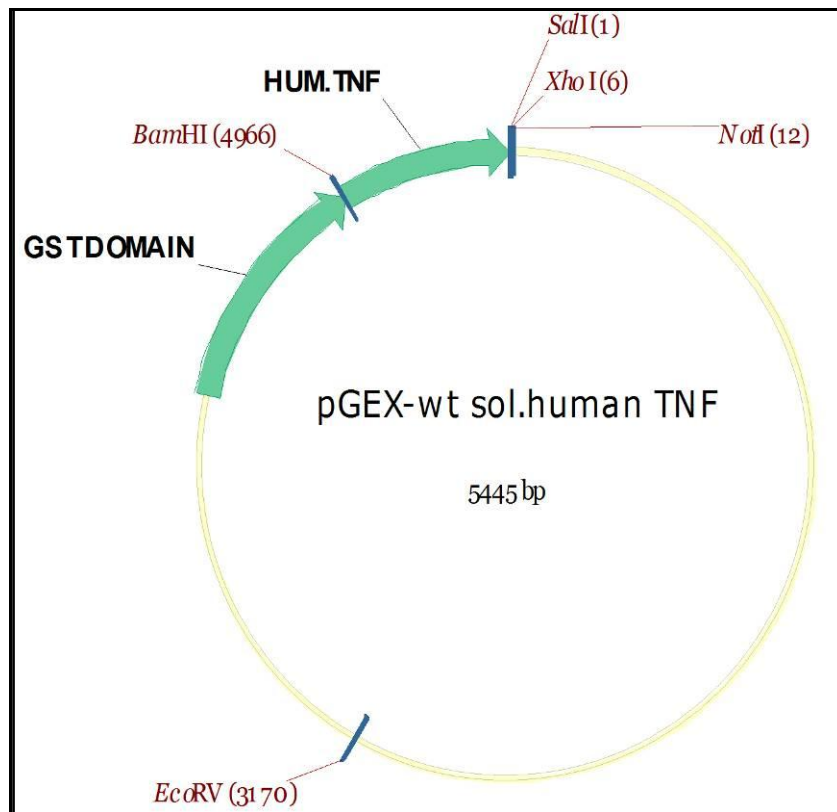
Το γονίδιο TNF του ανθρώπου κωδικοποιεί μια εκκριτική μορφή της πρωτεΐνης 233 αμινοξέων (Εικ.2.10). Με PCR και ως μήτρα cDNA από ανθρώπινο δείγμα άγριου τύπου έγινε υποκλωνοποίηση της εκκριτικής μορφής του TNF του ανθρώπου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φέρουν θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων BamHI και SalI αντίστοιχα.

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIAD
KHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKYLN GDHVTHPDF
MLYDALDVLVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLFGQP
LGSVRSRSTPSDKPVAHVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQGPS
THVLLTHTISRIA VSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEP IYLGGVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESG
Q VYFGIIAL

Εικόνα 2.10 Σχηματική απεικόνιση της αμινοξικής ακολουθίας του GST hum TNF (388aa-44kDa). Με Πράσινο επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία του εκκριτικού humTNF (157aa). Με Γκρι επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία τμήματος του πλασμιδίου μετά την αποκοπή με την πρωτεάση Pre-scission μήκους 5aa→ οπότε συνολικά **162aa** (17,7kDa).

Εκκινητής	Ακολουθία
HumanTNF-F	5'-CTGGGATCCGTCAGATCATCTTCTCG-3'
HumanTNF-R	5'-GGATCATTGCCCTGTGAGTCGACCTG-3'

Ακολούθως στο PCR προϊόν έγινε καθαρισμός από το πήκτωμα και στην συνέχεια πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και SalI. Ομοίως το πλασμίδιο pGEX-6P1 κόπηκε με τα ένζυμα BamHI και SalI. Μετά την λιγοποίηση το τελικό πλασμίδιο που προκύπτει φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 2.11.



Εικόνα 2.11. Σχηματική απεικόνιση του εκκριτικού TNF του ανθρώπου στο πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1.

2.3.2 Σχεδιασμός TNF^{G249R} γονιδιακής κατασκευής στο pGEX-6P1

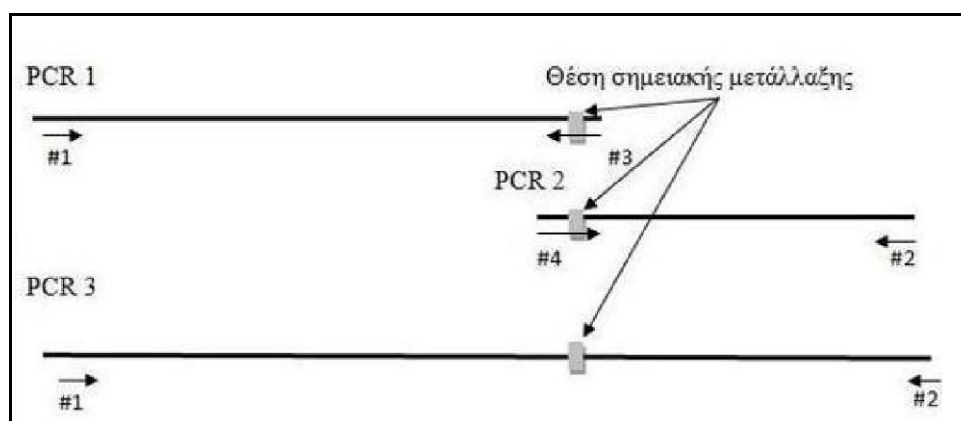
Για την υποκλωνοποίηση της μεταλλαγμένης εκκριτικής πρωτεΐνης TNF^{G122R} του ανθρώπου (Εικ.2.12) στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1 πραγματοποιήθηκε σε πρώτη φάση η μέθοδος εισαγωγής μεταλλάξεων μέσω PCR.

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIAD
 KHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKYLNGDHVTHPDF
 MLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLEVLFGQP
 LGSVRSSSRTPSDKPVAVHVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPS
 THVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLG^RVFQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESG
 QVYFGIIAL

Εικόνα 2.12 Σχηματική απεικόνιση της αμινοξικής ακολουθίας του GST hum TNF (388aa-44kDa). Με Πράσινο επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία του εκκριτικού humTNF (157aa). Με Γκρι επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία τμήματος του πλασμιδίου μετά την αποκοπή με την πρωτεάση Pre-scission μήκους 5aa→ οπότε συνολικά 162aa (17,7kDa). Με κόκκινο η θέση υποκατάστασης στην θέση 122 G122R.

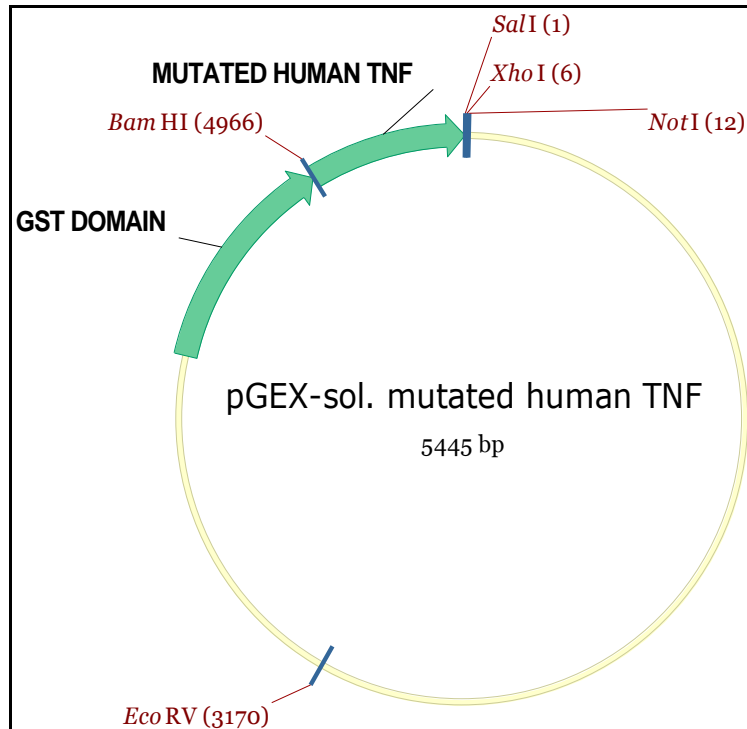
Εκκινητής	Ακολουθία
HumanTNF-F	5'-CTGGGATCCGTCAGATCATCTTCTCG-3'
HumanTNF-R	5'-GGATCATTGCCCTGTGAGTCGACCTG-3'
HuTNFargF	5'-CTA TCT GGG AAG GGT CTT CC-3'
HuTNFargR	5'-GGA AGA CCC TTC CCA GAT AG-3'

Η χρήση "εσωτερικών μεταλλαξιογόνων εκκινητών" που εισάγουν την σημειακή μετάλλαξη (G->A) συνδυάζονται ανάλογα με τους εξωτερικούς εκκινητές παράγοντας δύο τμήματα DNA. (Εικ.2.13).



Εικόνα 2.13. Σχηματική απεικόνιση των τριών αντιδράσεων PCR που απαιτούνται για την υποκλωνοποίηση του TNF^{G249R}

Τέλος σε μια αντίδραση PCR όπου σαν μήτρα χρησιμοποιούμε τα 2 τμήματα DNA όπου αλληλοεπικαλύπτονται-υβριδίζουν και με τους εξωτερικούς εκκινητές ενισχύουμε τελικώς την πλήρη ακολουθία που κωδικοποιεί την εκκριτική TNF^{G249R} πρωτεΐνη. Έπειτα το προϊόν της PCR καθαρίζεται από το πήκτωμα αγαρόζης και γίνεται πέψη με τα ένζυμα BamHI και SalI (που φέρουν οι εξωτερικοί εκκινητές) καθώς και ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P1 ώστε να είναι δυνατόν η εισαγωγή του τμήματος της TNF^{G249R}. Το τελικό πλασμίδιο που φέρει το TNF^{G249R} φαίνεται στην εικόνα 2.14



Εικόνα 2.14. Σχηματική απεικόνιση του εκκριτικού TNF^{G122R} του ανθρώπου στο πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1.

2.4 Σχεδιασμός γονιδιακών κατασκευών του human BAFF

2.4.1 Σχεδιασμός BAFF γονιδιακής κατασκευής στο pGEX-6P1

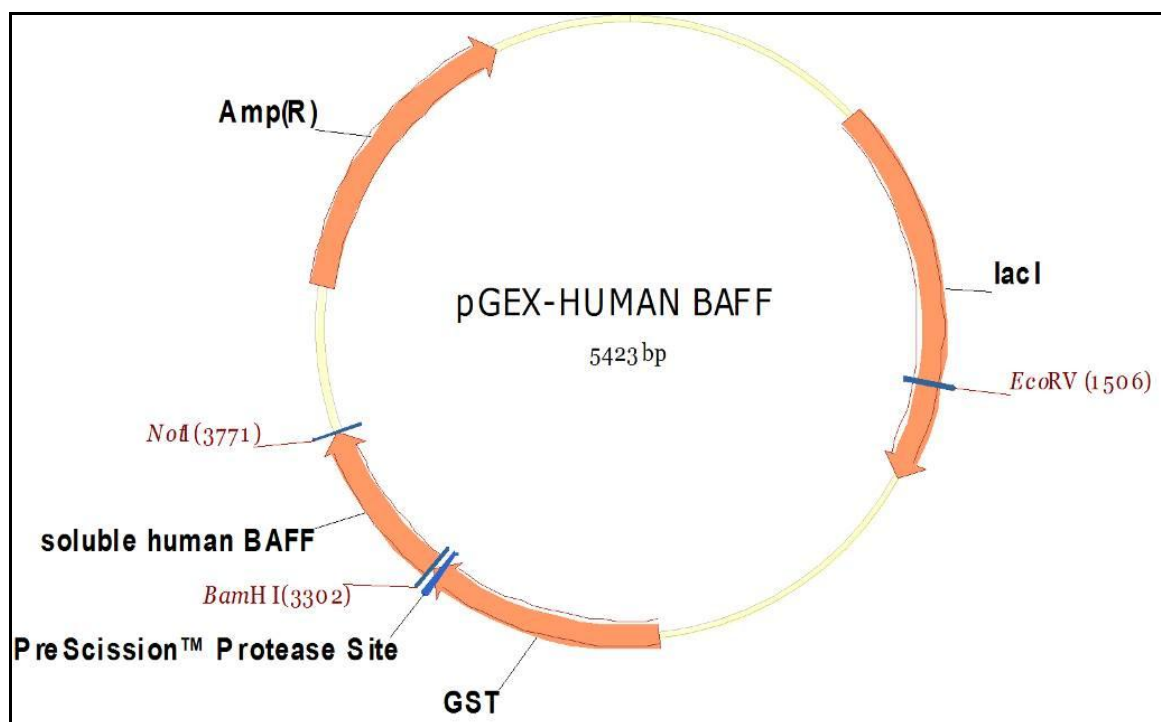
Το γονίδιο BAFF του ανθρώπου κωδικοποιεί μια εκκριτική μορφή της πρωτεΐνης 152 αμινοξέων (Εικ.2.15).

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIRYIAD
 KHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDF
 MLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLFGP
 LGSM AVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL EEEKENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTY
 AMGHLIQRKKVHVFGDEL SLVTLFR CIQNMPETLPNNSCYSAGIAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALK
 LL

Εικόνα 2.15. Σχηματική απεικόνιση της αμινοξικής ακολουθίας του GST hum BAFF (384aa). Με Πράσινο επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία της εκκριτικής humBAFF (153aa). Με Γκρι επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία τμήματος του πλασμιδίου μετά την αποκοπή με την πρωτεάση Presscission μήκους 5aa → οπότε συνολικά 158aa (17.5kDa).

Εκκινητής	Ακολουθία
HumanBAFF-F	5'-CAGGGATCCATGGCCGTTTCAGGGTCCAGAAG-3'
HumanBAFF-R	5'-CAGGCGGCCGCTCACAGCAGTTTCAATGCA-3'

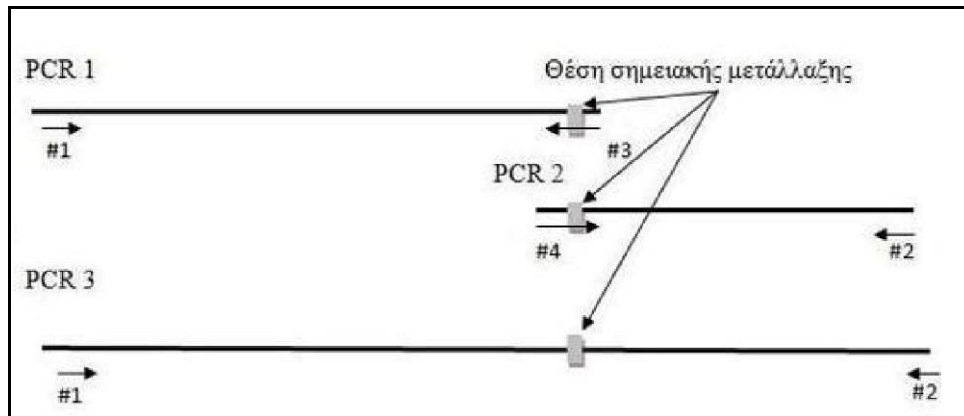
Για την υποκλωνοποίηση του ανθρώπινου BAFF χρησιμοποιήθηκε η πλήρης κωδική αλληλουχία (CDS) του cDNA (συλλογή I.M.A.G.E. , κλώνος IRAUp969H0387D) που παραλήφθηκε κλωνοποιημένη σε μορφή βακτηριακών stabs από την εταιρεία SourceBioscience. Η υποκλωνοποίηση του τμήματος που κωδικοποιεί την εκκριτική περιοχή της BAFF πρωτεΐνης έγινε χρησιμοποιώντας εκκινητές όπου εισάγαμε θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων BamHI και NotI αντίστοιχα. Ακολούθως στο PCR προϊόν έγινε καθαρισμός από πήκτωμα αгарόζης και στην συνέχεια πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI και NotI. Ομοίως και στο πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1 έγινε πέψη με τα ίδια ένζυμα περιορισμού ώστε να έχουν συμβατά άκρα και λιγοποίηση των τμημάτων αυτών. Το τελικό πλασμίδιο φαίνεται στην εικόνα 2.16.



Εικόνα 2.16. Σχηματική απεικόνιση του εκκριτικού BAFF του ανθρώπου στο πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1.

2.4.2 Σχεδιασμός BAFF^{G249R} γονιδιακής κατασκευής στο pGEX-6P1

Για την υποκλωνοποίηση της μεταλλαγμένης εκκριτικής πρωτεΐνης BAFF^{G249R} του ανθρώπου στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1 πραγματοποιήθηκε με κατευθυνόμενη PCR μεταλλαξογένεση. Η χρήση "εσωτερικών μεταλλαξιογόνων εκκινητών" που εισάγουν την σημειακή μετάλλαξη (G->C) συνδυάζονται ανάλογα με τους εξωτερικούς εκκινητές παράγοντας δύο τμήματα DNA (Εικ. 2.17).



Εικόνα 2.17. Σχηματική απεικόνιση των τριών αντιδράσεων PCR που απαιτούνται για την υποκλωνοποίηση του BAFF^{G249R}.

Τέλος σε μια αντίδραση PCR όπου σαν μήτρα χρησιμοποιούμε τα 2 τμήματα DNA όπου αλληλοεπικαλύπτονται-υβριδίζουν και με τους εξωτερικούς εκκινητές ενισχύουμε τελικώς την πλήρη ακολουθία που κωδικοποιεί την εκκριτική BAFF^{G249R} πρωτεΐνη (Εικ. 2.18).

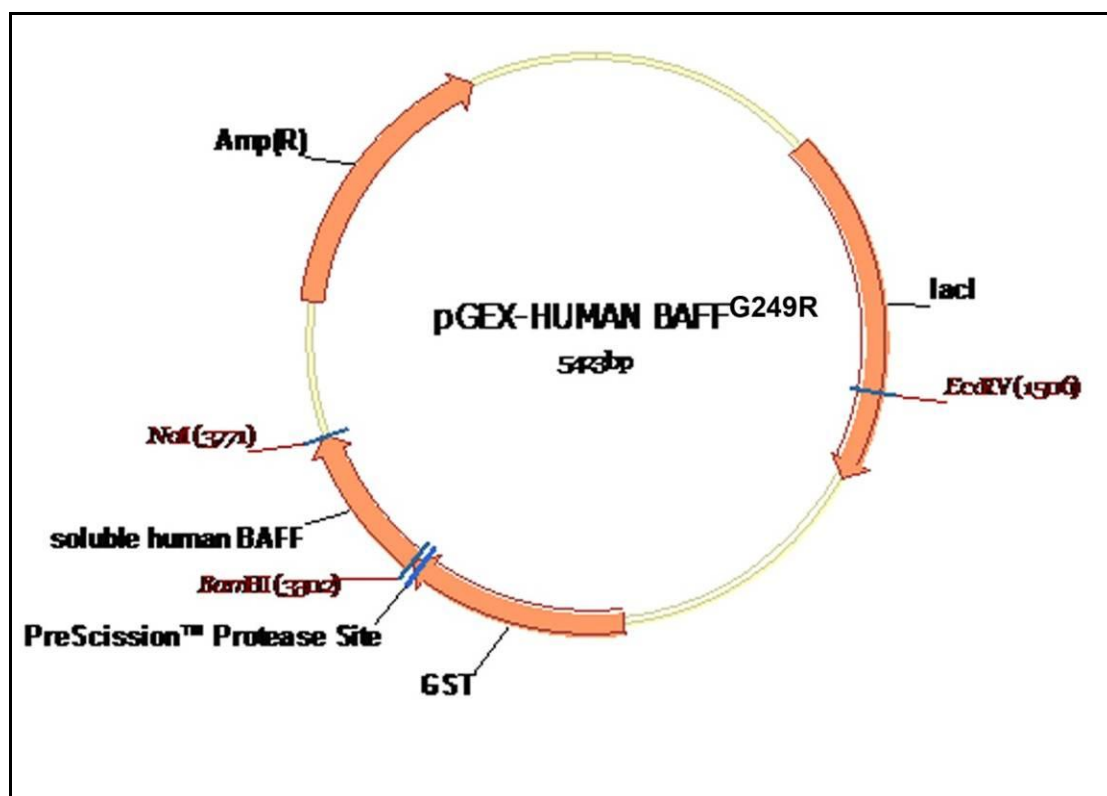
```
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIAD  
KHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDF  
MLYDALDVLVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLEVLFGQP  
LGSM AVQGPEETVTQDCLQLIADSETPTIQKGSYTFVPWLLSFKRGSAL EKENKILVKETGYFFIYGQVLYTDKTY  
AMGHLIQRKKNVHVGDEL SLVTLFRCIQNMPETLPNNSCYSAR IAKLEEGDELQLAIPRENAQISLDGDVTFFGALK  
LI
```

Εικόνα 2.18 Σχηματική απεικόνιση της αμινοξικής ακολουθίας του GST hum BAFF^{G249R} (384aa). Με Πράσινο επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία της εκκριτικής humBAFF (153aa). Με Γκρι επισημαίνεται η αμινοξική ακολουθία τμήματος του πλασμιδίου μετά την αποκοπή με την πρωτεάση Presscission μήκους 5aa → οπότε συνολικά 158aa (17.5kDa). Με κόκκινο η θέση υποκατάστασης στην θέση 249 G249R.

Έπειτα το προϊόν της PCR απομονώνεται από πήκτωμα αγαρόζης και γίνεται πέψη με τα ένζυμα BamHI και NotI (που φέρουν οι εξωτερικοί εκκινητές) καθώς και ο πλασμιδιακός

φορέας pGEX-6P1 ώστε να είναι δυνατόν η εισαγωγή του τμήματος της BAFF^{G249R}. Το τελικό πλασμίδιο που φέρει το BAFF^{G249R} φαίνεται στην εικόνα 2.19.

Εκκινητής	Ακολουθία
HumanBAFF-F	5'CAGGGATCCATGGCCGTTTCAGGGTCCAGAAG-3'
HumanBAFF-R	5'-CAGGCGGCCGCTCACAGCAGTTTCAATGCA-3'
Internal-HumanBAFF-F	5'-CCTGCTATTCAGCTCGCAT-3'
Internal-HumanBAFF-R	5'-ATGCGAGCTGAATAGCAGG-3'



Εικόνα 2.19. Σχηματική απεικόνιση του εκκριτικού BAFF^{G249R} του ανθρώπου στο πλασμιακό φορέα pGEX-6P1.

2.5 Προετοιμασία δεκτικών XL-1 blue βακτηριακών στελεχών για μετασχηματισμό με την μέθοδο ηλεκτροπόρωσης

Η προετοιμασία δεκτικών XL-1 blue κυττάρων για μετασχηματισμό με την μέθοδο ηλεκτροπόρωσης αποτελεί μια τεχνική με την οποία δημιουργούνται βακτηριακά στελέχη που χαρακτηρίζονται από μεγάλη απόδοση μετασχηματισμού με την πρόσληψη πλασμιδιακού DNA και περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Στρώσιμο κυττάρων XL-1 blue σε τρυβλίο petri (χρήση glycerol stock από τους -80°C) με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό τετρακυκλίνης ($25\mu\text{g/ml}$) και επώαση στους 37°C .
2. Την επόμενη μέρα επιλογή μονής αποικίας από το τρυβλίο και εμβάπτισμα σε 50ml LB άγαρ (προκαλλιέργεια) και επώαση στους 37°C O/N.
3. Την επόμενη ημέρα μεταφέρουμε 5ml από την προ-καλλιέργεια σε 500ml LB άγαρ.
4. Ανάπτυξη της καλλιέργειας με επώαση στους 37°C και ανάδευση 230rpm, ενώ ελέγχουμε την κυτταρική πυκνότητα μετρώντας την οπτική πυκνότητα OD στα 600nm η οποία πρέπει να φτάσει μία τιμή μεταξύ 0.5 και 0.7(εκθετική φάση ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των βακτηριακών κυττάρων).
5. Στην εκθετική φάση ανάπτυξης μεταφέρουμε τα κύτταρα στον πάγο για 30min.
6. Φυγοκέντριση των κυττάρων στις 3.500rpm στους 4°C για 15min.
7. Πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 800ml κρύο ddH₂O.
8. Φυγοκέντριση των κυττάρων στις 3.500rpm στους 4°C για 15min.
9. Απομακρύνουμε προσεκτικά το H₂O και επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 400ml κρύο ddH₂O.
10. Φυγοκέντριση των κυττάρων στις 3.500rpm στους 4°C για 15min.
11. Απομακρύνουμε προσεκτικά το H₂O και αφήνουμε πίσω περίπου 10-15ml H₂O και όπου γίνεται η επαναδιάλυση των κυττάρων.
12. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε ένα 50ml falcon
13. Φυγοκέντριση των κυττάρων στις 3.500rpm στους 4°C για 15min.
14. Πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 20ml 10% γλυκερόλη.
15. Φυγοκέντριση των κυττάρων στις 3.500rpm στους 4°C για 15min.
16. Πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 1-2ml 10% γλυκερόλη.
17. Μοιράζουμε σε aliquots των 120μl και αμέσως τα παγώνουμε σε υγρό άζωτο με ξηρό πάγο και αποθήκευση στους -80°C .

2.6 Απομόνωση προϊόντων PCR ή πλασμιδιακού DNA από πήκτωμα αγαρόζης με τη μέθοδο του ιωδιούχου νατρίου (NaI)

Η απομόνωση προϊόντων PCR ή πλασμιδιακού DNA από πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί αναγκαία συνθήκη ώστε να προχωρήσουμε στα επόμενα στάδια υποκλωνοποίησης και λιγοποίησης των τμημάτων. Η μέθοδος περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα:

1. Πραγματοποίηση έξι αντιδράσεων PCR για το κάθε τμήμα DNA ή 3-5μg πλασμιδιακού DNA που πρόκειται να υποκλωνοποιηθεί.
2. Ανάμιξη των έξι αντιδράσεων ή του πλασμιδιακού DNA, προσθήκη διαλύματος καταβύθισης και ανάλυση του προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με ειδικά διαμορφωμένα πηγάδια μεγάλου μεγέθους.
3. Απομόνωση του κομματιού του πηκτώματος που περιέχει το επιθυμητό προϊόν χρησιμοποιώντας νυστέρι.
4. Διαλυτοποίηση του πηκτώματος σε 2.5 όγκους 6M NaI στους 55°C, ~10 min.
5. Προσθήκη 20 μl Glass Milk (vortex πριν την χρήση).
6. Στον πάγο για 7min και ανάδευση το tube κάθε 2min για πρόσδεση του DNA στα μικροσφαιρίδια.
7. Φυγοκέντρηση 13000 rpm, 10 min, θερμοκρασία δωματίου.
8. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του pellet σε 1ml New Wash.
9. Φυγοκέντρηση 13000 rpm, 10sec, θερμοκρασία δωματίου.
10. Επανάληψη του βήματος 8 άλλες 2 φορές.
11. Απελευθέρωση του DNA από τα μικροσφαιρίδια σε μικρό όγκο ddH₂O στους 55°C, 5 min.
12. Φυγοκέντρηση 13000 rpm, 1min, θερμοκρασία δωματίου.
13. Μεταφορά του υπερκείμενου που περιέχει το DNA.
14. Ανάλυση 1 μl με ηλεκτροφόρηση για επιβεβαίωση επιτυχούς καθαρισμού.

Διαλύματα

Glass Milk: Για Παρασκευή 10 ml προσθέτουμε 1g silica (Sigma, #5631) σε 10ml PBS, ανακατεύουμε και αφήνουμε 2h, θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε. Στη συνέχεια πραγματοποιούμε φυγοκέντρηση 1000 rpm, 2 min και τέλος επαναϊωρούμε σε 6 M NaI (Fisher Scientific).

New Wash: 0.1 M NaCl, 0.01 M Tris pH 7.5, 0.0025 M EDTA σε διάλυμα 47.5 % EtOH.

2.7 Σύνδεση τμημάτων DNA με λιγάση

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με το ένζυμο Pfu πολυμεράση (Thermo Scientific, #EP0501) και μετά από κάθε κλωνοποίηση τα πλασμίδια αναλύονταν με αλληλούχηση για επιβεβαίωση της επαγωγής των εκάστοτε μεταλλάξεων και της έλλειψης άλλων μεταλλάξεων. Οι αντιδράσεις λιγοποίησης PCR προϊόντων με πλασμιδιακούς φορείς (ligations) πραγματοποιήθηκαν ως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα χρησιμοποιώντας το ένζυμο της λιγάσης (DL01a) από την εταιρία HT Biotechnology. Η αναλογία φορέα (vector) και ενθέματος (insert) πρέπει να είναι 1:3. Η χρήση 1 με 3 μl είναι ενδεικτική και διαφοροποιείται κάθε φορά ανάλογα με τη συγκέντρωση του κάθε αντιδρώντος που εκτιμάται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Vector	1λ
Insert	3λ
5x Ligation Buffer	2λ
Ligase (10units/λ) (HT Biotechnology)	1λ
H2O	3λ
Total	10λ
22 °C, 16 h	

2.8 Μετασχηματισμός XL-1 blue βακτηριακών στελεχών με ηλεκτροπόρωση

Ο μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροπόρωση αποτελεί μια αρκετά αποδοτική μέθοδο ενώ χρησιμοποιήθηκαν τα τελικά προϊόντα λιγοποίησης για τον μετασχηματισμό των XL1-Blue κυττάρων. Δεκτικά κύτταρα XL1-Blue ξεπαγώνουν από τους -80 oC στον πάγο. Στον πάγο μεταφέρονται και οι κυβέτες ηλεκτροπόρωσης. 40 μl κυττάρων μεταφέρονται σε 1.5 ml erppendorf και προστίθεται 2 μl αντίδρασης σύνδεσης (ligation), αναμιγνύονται καλά και επωάζονται στον πάγο, 5min. Η συσκευή ηλεκτροπόρωσης ρυθμίζεται στα 25 μF, 200 Ω, 1.8 V, τα 42 μl αντίδρασης μεταφέρονται στην κυβέτα και επάγεται παλμός. Μετά τον παλμό

προστίθεται 1 ml προθερμασμένο SOC Medium αναδεύουμε καλά και μεταφέρουμε σε νέο 1.5 ml erpendorf όπου και επωάζουμε 1h,37oC και τέλος στρώνουμε τα κύτταρα σε τρυβλία με LB άγαρ και αντιβιοτικό κατάλληλης επιλογής.

Διαλύματα

SOC Medium: Για 200 ml αναμιγνύουμε: 4g Bacto-tryptone (Fluka), 1g Bacto-Yeast extract (Fluka), 2ml of 1M NaCl, 0,5ml of 1M KCl, 2ml of 1M MgCl₂, 2ml of 1M MgSO₄, αποστειρώνουμε στο αυτόκαυστο και προσθέτουμε 1ml 1M glycose (filtered). Αποθήκευση 4°C

LB άγαρ: Για 1 L αναμιγνύουμε: 10g NaCl, 10g Tryptone (Fluka), 5g Yeast Extract (Fluka), 15g agar (Fluka)

Συσκευές

Συσκευή ηλεκτροπόρωσης Bio-Rad MicroPulser™ και κυβέτες Bio-Rad.

2.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα σε μικρή κλίμακα (mini prep-boiling method)

Η μέθοδος αυτή πειλαμβάνει την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας και χρησιμοποιείται ευρέως όταν θέλουμε να ταυτοποιήσουμε τον σωστό βακτηριακό κλώνο που φέρει την πλασμιδιακή κατασκευή που μας ενδιαφέρει.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Επιλογή μονής βακτηριακής αποικίας και μεταφορά σε 5ml LB θρεπτικού μέσου που περιέχει αντιβιοτικό επιλογής. Επώαση με ανάδευση στους 37oC για 16 ώρες.
2. Μεταφορά 1.5ml καλλιέργειας σε erpendorf tube και φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 2min. Φυλάμε την εναπομείνασα καλλιέργεια στους 4oC για μελλοντική χρήση.
3. Πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το βακτηριακό pellet σε 350μl Boiling Prep Buffer, προσθέτουμε 25μl λυσοζύμης (10mg/ml) και αναδεύουμε με vortex.
4. Μεταφορά των δειγμάτων σε βραστό νερό για 1:30 min και μεταφέρουμε αμέσως στον πάγο.
5. Φυγοκέντρηση σε 13.000rpm για 30min στους 4oC.
6. Αφαίρεση λευκού pellet (κυτταρικά θραύσματα) με οδοντογλυφίδα.
7. Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούργιο tube.
8. Προσθήκη 160μl 5M NH₄OAc (Panreac).
9. Προσθήκη 300μl Phenol/CKCl₃. Vortex.

10. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούργιο tube.
12. Επανάληψη των βημάτων 12-14.
13. Προσθήκη 800μl κρύας 100% αιθανόλης και καλή ανάμιξη.
14. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 20-30min στους 4oC.
15. Πετάμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με 800μl 70% αιθανόλη το DNA pellet.
16. Φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
17. Πετάμε το υπερκείμενο και αφήνουμε να στεγνώσει το DNA pellet.
18. Επαναδιάλυση το DNA pellet σε 30μl ddH₂O.

Διαλύματα Boiling Prep Buffer: 8% Sucrose, 0.5% Triton X-100, 50mM EDTA (PH 8.0), 1mM Tris-Cl (PH 8.0)

2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα σε μεγάλη κλίμακα (midi prep)

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεγάλης κλίμακας (περίπου 1-2μg/λ DNA) και μεγαλύτερης καθαρότητας από καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων. Συνήθως πραγματοποιείται με σκοπό την αλληλούχιση του πλασμιδιακού DNA. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (#12145) από την εταιρεία QIAGEN και πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (βλέπε <http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/plasmid-dna/qiagen-plasmid-midi-kit#productdetails>).

2.11 Αλληλούχιση

Πλασμιδιακό DNA απομονωμένο από πύκτωμα αγαρόζης (βλέπε ενότητα 2.7) στάλθηκαν για αλληλούχιση στις εταιρείες Eurofins MWG, Ocumum Biosolutions και VBC Biotech. Για την αλληλούχιση του cDNA του mouse RANKL, human RANKL, human TNF και human BAFF χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι εκκινητές:

Όνομα Εκκινητή	Ακολουθία
Mu.RANKLSOL.158.Xho	5'-TCACTCGAGATGAAGCCTGAGGCCCCAGCC-3'
Mu.RANKL3XbaTGA	5'-TCCTCTAGATCAGTCTATGTCCTGAAC-3'
5solhuRANKL	5'-CAGGTCGACTCAAGCTTGAAGCTCAGCCTT-3'
3solhuRANKLnot	5'-CAGGCGGCCGCTCAATCTATATCTCGAACT-3'
huTNFbamF	5'-CTG GGA TCC GTC AGA TCA TCT TCT CG-3'
huTNFsalR	5'-CAG GTC GAC TCA CAG GGC AAT GAT CC-3'
humBAFFbamF	5'-CAG GGA TCC ATG GCC GTT CAG GGT CCA GAA G-3'
humBAFFSalR	5'-CAG GTC GAC CGC TTG AAG TCC TCT TTC AGG-3'

2.12 Προετοιμασία δεκτικών BL21 βακτηριακών στελεχών για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ

Η προετοιμασία δεκτικών BL21 κυττάρων για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ αποτελεί αναγκαία συνθήκη για την ετερόλογη έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στην παρούσα μελέτη καθώς τα BL21 κύτταρα αποτελούν κατάλληλους φορείς ετερόλογης έκφρασης ευκαρυωτικών πρωτεϊνών.

Η προετοιμασία δεκτικών BL21 βακτηριακών κυττάρων περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Στρώσιμο κυττάρων BL21 σε τρυβλίο petri (χρήση glycerol stock από τους -80°C) με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό χλωραμφενικόλης ($35\mu\text{g/ml}$) και επώαση στους 37°C .
2. Την επόμενη μέρα επιλογή μονής αποικίας από το τρυβλίο και εμβάπτισμα σε 5ml LB άγαρ (προκαλλιέργεια) και επώαση στους 37°C O/N.
3. Την επόμενη ημέρα μεταφέρουμε 200μl από την προ-καλλιέργεια σε 30ml LB άγαρ.
4. Ανάπτυξη της καλλιέργειας με επώαση στους 37°C υπό ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας; (OD) στα 550nm φτάσει την τιμή 0.4.
5. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε 50ml falcon και τα αφήνουμε στο πάγο για 10min.
6. Φυγοκέντρωση στις 3,500rpm στους 4°C για 15min.
7. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 10ml δ/τος RF1.
8. Επώαση στον πάγο για 45min.
9. Φυγοκέντρωση στις 3,500rpm στους 4°C για 15min.
10. Πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε τα κύτταρα προσεκτικά σε 2.4ml δ/τος RF2.
11. Επώαση στον πάγο για 15min.
12. Μοιράζουμε σε aliquote 200μl και πάγωμα σε υγρό άζωτο.
13. Αποθήκευση των aliquote στους 80°C .

Διαλύματα

RF1:

Για 100ml
RbCl 100mM
MnCl ₂ 50mM
CaCl ₂ 10mM
Glycerol 15%
CH ₃ COOK 30mM
Ρύθμιση του PH στο 5,8 με οξικό οξύ
Αποστείρωση

RF2:

Για 100ml
MOPS 100mM
RbCl 10mM
CaCl ₂ 75mM
Glycerol 15%
Ρύθμιση του PH στο 5,8 με οξικό οξύ
Αποστείρωση

Συσκευές:

Φυγόκεντρος Hettich μοντέλο Micro 120

2.13 Μετασχηματισμός BL21 βακτηριακών στελεχών με θερμικό σοκ

Ο μετασχηματισμός των BL21 βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται με θερμικό σοκ. Μία απότομη αύξηση της θερμοκρασίας επάγει τον σχηματισμό μικροπόρων στην βακτηριακή μεμβράνη των κυττάρων με αποτέλεσμα την αποδοτική πρόσληψη DNA.

Η διαδικασία μετασχηματισμού περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Μεταφέρουμε ένα aliquote των δεκτικών BL21 κυττάρων(stock -80°C) στο πάγο και τα αφήνουμε να ξεπαγώσουν.

2. Αναμιγνύουμε 100μl από τα βακτηριακά δεκτικά κύτταρα με 2μl από την αντίδραση λιγοποίησης (ligation) και αφήνουμε στον πάγο για 30 λεπτά.
3. Ακολούθως, μεταφέρουμε το μείγμα των κυττάρων με το DNA στους 42⁰C για 50sec.(θερμικό σοκ) και μετά στον πάγο για δύο λεπτά.
4. Προσθέτουμε 0,9ml SOC ή LB θρεπτικό μέσο στα κύτταρα και αφήνουμε για επώαση στους 37⁰C για μία ώρα.
5. Στρώσιμο των κυττάρων σε τρυβλία Petri με τα κατάλληλο αντιβιοτικό.

Διαλύματα

SOC Medium

Συσκευές

Υδατόλουτρο στους και 42⁰C

Τρυβλία Petri με αμικικιλίνη (100μg/λ) και χλωραμφαινικόλη (35μg/λ)

2.14 Απομόνωση ανασυνδυασμένης εκκριτικής πρωτεΐνης

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε απαιτεί τα εξής υλικά:

- Τρυβλία Petri που περιέχουν αμικικιλίνη και χλωραμφαινικόλη
- LB agar
- Αναδευτήρα στους 37⁰C
- 1L Erlenmeyer
- IPTG (100μM)
- Φυγόκεντρος Juan CR422
- 50ml falcon
- Πιπέτες και πουάρ
- PMSF(100mM)
- Protease inhibitor cocktail
- Bacteria Buffer (1xPBS, Tris-HCl 10mM PH7,2)
- 10% triton
- Υδατόλουτρο στους 37⁰C
- Sarcosyl 10%
- Sonicator
- Ψυχόμενη φυγόκεντρο Thermo Scientific μοντέλο Heraeus Fresco 21 Certifuge
- Φίλτρα (0.45μm)
- Falcon των 15ml

- Immobilized Glutathione- beads (Thermo Scientific)
- Ροζέτα
- Precision Buffer

Για 200ml Precision Buffer
10ml Tris PH 7.0
6ml 5M NaCl
400μl EDTA
200μl DTT 1M
20λ Triton

Για 200ml Lysis Buffer
0,284g Na ₂ HPO ₄
1,2ml 5M NaCl
4ml 0,5M EDTA
500λ Triton
Προσαρμογή του PH στο 7.0 με φωσφορικό οξύ

- Lysis Buffer
- SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing (Thermo Scientific)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

MEPA 1

Στρώσιμο των BL21 κυττάρων που περιέχουν το wild type h.BAFF σε ένα τρυβλίο petri και τα BL21 κύτταρα που περιέχουν το mutant h.BAFF σε ένα άλλο. Ανάπτυξη σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας στους 37°C για 16 ώρες.

MEPA 2

Επιλογή μονής αποικίας από κάθε τρυβλίο και επώαση σε 5ml LB θρεπτικού μέσου (αμπικιλίνη(100μg/ml) και χλωραμφενικόλη (35μg/ml)).

MEPA 3

1. 5ml της προ-καλλιέργειας μεταφέρονται σε 200ml LB υγρού θρεπτικού μέσου με προσθήκη αμπικιλίνης και χλωραμφαινικόλης. Επώαση της καλλιέργειας (με ανάδευση στους 37°C, στις 225 rpm για 2 ώρες.

2. Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου (~25°C) για μία ώρα. Η ανάδευση συνεχίζεται.
3. Προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 100μM. Συνεχίζεται η ανάδευση για 4-6 ώρες το μέγιστο σε θερμοκρασία δωματίου. Ανάπτυξη της καλλιέργειας με το IPTG για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μπορεί να οδηγήσει σε συσσωματώματα κ την αδυναμία απομόνωσης της πρωτεΐνης.
4. Φυγοκέντρηση των βακτηρίων στις 3.300 rpm στους 4°C σε 50άρια falcon για 20min.
5. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
6. Επαναδιάλυση του pellet σε τελικό όγκο 11,25ml Bacteria Buffer, το οποίο περιέχει 12μl protease inhibitor (1000x) και 120μl PMSF 100mM (τελικά 1mM).
7. Προσθήκη 1,25ml 10% triton (τελικά 1%).
8. Μεταφορά στους -80°C για 16 ώρες.

ΜΕΡΑ 4

1. Τα falcon μεταφέρονται από τους -80°C στο υδατόλουτρο στους 37°C.
2. Μόλις ξεπαγώσουν προστίθεται 1,25ml bacteria buffer + 10% Sarcosyl (τελικά 1%).
3. Μεταφορά και πάλι στους -80°C.
4. Αφού παγώσουν τα κύτταρα, στο υδατόλουτρο στους 37°C.
5. Επανάληψη των βημάτων 3 και 4.
6. Sonicate 4 φορές για 30sec (on the 6th floor, setting:5,). Τα falcon αφήνονται στον πάγο για 1min ύστερα από κάθε sonication.
7. Φυγοκέντρηση στις 11.200rpm στους 4°C για 15min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε universal και από κει με φίλτρο σε 15άρι falcon.
8. Σε 3 tubes προστίθενται 100λ glutathione-sepharose beads και 1ml 1xPBS+10% Triton.
9. Καλή ανάμειξη.
10. Φυγοκέντρηση στα 500g στους 4°C για 3-4min.
11. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
12. Επανάληψη 2 φορές τα βήματα 9-12.
13. Προσθήκη των beads στα falcon.
14. Μεταφορά των falcon στη ροζέτα στους 4°C για 2 ώρες.
15. Φυγοκέντρηση στα 500g στους 4°C για 4min.
16. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
17. Προσθήκη 10ml Lysis Buffer.

18. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
19. Επανάληψη των βημάτων 18 και 19 άλλες 3 φορές.
20. Προσθήκη 10ml Precision Buffer.
21. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
22. Επανάληψη των βημάτων 21 και 22 άλλες 3 φορές.
23. Τα beads μεταφέρονται σε tube.
24. Φυγοκέντρηση στα 500g στους 4°C για 10sec.
25. Προσθήκη 200λ Precision Buffer και 3λ Precision στα beads και μεταφορά τους στη ροζέτα στους 4°C για 16 ώρες.

ΜΕΡΑ 5

1. Φυγοκέντρηση στα 12.000rpm στους 4°C για 10min.
2. Απομάκρυνση του υπερκείμενου.
3. Προσθήκη 100λ Precision Buffer και ανάδυσή του για 20min.
4. Φυγοκέντρηση στα 12.000rpm στους 4°C για 10min.
5. Συλλογή του υπερκείμενου σε καινούργιο tube. Προσθήκη 50λ Precision Buffer και ανάδευση για 5min.
6. Φυγοκέντρηση στα 12.000rpm στους 4°C για 10min. Συλλογή του υπερκείμενου σε καινούργιο tube.
7. Τα δύο κλάσματα του elution μεταφέρονται σε dialysis bags και σε 1L Erlenmeyer που περιέχει 1L 1xPBS στους 4°C με ανάδευση.

ΜΕΡΑ 6

1. Το πρωί αλλάζεται το 1L 1xPBS.
2. Το απόγευμα συλλέγεται η πρωτεΐνη. Ύστερα από τη φωτομέτρηση της πρωτεΐνης, προστίθεται 80% glycerol σε τελικό όγκο 10%.
3. Αποθήκευση στους -80°C.

2.14.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μια χρωματομετρική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την γρήγορη ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών. Βασίζεται στην αλλαγή του χρώματος του αντιδραστηρίου, όταν δεσμεύεται με πρωτεΐνες. Όταν δεσμευτεί, υπάρχει μια άμεση αλλαγή της μέγιστης

απορρόφησης από 465 σε 595nm με μία ταυτόχρονη αλλαγή του χρώματος σε μπλε (Bradford 1976).

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 συνολικής πρωτεΐνης στα δείγματα.
6. Τέλος, υπολογίζεται το πηλίκο 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).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε απαιτεί τα εξής υλικά:

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

2.15 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE) και ανοσοστύπωμα Western (Western Immuno - Blot)

2.15.1 Ηλεκτροφόρηση με δωδέκυλοθειϊκό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate, SDS) σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)

Η SDS – PAGE (SDS – Polyacrylamide Gel Electrophoresis) είναι μια μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος. Υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου οι πρωτεΐνες κινούνται δια μέσου των πόρων ενός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με

διαφορετική ταχύτητα η κάθε μία, ανάλογα με την ηλεκτροφορητική της κινητικότητα. Η προσθήκη SDS και άλλων αποδιατακτικών παραγόντων όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη εξασφαλίζει ότι οι διαχωριζόμενες πρωτεΐνες κινούνται σε αποδιαταγμένη μορφή, δηλαδή ως μονήρη ευθύγραμμο πολυπεπίδια. Επιπλέον το SDS προσδίδει ένα σταθερό ανά μονάδα μάζας του πολυπεπτιδίου αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα τα πολυπεπίδια να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος και όχι και το φορτίο τους.

Μετά το διαχωρισμό τους, τα πολυπεπίδια μεταφέρονται από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blot) στην οποία στην συνέχεια εφαρμόζονται διαλύματα αντισωμάτων ειδικών για το κάθε πολυπεπίδιο προς ανίχνευση. Η θέση του κάθε πολυπεπτιδίου προς ανίχνευση οπτικοποιείται με τη χρήση αντισωμάτων συζευγμένων με κάποιο ένζυμο το οποίο καταλύει μια χημική αντίδραση που παράγει φως και το παραγόμενο σήμα ανιχνεύεται με την αλλοίωση φωτογραφικού φιλμ. Το μοριακό βάρος του κάθε ανιχνευόμενου πολυπεπτιδίου προσδιορίζεται με βάση την ανάλυση ενός δείγματος δείκτη (marker) με πολυπεπίδια γνωστού μοριακού βάρους (Fermentas).

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε ήταν εκείνη της κατακόρυφης ασυνεχούς SDS – PAGE δηλαδή το πήκτωμα αποτελείται από δυο μέρη: το πάνω μέρος, δηλαδή το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) το οποίο είναι χαμηλής συγκέντρωσης πολυακρυλαμιδίου και επιτυγχάνει τη συσσώρευση του δείγματος για την ομοιόμορφη ανάλυσή του καθώς περνάει στο κάτω μέρος, δηλαδή στο πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel).

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Συναρμολόγηση της συσκευής
2. Προετοιμασία του διαλύματος πηκτώματος διαχωρισμού και προσθήκη του στο καλούπι μεταξύ των γυάλινων τζαμιών. Ευθυγράμμιση της επιφάνειας με προσθήκη μικρή ποσότητας ισοπροπανόλης. Επώαση 30 min, στον πάγο για πολυμερισμό.
3. Απομάκρυνση ισοπροπανόλης και ξέπλυμα με dH₂O.
4. Προσθήκη διαλύματος συσσώρευσης και ειδικής χτένας για το σχηματισμό πηγαδιών. Επώαση 30 min, στον πάγο για πολυμερισμό.
5. Τοποθέτηση πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και γέμισμα του δοχείου με διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού γίνεται η προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων ως εξής: 100-200 ng πρωτεΐνης αραιώνονται σε 5 x loading buffer και dH₂O μέχρι τελικού όγκου 20 μl. Τα δείγματα θερμαίνονται σε πλάκα θέρμανσης 100°C, 3 min, και μεταφέρονται αμέσως στον πάγο. Στη συνέχεια φορτώνονται στο πήκτωμα και αναλύονται με εφαρμογή τάσης 90 V.

Resolving Gel (12 %)	
30% Acrylamide (Applichem, #A0951)	4ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5ml
10% SDS	0.1ml
dH2O	3.3ml
10% APS	100μl
TEMED	5μl
Σύνολο	10ml

Stacking Gel (4%)	
dH2O	30.25ml
0.5M Tris pH 6.8	12.5ml
10% SDS	0.5ml
30% Acrylamide	6.7ml
Σύνολο	50 ml
Για κάθε gel προσθέτουμε σε 2 ml διαλύματος 20 μl 10 % APS και 2 μl TEMED	

2.15.2 Ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Native Gel Electrophoresis, Native-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου εξαρτάται από την φυσική διαμόρφωση και το μέγεθος της πρωτεΐνης και χρησιμοποιείται στην ειδικότερα στην μελέτη

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Συναρμολόγηση της συσκευής
2. Προετοιμασία του διαλύματος πηκτώματος διαχωρισμού και προσθήκη του στο καλούπι μεταξύ των γυάλινων τζαμιών. Ευθυγράμμιση της επιφάνειας με προσθήκη μικρή ποσότητας ισοπροπανόλης. Επώαση 30 min, στον πάγκο για πολυμερισμό.
3. Απομάκρυνση ισοπροπανόλης και ξέπλυμα με dH2O.
4. Προσθήκη διαλύματος συσσώρευσης και ειδικής χτένας για το σχηματισμό πηγαδιών. Επώαση 30 min, στον πάγκο για πολυμερισμό.

5. Τοποθέτηση πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και γέμισμα του δοχείου με διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού γίνεται η προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων ως εξής: 100-200 ng πρωτεΐνης αραιώνονται σε 5 x loading buffer χωρίς SDS και dH₂O μέχρι τελικού όγκου 20 μl. Στη συνέχεια φορτώνονται στο πήκτωμα και αναλύονται με εφαρμογή τάσης 80 V.

Resolving Gel (8 %)	
30% Acrylamide (Applichem, #A0951)	2.6ml
1.5M Tris pH 8.8	2.5ml
dH ₂ O	4.75ml
10% APS	100μl
TEMED	5μl
Σύνολο	10ml

Stacking Gel (4%)	
dH ₂ O	30.25ml
0.5M Tris pH 6.8	12.5ml
30% Acrylamide	6.7ml
Σύνολο	50 ml
Για κάθε gel προσθέτουμε σε 2 ml διαλύματος 20 μl 10 % APS και 2 μl TEMED	

2.15.3 Μεταφορά (transfer) και Ανοσο-στύπωμα Western

1. Το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετείται στη διάταξη μεταφοράς μεταξύ τεσσάρων διηθητικών χαρτιών Whatman και κατάλληλων σπόγγων. Από την πλευρά της καθόδου τοποθετείται φίλτρο νιτροκυτταρίνης πάνω στο πήκτωμα, στις διαστάσεις του πηκτώματος (5 x 8 cm).
2. Η διάταξη τοποθετείται στη συσκευή μεταφοράς εμβαπτιζόμενη σε διάλυμα μεταφοράς και όλη η συσκευή τοποθετείται στον πάγο.
3. Μεταφορά, 110 V, 1h.

4. Εμβάπτιση της μεμβράνης σε διάλυμα παρεμπόδισης (blocking) 1 x TBS (5% άπαχο γάλα) είτε σε 1 x PBS (5% BSA, 0.1 % Tween-20), 2 h, θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση.
5. Πρώτο αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα παρεμπόδισης, 4 οC, όλη τη νύχτα, υπό ανάδευση.
6. Ξέπλυμα μεμβράνης είτε 1 x 5 min σε TBS είτε 3 x 10min σε PBS (0.1 % Tween-20) ανάλογα με το διάλυμα παρεμπόδισης που χρησιμοποιήθηκε.
7. Δεύτερο αντίσωμα αραιωμένο σε διάλυμα παρεμπόδισης, 1 h, θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση.
8. Ξέπλυμα μεμβράνης είτε 5 x 5 min σε TBS είτε 3 x 10min σε PBS (0.1 % Tween-20).
9. Εμφάνιση: Η κάθε μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα εμφάνισης και επωάζεται ~1 min προστατευόμενη από το φως. Στη συνέχεια καλύπτεται με μεμβράνη σελοφάν και εκτίθεται σε φιλμ (Fujifilm Super RX, #47410 19236). Στη συνέχεια το φιλμ εμβαπτίζεται διαδοχικά σε διάλυμα εμφάνισης (developer) (Sigma, #P7042) και σε διάλυμα μονιμοποίησης (fixer) (Sigma, #P7167), ξεπλένεται σε dH₂O και στεγνώνεται στον αέρα.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν και οι αντίστοιχες αραιώσεις τους φαίνονται στον πίνακα.

Αντίσωμα (anti-)	Κλωνικότητα	Προμηθευτής	Αραίωση	Διαλύτης	Δεύτερο αντίσωμα (anti-)
anti-GST	Πολυκλωνικό		1:1000	1 x PBS	rabbit
Biotin mu. RANKL	Μονοκλωνικό	eBioscience)	1:1000	1 x PBS	rabbit
mu. RANKL	Πολυκλωνικό	R&D Systems	1:1000	1 x PBS	rat
Hum,RANKL	Πολυκλωνικό	R&D Systems	1:1000	1 x PBS	goat
Hum,TNF	Πολυκλωνικό	Prof.Wim Buurman	1:1000	1 x PBS	rabbit
Hum,BAFF	Πολυκλωνικό	Peprotech	1:1000	1 x PBS	goat
Actin	Πολυκλωνικό	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	1 x PBS	goat
Rabbit IgG - HRP		Vector (U0215)	1:2000	1 x PBS	
Goat IgG - HRP		Vector (U0215)	1:2000	1 x PBS	
Rat IgG - HRP		Southern Biotech (1030- 05)	1:2000	1 x PBS	

Διαλύματα

Οι διαλύτες ήταν 1 x PBS (5% BSA, 0.1 % Tween-20)

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Tris-glycine electrophoresis buffer)

25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1% SDS .

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης για Native-gel (Tris-glycine electrophoresis buffer)

25mM Tris, 192mM Glycine,

Διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer)

25mM Tris, 192mM Glycine σε 1 L 20% μεθανόλη σε dH₂O.

Διάλυμα φόρτωσης 5 x (loading buffer)

Για παρασκευή 15 ml stock αναμιγνύονται: SDS 1.5 g, 1 M Tris pH 6.8 3.75 ml, μπλε της βρωμοφαινόλης (Sigma, #114391) 0.015 g, Glyrecol 7.5 ml, ddH₂O μέχρι τα 15 ml. Πριν τη χρήση προστίθεται 50 μl β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma, #M7522) / ml buffer

Διάλυμα φόρτωσης 5 x (loading buffer)-Native gel

Για παρασκευή 15 ml stock αναμιγνύονται: 1M Tris pH 6.8 3.75 ml, μπλε της βρωμοφαινόλης (Sigma, #114391) 0.015 g, Glyrecol 7.5 ml, ddH₂O μέχρι τα 15 ml. Πριν τη χρήση προστίθεται 50 μl β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma, #M7522) / ml buffer

Διάλυμα εμφάνισης (ECL solution)

Stock solutions:

Luminol (Sigma, #A8511) 250mM σε DMSO (Sigma, #472301)

Coumaric acid (Sigma, #C9008) 90mM σε 100 % EtOH

Hydrogen peroxide, 30%

Tris – HCl, 2 M, pH 8.5

Για κάθε εμφάνιση παρασκευάζονται φρέσκα τα κάτωθι διαλύματα 1 και 2, αναμιγνύονται και στο μίγμα εμβαπτίζεται η μεμβράνη.

Διάλυμα Α		Διάλυμα Β	
Διάλυμα	Όγκος	Διάλυμα	Όγκος
ddH ₂ O	2.33 ml	ddH ₂ O	2.375 ml
2M Tris-HCl pH:8.5	125 ml	2M Tris-HCl pH:8.5	125 ml
Coumaric	11 μL	Hydrogen Peroxide,30%	1.5 μL
Luminol	25 μL	Σύνολο	2.5 ml
Σύνολο	2.5 ml		

10 % APS: (Ammonium persulfate) (Applichem, #A2941, 0100) σε ddH₂O

TEMED : N, N, N', N' tetramethylethylenediamine (Fluka, #87689)

Συσκευές Western blot equipment

Τροφοδοτικό συσκευής ηλεκτροφόρησης και μεταφοράς (Biorad, PowerPac Basic)

Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad, Mini-Protean Tetra cell)

Γυάλινα τζάμια-καλούπια (Biorad, #1653308)

2.15.4 Χρώση πηκτώματος (Coomassie staining)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω υλικά:

- Coomassie R-250 (SIGMA)
- Destaining Solution

	Για 1000ml
Acetic acid	50ml
Methanol	100ml
dH ₂ O	850ml

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Τα τζάμια που περιέχουν το πήκτωμα μεταφέρονται σε δοχείο που περιέχει electrophoresis buffer και με προσεκτικό τράβηγμα ξεκολλάνε.
2. Από το πήκτωμα αφαιρείται το stacking gel,

3. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε δοχείο που περιέχει την χρωστική Coomassie και επωάζουμε για 15min υπό ανάδευση.
4. Απομακρύνεται η χρωστική Coomassie και προστίθεται η αναγκαία ποσότητα Destaining Buffer ώστε να καλύπτει το πήκτωμα κατά την ανάδευσή του.
5. Όταν το πήκτωμα έχει τον επιθυμητό αποχρωματισμό τοποθετείται πάνω σε 3 χαρτιά Whatman, καλύπτεται με μεμβράνη και στεγνώνεται στη συσκευή Thermo Savant Speed Gel μοντέλο SG210D.

2.16 CROSS-LINKING

2.16.1 Cross linking - Ηλεκτροφόρηση

Το DSS, (disuccinimidyl suberate), είναι ένας μη βιοδιασπώμενος και διαπερατός στην κυτταρική μεμβράνη παράγοντας που σχηματίζει αμιδικούς δεσμούς χάρη σε μία ενεργή ομάδα αμίνης- N-υδροξυηλεκτριμίδιο (NHS) εστέρα που περιέχει σε κάθε άκρο ενός βραχίονα διαχωριστή με 8 άτομα άνθρακα. Οι NHS εστέρες αντιδρούν με πρωτοταγείς αμίνες σε pH 7-9 σχηματίζοντας σταθερούς δεσμούς αμιδίου, με ταυτόχρονη αποδέσμευση μίας ομάδας N-υδροξυηλεκτριμιδίου. Οι πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των αντισωμάτων, έχουν γενικά αρκετές πρωτοταγείς αμίνες όπως στην πλευρική αλυσίδα της λυσίνης και το N- τελικό άκρο σε κάθε πολυπεπτιδίο που είναι διαθέσιμοι ως στόχοι για διασταυρούμενη αντίδραση σύνδεσης (cross-linking). Το DSS διαλύεται σε οργανικό διαλύτη όπως DMF ή DMSO και προστίθεται σε αντίδραση διασταυρούμενης σύνδεσης (Partis et al. 1983).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω υλικά:

1. Πηκτή Πολυακρυλαμίδης (resolving gel 12% - stacking gel 4%)
2. Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης
3. Tris-glycine electrophoresis buffer
4. DSS (50mM)
5. DMSO
6. Tris 500mM PH 7,5 (loading buffer)
7. Heat block
8. 1XPBS

Για 1L 10x PBS
80g NaCl
2g KCl
11,5g Na ₂ HPO ₄
2g KH ₂ PO ₄
Ανάμειξη NaCl και KCl
Ανάμειξη Na ₂ HPO ₄ και KH ₂ PO ₄
Ανάμειξη όλων
Το PH πρέπει να είναι 6.8
Αποστείρωση
Αποθήκευση σε συνθήκες δωματίου

1. Οι αραιώσεις στα δείγματα των πρωτεϊνών γίνονται με διαλύτη 1xPBS.
2. Στα δείγματα προστίθεται DSS και στους μάρτυρες DMSO. Ύστερα από καλή ανάδευση αφήνονται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Παρασκευάζεται το tranfering buffer το οποίο αποθηκεύεται στους 4°C μέχρι την ώρα που θα χρησιμοποιηθεί.
4. Αφού περάσει η μία ώρα προστίθενται 2μl Tris-HCl 0,5M PH 7,5 σε κάθε δείγμα και επώαση για 30min.
5. Στα δείγματα προσθέτουμε Loading buffer 10X και μεταφέρονται σε heat block στους 100°C για 3min.
6. Στη συσκευή προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα electrophoresis buffer.
7. Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγάδια.
8. Κλείσιμο καπακιού της συσκευής και εφαρμογή ρεύματος σταθερής τάσης 120V.
9. Παρακολουθώντας το μέτωπο της χρωστικής, η εφαρμογή ρεύματος σταματά όταν η γραμμή αυτή πλησιάσει το κάτω μέρος των τζαμιών.

2.17 ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΕΩΣ ΜΕ ΣΥΝΔΕΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ (ELISA)

Η μέθοδος ανοσοπροσροφητικής ανάλυσης στερεάς φάσης με σύνδεση ενζύμου επιλέχτηκε για τα πειράματα προσδιορισμού της ικανότητας πρόσδεσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στους αντίστοιχους υποδοχείς τους.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει τα παρακάτω υλικά:

- Πλαστική πλάκα των 96 βοθρίων (nunc plates)
- Coating Buffer

Για 500ml Coating Buffer
0,636g Na ₂ CO ₃
1,172g NaHCO ₃
dH ₂ O έως τα 500ml
Το PH πρέπει να είναι 9,6

- Wash buffer

1xPBS
0,05% Tween20
dH ₂ O

- Blocking Buffer

3% Albumine from bovine serum (BSA)
1xPBS
0,05% Tween20
dH ₂ O

- Αντίσωμα: Goat anti-Human IgG Fc-HRP (1mg/ml)
- Phosphate-Citrate Buffer 0,05M

Για 500ml
3,65g Na ₂ HPO ₄
2,56g Citric acid
dH ₂ O έως τα 500ml
Το PH πρέπει να είναι 5.0

- Developer Buffer

6μg OPD
10ml 0,05M Phosphate-Citrate Buffer
6μl H ₂ O ₂

- 2N H₂SO₄

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Μία πλαστική πλάκα με πολλά βοθρία καλύπτεται με 100μl/βοθρίο της πρωτεΐνης wild type BAFF και mutated BAFF σε συγκέντρωση 3μg/ml. Διαλύτης είναι το Coating Buffer.
2. Ύστερα από 16 ώρες επώαση στους 4°C, γίνεται πλύση του πιάτου με Wash Buffer.
3. Προσθήκη 150μl blocking buffer στα βοθρία του πιάτου και επώασή του για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Στην ώρα αυτή ετοιμάζονται οι αραιώσεις του υποδοχέα που θα χρησιμοποιηθούν. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τις αραιώσεις είναι 1xPBS, 0,05% Tween-20.
5. Μόλις περάσει η ώρα της επώασης, γίνεται πλύση του πιάτου με Wash Buffer, προσθήκη 100μl από την κατάλληλη αραιώση σε κάθε βοθρίο και επώαση για 1,5 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Στη συνέχεια, γίνεται πλύση του πιάτου με Wash Buffer, προσθήκη 100μl του αντισώματος Goat anti-Human IgG Fc-HRP σε αραιώση 1:1000 στα βοθρία και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Ύστερα, γίνεται πλύση του πιάτου με Wash Buffer (x3).
8. Παρασκευή Developer Buffer (το H₂O₂ προστίθεται τελευταίο, λίγο πριν την εμφάνιση.) και προσθήκη 100μl σε κάθε βοθρίο.
9. Η αντίδραση σταματά με προσθήκη 50μl H₂SO₄.
10. Φωτομέτρηση του πιάτου στα 490nm.

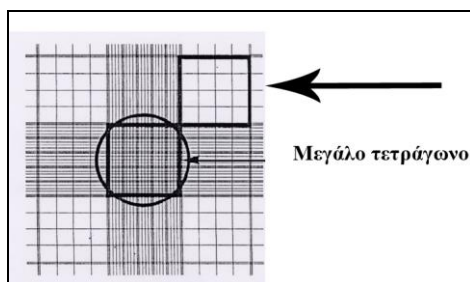
2.18 Δοκιμή RANKL επαγόμενης οστεοκλαστογένεσης από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών

Η δοκιμή επαγωγής οστεοκλαστογένεσης αποτέλεσε μία μέθοδο αξιολόγησης της δραστηριότητας της μεταλλαγμένης RANKL καθώς και νέων αναστολέων της RANKL μέσω αξιολόγησης της παρεμποδιστικής τους επίδρασης στον σχηματισμό οστεοκλαστών.

2.18.1 Απομόνωση και προσδιορισμός αριθμού κυττάρων του μυελού των οστών απο μακρά οστά αρσενικών C57/B16

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Παρασκευή του complete medium a-MEM: 10% FBS, 2mM Glutamine, 5000U P/S.
2. Επιλογή αρσενικών ποντικών άγριου τύπου C57/B16 2-3 μηνών.
3. Θανάτωση ποντικών με CO₂.
4. Αφαίρεση των μακρών οστών του ποντικού.
5. Καθαρισμός των μακρών οστών από τους μύες.
6. Με βελόνα διαμέτρου 27^{1/2}g διανοίγονται οπές στην περιοχή της μετάφυσης των μακρών οστών.
7. 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 μεταφέρουμε σε falcon των 15ml.
8. 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 . a-MEM θρεπτικό μέσο ώστε ο τελικό όγκος να φτάσει τα 14ml.
9. Φυγοκέντρηση στα 1000g για 21min στους 22°C. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην επιτάχυνση και την επιβράδυνση της φυγοκέντρησης,(ρυθμίζονται στο μηχάνημα δίνοντας τιμή 1) η οποία πρέπει να είναι πολύ χαμηλή ώστε οι φάσεις να μην αναμειχθούν.
10. Στο τέλος της φυγοκέντρησης 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 φυγοκέντρησή τους για 5min.
11. Επαναδιάλυση των κυττάρων σε 4ml a-MEM, και προσθέτουμε 10μl σε κάθε μεριά του αιματοκυττόμετρου όπου γίνεται μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο.
12. Υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων μέσω του τύπου (μέσος όρος αριθμός κυττάρων σε ένα μεγάλο τετράγωνο) x αραιώση x 10⁴.



Η μέθοδος που εφαρμόστηκε απαιτεί τα εξής υλικά:

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

2.18.2 Δοκιμή μέσω RANKL επαγόμενης οστεοκλαστογένεσης και χρώση-TRAP

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

ΠΡΩΤΗ ΜΕΡΑ

1. Σε πιάτο των 96 βοθρίων στρώνουμε $6 \cdot 10^4$ κύτταρα σε τελικό όγκο 100 μl από το διάλυμα κυττάρων.
2. Αφήνουμε να προσκολληθούν τα κύτταρα στην επιφάνεια του βοθρίου με επώαση στους 37°C - 5%CO₂.
3. Προετοιμασία του α-MEM θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης-παρεμπόδισης που περιέχει 25ng/ml MCSF και 40ng/ml RANKL με την αντίστοιχη επιθυμητή τελική συγκέντρωση αναστολέα.

4. Προ-επώαση του θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης-παρεμπόδισης στους 37°C για 1 ώρα.
5. Προσθέτουμε 100μl από το μέσο διαφοροποίησης-παρεμπόδισης σε κάθε βοθρίο με κύτταρα.
6. Επώαση των πρόδρομων κυττάρων για διαφοροποίηση στους 37°C - 5%CO₂.

ΤΡΙΤΗ ΜΕΡΑ

1. Προετοιμασία του φρέσκου α-MEM θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης-παρεμπόδισης που περιέχει 25ng/ml MCSF και 40ng/ml RANKL με την αντίστοιχη επιθυμητή τελική συγκέντρωση αναστολέα.
2. Πετάμε το υπερκείμενο από κάθε βοθρίο προσεκτικά ώστε να μη διαταράξουμε τα κύτταρα και προσθέτουμε 200μl με το φρέσκο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης-παρεμπόδισης.
3. Επώαση των κυττάρων στους 37°C - 5%CO₂.

ΠΕΜΠΤΗ ΜΕΡΑ

1. Προετοιμασία του φρέσκου α-MEM θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης-παρεμπόδισης που περιέχει 25ng/ml MCSF και 40ng/ml RANKL με την αντίστοιχη επιθυμητή τελική συγκέντρωση αναστολέα.
2. Πετάμε το υπερκείμενο από κάθε βοθρίο προσεκτικά ώστε να μη διαταράξουμε τα κύτταρα και προσθέτουμε 200μl με το φρέσκο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης-παρεμπόδισης.
3. Επώαση των κυττάρων στους 37°C – 5% CO₂.

ΕΚΤΗ ΜΕΡΑ

1. Πετάμε το θρεπτικό μέσο και πλένουμε τα κύτταρα με 1xPBS
2. Προσθέτουμε 50μl/βοθρίο fixative solution για την μονιμοποίηση των κυττάρων
Επώαση για 1min.
3. Ξέπλυμα με 200μl/well 1xPBS.
4. Προσθέτουμε 100 μl/βοθρίο TRAP διαλύματος και επώαση για 10-15min στους 37°C.
5. Πετάμε το διάλυμα TRAP και προσθέτουμε 200μl διαλύματος 50% Glycerol σε 1xPBS για τη διατήρηση των κυττάρων.
6. Φωτογράφιση των πιάτων σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε απαιτεί τα εξής υλικά:

- Θρεπτικό μέσο α-MEM (Life technologies)

- Mouse M-CSF (R&D Systems)
- Human RANKL (Peprotech)
- 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
- Επωαστικός Θάλαμος Series II 3110 Water-Jacketed CO2 (Thermo Forma)
- Πιάτο 96 βοθρίων (Costar)
- Αγωγό κάθετης νηματικής ροής Bioair instruments safeflow 2
- Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης Nikon eclipse TE300 (Nikon)

2.18.3 Προετοιμασία αναστολέων του RANKL σε δοκιμές οστεοκλαστογένεσης

Η διαλυτοποίηση των χημικών ενώσεων-αναστολέων της RANKL σε πειράματα οστεοκλαστογένεσης έγινε σε 100% DMSO (D2650-SIGMA). Όλες οι χημικές ενώσεις ανάλογα του SPD-304 που δοκιμάστηκαν έδειξαν ικανοποιητική διαλυτότητα στο DMSO και στην συνέχεια προεπώαστηκαν για 1 ώρα με την πρωτεΐνη RANKL σε πειράματα οστεοκλαστογένεσης. Επιπλέον, υπολογίστηκε η τελική συγκέντρωση του DMSO σε πειράματα οστεοκλαστογένεσης να μην υπερβαίνει το 0.1% (στο μέσο διαφοροποίησης των πρόδρομων κυττάρων).

2.19 Δοκιμή δραστηκότητας οστεοκλαστών (TRAP activity assay)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

ΠΡΩΤΗ ΜΕΡΑ

1. Σε πιάτο των 96 βοθρίων στρώνουμε $6 \cdot 10^4$ κύτταρα σε τελικό όγκο 100 μl από το διάλυμα κυττάρων.

2. Αφήνουμε να προσκολληθούν τα κύτταρα στην επιφάνεια του βοθρίου με επώαση στους 37°C - 5%CO₂.
3. Προετοιμασία του α-MEM θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης-παρεμπόδισης που περιέχει 25ng/ml MCSF και 40ng/ml RANKL με την αντίστοιχη επιθυμητή τελική συγκέντρωση αναστολέα.
4. Προ-επώαση του θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης-παρεμπόδισης στους 37 °C για 1 ώρα.
5. Προσθέτουμε 100μl από το μέσο διαφοροποίησης-παρεμπόδισης σε κάθε βοθρίο με κύτταρα.
6. Επώαση των πρόδρομων κυττάρων για διαφοροποίηση στους 37°C - 5%CO₂.

ΤΡΙΤΗ ΜΕΡΑ

1. Προετοιμασία του φρέσκου α-MEM θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης-παρεμπόδισης που περιέχει 25ng/ml MCSF και 40ng/ml RANKL με την αντίστοιχη επιθυμητή τελική συγκέντρωση αναστολέα.
2. Πετάμε το υπερκείμενο από κάθε βοθρίο προσεκτικά ώστε να μη διαταράξουμε τα κύτταρα και προσθέτουμε 200μl με φρέσκο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης-παρεμπόδισης.
3. Επώαση των κυττάρων στους 37°C - 5%CO₂.

ΠΕΜΠΤΗ ΜΕΡΑ

1. Ξεπλένουμε δύο φορές με 1xPBS
2. Λύση των κυττάρων προσθέτοντας 200μl παγωμένο 0,2%Triton X-100/βοθρίο.
Επώαση για 10min και ελαφριά ανάδευση στο ενδιάμεσο.
3. Προσθέτουμε 180μl TRAP διαλύματος σε 20μl κυτταρικού εκχυλίσματος. Επώαση για 30min στους 37 °C.
4. Προσθήκη 50μl 0,5N NaOH για τερματισμό της αντίδρασης.
5. Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 405nm.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε απαιτεί τα εξής υλικά:

- Θρεπτικό μέσο α-MEM (Life technologies)
- Mouse M-CSF (R&D Systems)
- Human RANKL (Peprotech)
- 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

- Επωαστήρας Series II 3110 Water-Jacketed CO₂ (Thermo Forma)
- Πιάτο 96 βοθρίων (Costar)
- Αγωγό κάθετης νηματικής ροής Bioair instruments safeflow 2
- Φωτόμετρο (Molecular devices opti-max tunable microplate reader (Biotech Equipment Sales)).

2.20 Δοκιμή τοξικότητας με αντιδραστήριο MTT (MTT toxicity assay)

Η δοκιμή MTT είναι μια μέθοδος μέτρησης της βιωσιμότητας των κυττάρων και χρησιμοποιείται είτε για έλεγχο του πολλαπλασιασμού είτε για δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας. Το MTT είναι άλας τετραζολίου κίτρινου χρώματος. Η δοκιμασία στηρίζεται στην αναγωγή του κίτρινου άλατος στην ένωση formazan μπλε χρώματος. Η αναγωγή γίνεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ σε μικρότερο βαθμό στα μιτοχόνδρια και στην κυτταρική μεμβράνη. Ένζυμα και συστατικά του κυττάρου που συμμετέχουν στην αναγωγή είναι τα NADH, NADPH, μιτοχονδριακή αναγωγή του σουκκινικού και το κυτόχρωμα C. Το προϊόν της αναγωγής είναι υδρόφοβοι κρύσταλλοι ιώδους χρώματος που διαλυτοποιούνται με οργανικούς διαλύτες (π.χ. ισοπροπανόλη, DMSO, 10% SDS, Nonident P-40, Triton X-100)(Ferrari et al. 1990).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

ΠΡΩΤΗ ΜΕΡΑ

1. Σε πιάτο των 96 βοθρίων στρώνουμε 10^5 κύτταρα σε τελικό όγκο 100 μl από το διάλυμα κυττάρων.
2. Αφήνουμε να προσκολληθούν τα κύτταρα στην επιφάνεια του βοθρίου με επώαση στους 37°C - 5%CO₂.
3. Προετοιμασία του α-MEM θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης-παρεμπόδισης που περιέχει 25ng/ml MCSF και την αντίστοιχη επιθυμητή τελική συγκέντρωση αναστολέα.
4. Προσθέτουμε 100μl από το μέσο διαφοροποίησης-παρεμπόδισης σε κάθε βοθρίο με κύτταρα.
5. Επώαση των πρόδρομων κυττάρων στους 37°C - 5%CO₂.

ΤΡΙΤΗ ΜΕΡΑ

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.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε απαιτεί τα εξής υλικά:

1. Θρεπτικό μέσο α-MEM (Gibco)
2. Mouse M-CSF (R&D Systems)
3. Αντιδραστήριο MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 5mg/ml (Sigma)
4. DMSO (Sigma)
5. Επώαστήρας Series II 3110 Water-Jacketed CO₂ (Thermo Forma)
6. Πιάτο 96 βοθρίων (Costar)
7. Φωτόμετρο Molecular devices opti-max tunable microplate reader (Biotech Equipment Sales)

2.21 Διαχείριση ποντικών

Όλες οι διαδικασίες που περιελάμβαναν χρήση πειραματόζωων είχαν την έγκριση και πραγματοποιήθηκαν με αυστηρή τήρηση των οδηγιών της Ιδρυματικής Επιτροπής Φροντίδας και Χρήσης Πειραματόζωων του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ», (αριθμός έγκρισης Νο.466) καθώς επίσης και την έγκριση της Γενικής Διεύθυνσης Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής της Περιφέρειας Αττικής (αριθμός πρωτοκόλλου 1167/08-03-2012).

Τα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν στεγάζονταν στην μονάδα πειραματοζώων του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ» σε επίπεδο SPF (Specific Pathogen Free). Ο κύκλος φωτός σκοταδιού ήταν 12 h (07:00 – 19:00), η υγρασία μεταξύ 50 - 60%, τα επιτρεπτά όρια θερμοκρασίας μεταξύ 21 – 24 οC και για τον εξαερισμό πραγματοποιούνταν 10-12 αλλαγές αέρα κάθε ώρα. Τροφή και νερό τους παρέχονταν ad libitum. Η τροφή ήταν σε μορφή pellet της κάτωθι σύστασης: 19 % πρωτεΐνη, 5 % λίπος. Το νερό ήταν εκείνο του δικτύου της ΕΥΔΑΠ στην περιοχή της Βάρης.

2.22 Διαγονιδιακά ζώα

Προμηθευτήκαμε τον ανθρώπινο γενωματικό κλώνο BAC με κωδικό RP11-86N24 από την εταιρεία ImaGenes, σε μορφή βακτηριακών stabs. Ο φορέας BAC ήταν ο pBACe3.6. Η διαδικασία απομόνωσης DNA από BAC κλώνους βασίζεται στην μέθοδο της αλκαλικής λύσης (Poulsen 2004). Η διαδικασία απομόνωσης BAC DNA περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1^H ΜΕΡΑ

Τα βακτήρια E.coli που φέρουν τον ανθρώπινο γενωματικό κλώνο BAC καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό με αντιβιοτικό επιλογής (35 µg/ml χλωραμφαινικόλη) στους 37⁰C.

2^H ΜΕΡΑ

Την επόμενη μέρα έγινε επιλογή μονής αποικίας και εμβολιάστηκε σε υγρή προκαλλιέργεια των 10ml στους 37⁰C για 18 ώρες.

3^H ΜΕΡΑ

Την επόμενη μέρα έγινε εμβολιασμός 500µl της προκαλλιέργειας σε 200 ml υγρής καλλιέργειας LB και επώαση στους 37⁰C για 14 ώρες.

4^H ΜΕΡΑ

1. Την επομένη μέρα προχωρήσαμε σε απομόνωση του BAC DNA. Τα 200 ml της καλλιέργειας μοιράστηκαν σε 4 falcon των 50ml και φυγοκέντρωση στις 3.500rpm για 30 λεπτά στους 4⁰C.

2. Πετάμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το κάθε βακτηριακό pellet σε 8 ml P1 διαλύματος.

3. Ακολούθως προσθέτουμε σε κάθε falcon 8 ml P2 διαλύματος και αναμειγνύουμε (Στην φάση αυτή θέλει πολύ ελαφριά ανάδευση). Επώαση για 5min. σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Μετά προσθέτουμε με πολύ προσοχή 8 ml από το P3 διάλυμα και κάνουμε πολύ ελαφριά ανάδευση πάνω κάτω μέχρι να αλλάξει σε άσπρο χρώμα το διάλυμα. Αφήνουμε στον πάγο για 1 ώρα.

5. Φυγοκέντρωση στις 3.500rpm για 30 λεπτά στους 4⁰C.

6. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (περίπου 20 ml) σε νέα σειρά falcon αφού προηγουμένως το διηθήσουμε μέσα από αποστειρωμένη γάζα ώστε να απομακρύνουμε κυτταρικά αιωρήματα.

7. Ακολούθως σε κάθε φιαλίδιο τύπου falcon προσθέτουμε 24 ml παγωμένη ισοπροπανόλη και αναμειγνύουμε ελαφριά.

8. Φυγοκέντρωση στις 3.500rpm για 30 λεπτά στους 4⁰C.
 9. Πετάμε το υπερκείμενο και επαναφυγοκεντρούμε για σύντομο χρόνο ώστε να αφαιρέσουμε την εναπομείνουσα ισοπροπανόλη.
 10. Ξεπλένουμε το DNA με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύουμε το DNA σε 0.25 ml TE ρυθμιστικού διαλύματος για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Από αυτό το στάδιο και μετά χρησιμοποιούμε κομένα tip ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος να σπάσουμε το DNA
11. Ανά 2 φιαλίδια τύπου falcon μεταφέρουμε το DNA (σύνολο 500μl) σε φιαλίδιο των 1.5 ml.
 12. Προσθέτουμε σε κάθε φιαλίδιο 500μl φαινόλη/χλωροφόρμιο. Πολύ προσεκτικά αντιστρέφουμε το φιαλίδιο 8 φορές για καλή ανάμειξη και φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 5 λεπτά.
 13. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο και επαναλαμβάνουμε την διαδικασία του βήματος 12 άλλες δύο φορές.
 14. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο και προσθέτουμε 500μl διαλύματος χλωροφόρμιου/ισοαμυλικού. Πολύ προσεκτικά αντιστρέφουμε το φιαλίδιο 8 φορές για καλή ανάμειξη και φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 5 λεπτά.
 15. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο και προσθέτουμε παγωμένη 100% αιθανόλη για συμπύκνωση του DNA . «Ψαρεύουμε» το DNA με γυάλινη πιπέττα και το ξεπλένουμε με 70% αιθανόλη. Αφήνουμε να στεγνώσει το DNA και το μεταφέρουμε να επαναδιαλυθεί σε ddH₂O για 12 ώρες στους 4⁰C.

5^H ΜΕΡΑ

1. Το απομονωμένο BAC DNA (Εικ. 2.21A) (190 μl) υπέστη πέψη με το ένζυμο NotI σύμφωνα με την κάτωθι αντίδραση.

BAC DNA	190 μl
10 x buffer	25 μl
NotI	15 μl
100x BSA	2.5 μl
ddH ₂ O	17.5 μl
Τελικός όγκος	250 μl
Επώαση 37 ⁰ C, 3-4 ώρες	

2. Η αντίδραση ακολούθως αναλύθηκε σε πήκτωμα 1% αγαρόζης (Biorad, #162-0137) με ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο (Pulsed field electrophoresis, CHEF-DR II SYSTEM BIORAD-εικόνα 2.20).

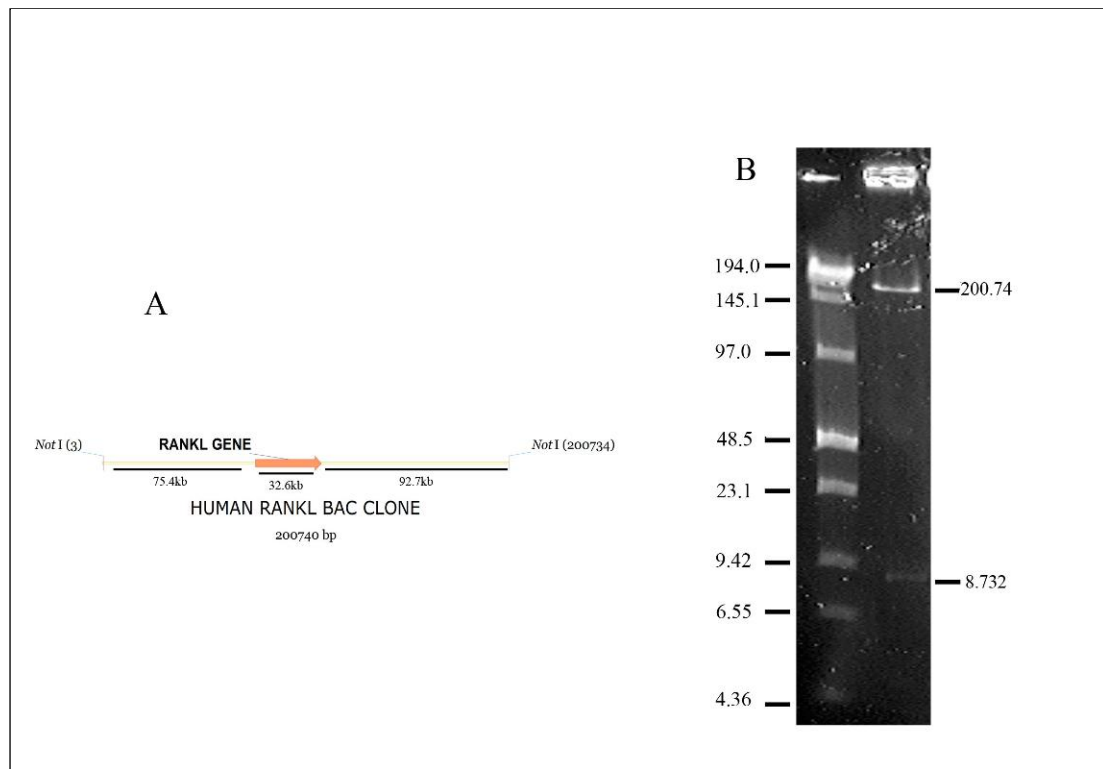


Εικόνα 2.20. Συσκευή ηλεκτροφόρησης παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου CHEF-DR II SYSTEM της BIORAD

3. Οι συνθήκες τρεξίματος σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο που ακολουθήσαμε φαίνονται παρακάτω:

Συνθήκες παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου ηλεκτροφόρησης	
Initial switch time	5
Final switch time	10
Τάση (voltage)	4V/cm
Χρόνος Τρεξίματος (ώρες)	18-20
Ρυθμιστικό διαλυμα ηλεκτροφόρησης	0,5X TBE
Θερμοκρασία	14 ⁰ C

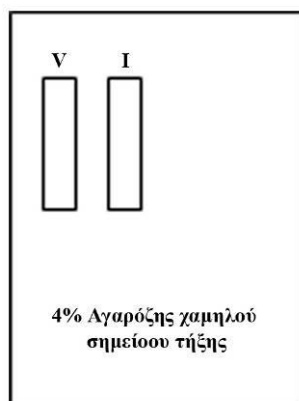
4. Ένα ενδεικτικό τρέξιμο μετά την ηλεκτροφόρηση σε παλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο φαίνεται στην εικόνα 2.21B.



Εικόνα 2.21. Ο κλώνος BAC που χρησιμοποιήθηκε και τα προϊόντα πέψης του με το ένζυμο περιορισμού NotI. (Α) Σχηματική αναπαράσταση του κλώνου. Οι οριζόντιες μαύρες γραμμές και ο αριθμός δηλώνει το μήκος του τμήματος σε kb. **(Β)** Πέψη του κλώνου BAC και ανάλυση με PFE. Δεξιά τα προϊόντα πέψης, αριστερά ο δείκτης DNA (New England Biolabs, Low Range PFG). Οι αριθμοί δηλώνουν μήκος σε kbp. Η ζώνη των ~9000 bp αντιστοιχεί στον φορέα.

6^H ΜΕΡΑ

1. Στη συνέχεια εντοπίζουμε την θέση του BAC DNA και κάνουμε εξαγωγή των τμημάτων πηκτώματος αгарόζης τόσο εκείνου που περιέχει το RANKL όσο και εκείνου που περιέχει μόνο το DNA του φορέα (vector) (Εικ. 2.21A-B).
2. Τοποθετούμε τις δύο λωρίδες του πηκτώματος αгарόζης με κατάλληλο προσανατολισμό μέσα σε μία μικρή συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης όπως φαίνεται στην εικόνα 2.22.



Εικόνα 2.22. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης ηλεκτροφόρησης των δύο λωρίδων πηκτώματος αγαρόζης μέσα σε 4% αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξης. Διακρίνονται οι δύο λωρίδες πηκτώματος αγαρόζης η πρώτη από δεξιά που περιέχει το γενωματικό DNA με το huRANKL (I) και το δεύτερο το DNA του φορέα (V).

3. Ετοιμάζουμε 100ml 4% αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης και το μεταφέρουμε μέσα στην συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης ώστε να καλύψουμε τις δύο λωρίδες του πηκτώματος αγαρόζης. Αφήνουμε να πήξει το πήκτωμα.

4. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 50kV για 14 ώρες στους 4⁰C. Σκοπός της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης είναι να «μεταναστεύσει» το DNA από το 1% πήκτωμα και να συγκεντρωθεί (stacking) στο 4% πηκτώματος χαμηλού σημείου τήξης (κάθε 3 ώρες το DNA διανύει 3cm).

7^H MEPA

1. Την επόμενη ημέρα εξάγουμε μία περιοχή από το 4% πηκτώματος χαμηλού σημείου τήξης (σχήμα κύβου) στο οποίο έχει συγκεντρωθεί το DNA και το μεταφέρουμε σε φιαλίδιο των 15ml για εξισσορόπηση σε 12.5ml TENPA διάλυμα για τουλάχιστον 1.5 ώρα.

2. Στην συνέχεια μεταφέρουμε τα «κυβάρια» του 4% πηκτώματος αγαρόζης στους 65⁰C για 3min. ώστε να λιώσει το πήκτωμα.

3. Κάνουμε ένα γρήγορο spin και επωάζουμε ξανά τα «κυβάρια» στους 65⁰C επιπλέον 10 min.

4. Μεταφέρουμε το λιωμένο πήκτωμα στους 42⁰C για 5min. και στην συνέχεια προσθέτουμε (2units/100μl λιωμένου πηκτώματος) β-αγαράση (NEB-stock 1unit/μl). Επώαση στους 42⁰C για 3 ώρες.

5. Μετά την επώαση αφήνεται το λιωμένο πήκτωμα με το DNA σε θερμοκρασία δωματίου για 10min και παρατηρούμε ότι δεν πρέπει να πήξει.

6. Φυγοκέντρωση για 10sec. και συλλέγουμε το υπερκείμενο αποφεύγοντας να τραβήξουμε υπολλείματα αγαρόζης.
7. Μεταφέρουμε το BAC DNA πάνω σε ειδικές μεμβράνες «dialysis» (διαμέτρου 0.05μm-Millipore) για ανταλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος σε διάλυμα μικροένγχυσης. Αφήνουμε να γίνει το «dialysis» για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Συλλέγουμε το BAC DNA μετά το«dialysis» και τρέχουμε 2, 5 και 10 μl σε ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου για να ελέγξουμε την ποιότητα και την ποσότητα του BAC DNA.
9. Το BAC DNA που απομονώθηκε χρησιμοποιήθηκε για μικροενέσεις σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων. Οι μικροενέσεις πραγματοποιήθηκαν στη μονάδα διαγένεσης του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ».

Διαλύματα

Για 12.5ml TENPA προσθέτω 125μl 100X διάλυμα πολυαμίνης (Polyamine).

Για 5ml διαλύματος μικροένγχυσης προσθέτω 125μl 100X διάλυμα πολυαμίνης (Polyamine).

(Τελική Συγκέντρωση 30μM Σπερμίνη and 70μM Σπερμιδίνη)

TENPA Buffer

με φίλτρο 0.22μm

50ml

1M Tris-HCl (pH 7.5) 500μl 10mM

0.5M EDTA (pH 8.0) 100μl 1 mM

5M NaCl 1ml 100mM

H₂O to 50ml

Διάλυμα Μικροένγχυσης, Αποστείρωση

50ml

1M Tris-HCl (pH 7.5) 500μl 10mM

0.5M EDTA (pH 8.0) 10μl 0.1mM

5M NaCl 1ml 100mM

H₂O to 50ml

1000x Polyamine Stock: Αποστείρωση με φίλτρο 0.22μm, 56.110ml

Spermine tetrahydrochloride 0.586g 30mM

Spermidine trihydrochloride 1g 70mM

<u>P1</u> (filter sterilize, 4 ⁰ C)	<u>250ml</u>	
1M Tris-HCl (pH 8.0)	12.5ml	50mM
0.5M EDTA (pH 8.0)	5ml	10mM
H ₂ O	to 249.75ml	

Αποστείρωση με φίλτρο(0,25μm)

Πριν την χρήση του διαλύματος προσθέτω:

100mg/ml RNase A	0.25ml	100ug/ml
------------------	--------	----------

P2 (όχι αποστείρωση, φρέσκο κάθε φορά)

10N NaOH	1ml	0.2N
H ₂ O	to 47.5ml	
20% SDS	2.5ml	1%

P3 (αποστείρωση, 4⁰C)

	<u>250ml</u>
Potassium acetate	73.6g 3M
H ₂ O	to 200ml
Glacial Acetic Acid	27.5ml
H ₂ O	to 250ml

Ο αριθμός αντιγράφων του διαγονιδίου προσδιορίστηκε με χρήση qPCR (βλέπε ενότητα 2.22.4) χρησιμοποιώντας DNA ουράς από ποντίκια TghuRANKL και WT αδέρφια. Χρησιμοποιήθηκε ένα ζευγάρι εκκινητών που υβριδίζει στο γονίδιο RANKL τόσο του ανθρώπου όσο και του ποντικού. Ως γονίδιο αναφοράς λειτούργησε το HuR, ένα πυρηνικό γονίδιο. Οι φορές μεταβολής (fold change) μεταξύ των TghuRANKL και των WT δειγμάτων πολλαπλασιάστηκε επί 2 (θεωρείται πως το ενδογενές RANKL υπάρχει σε δύο αντίγραφα) και από την τιμή αυτή αφαιρέθηκε η τιμή 2 για να προκύψει ο απόλυτος αριθμός αντιγράφων του RANKL.

Εκκινητής	Ακολουθία
CommonRANKL-F	5'-ACCTGTACGCCAACATTTGC-3'
CommonRANKL-R	5'-CTTGGGATTTTGATGCTGGT-3'
HuR F	5'-AGG ACA CAG CTT GGG CTA CG-3'
HuR R	5'-CGT TCA GTG TGC TGA TTG CT-3'

2.23 Γονοτυπική Ανάλυση

2.23.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών

1. Τοποθέτηση της κομμένης ουράς του ζώου περίπου 0,3cm σε άδειο erpendorf 1.5ml.
2. Προσθήκη 400μl «διάλυμα για ουρές» και 2 μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K.
3. Επώαση όλη τη νύχτα σε υδατόλουτρο 55 οC.
4. Την επόμενη μέρα: έντονη ανάμιξη για 10 δευτερόλεπτα για να διαλυθεί η ουρά.
5. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και έντονη ανάμιξη για 5 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση σε 12000rpm για 10 λεπτά.
7. Μεταφορά της υδάτινης φάσης σε ισοπροπανόλη (290 μl) για την κατακρήμνιση του DNA.
8. Ελαφριά ανάμιξη και «ψάρεμα» του DNA με κλειστή στην άκρη γυάλινη πιπέτα Pasteur.
9. Εμβάπτιση DNA διαδοχικά σε 70% και 95% αιθανόλη (4-8 φορές).
10. Αφήνεται η πιπέτα να στεγνώσει στον αέρα για 10 λεπτά.
11. Τοποθέτηση της πιπέτας μέσα σε ένα erpendorf που περιέχει αποστειρωμένο ddH₂O (~100 μl) για περίπου 30 λεπτά ώστε να διαλυθεί το DNA.
12. Αποθήκευση στους 4 ή -20 οC.

Διαλύματα

- «Διάλυμα για ουρές»: 0.05M Tris, pH 8.0, 0.1M EDTA, 0.1M NaCl, 1% w/v SDS
- Πρωτεΐνάση K (Roche) : Διάλυμα stock 10 mg / ml σε 50mM Tris pH 8.0

2.23.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Για τη γονοτύπηση (genotyping) των δύο διαγονιδιακών TghuRANKL σειρών πραγματοποιήθηκε η παρακάτω αντίδραση:

Συστατικά Αντίδρασης	Όγκος (μl)
DNA εκμαγείο	1.0
10x Ρυθμιστικό Διάλυμα PCR (Taq buffer)	2.0
dNTPs mix	1.5
MgCl ₂ (stock, 25 mM)	1.8

Εκκινητής Forward και Reverse (huRANKL), 10pmol/λ	1.0/ανά εκκινητή
Εκκινητής Forward και Reverse (mu.RANKL), 0.5pmol/λ	0.3/ανά εκκινητή
Taq DNA πολυμεράση	0,3
ddH ₂ O	10,8
Τελικός όγκος αντίδρασης	20

Διαλύματα

Taq Buffer 10x: 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9, 1% Triton-X

dNTPs mix: Invitrogen (#10297-018) (2.5 mM stock)

Εκκινητές

Το ζευγάρι εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ήταν σχεδιασμένο έτσι ώστε να υβριδίζει μόνο σε αλληλουχία του huRANKL. Ένα δεύτερο ζευγάρι εκκινητών για το γονίδιο mu.RANKL του ποντικού χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση δεύτερου προϊόντος που λειτουργούσε ως θετικός μάρτυρας για την επιτυχία της αντίδρασης.

Όνομα Εκκινητή	Ακολουθία
Human RANKLF	5'-TCTTCAACTAATGGTGTACG-3'
Human RANKLR	5'-TCTACAAGGTCAAGAGCATG-3'
Mu.RANKL F	5'-AGGAGCTCCAGGTAACATG-3'
Mu.RANKL R	5'-GGCAAGGTAGGGTTCAACTG-3'

Συσκευές

Κυκλοθερμοποιητής (C1000 Thermal Cycler, Biorad)

2.23.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αгарόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού αυτών των μορίων και βασίζεται στην διαφορετική ταχύτητα με την οποία τα μόρια νουκλεϊνικών οξέων διαφορετικού μεγέθους κινούνται μέσα από τους πόρους του πηκτώματος αгарόζης, υπό την επίδραση εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η κατεύθυνση κίνησης των νουκλεϊνικών οξέων είναι προς την κάθοδο καθότι είναι αρνητικά φορτισμένα μόρια εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων που διαθέτουν. Η συγκέντρωση της αгарόζης στο πήκτωμα καθορίζει και τη διαχωριστική δυνατότητα του πηκτώματος.

Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης 1-2% (w/v)

Αραίωση 250ml διαλύματος 10 x TBE σε τελικό όγκο 1500ml (1x TBE) με dH₂O. Προσθήκη 2.5-5g (ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση) αγαρόζης (για ηλεκτροφόρηση ρουτίνας: Agarose Basic, Applichem, #A8963). Όπου σε κωνική φιάλη που περιέχει 250ml του διαλύματος 1x TBE και διάλυσή της μέχρι να γίνει διαφανής (περίπου 5 λεπτά) με θέρμανση στο φούρνο μικροκυμάτων. Σύντομη ψύξη του διαλύματος, προσθήκη 20 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου και ελαφριά ανάμιξη. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο (tray) με τις χτένες (για το σχηματισμό των πηγαδιών) και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθεί πλήρως το πήκτωμα. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία είχε ήδη τοποθετηθεί το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1x TBE). Προσθήκη έγχρωμου διαλύματος καταβύθισης orange G στο διάλυμα των νουκλεϊνικών οξέων και καλή ανάδευση με πιπετάρισμα. Φόρτωση 10 μl του μίγματος στα πηγάδια του πηκτώματος. Εφαρμογή τάσης 100 – 120V για χρονική διάρκεια ανάλογα με το είδος των δειγμάτων προς ανάλυση. Φωτογράφιση σε λάμπα UV και αποθήκευση σε ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Διαλύματα

TBE 10x: 323.4g Tris, 165g Boric acid, 27.9g EDTA σε τελικό όγκο 3L με ddH₂O.

Το διάλυμα αυτό έχει αυτόματα pH = 8.0.

Βρωμιούχο αιθίδιο: 1g / 100ml ddH₂O

Αγαρόζη (Applichem)

OrangeG (Διάλυμα καταβύθισης): 4015g Sucrose σε 80ml ddH₂O,ακολούθως προσθήκη 200mg OrangeG. Τελικός όγκος 100ml.

Συσκευές

Τροφοδοτικό BIO-RAD

Συσκευή ηλεκτροφόρησης OWL

Σύστημα φωτογράφισης με UV (Alpha Innotech, Alpha Imager-Mini)

2.24 Ανάλυση έκφρασης σε επίπεδο mRNA

2.24.1 Απομόνωση ολικού RNA με τη μέθοδο ουρίας / χλωριούχου λιθίου

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή για αποφυγή μολύνσεων με RNάσες, στον πάγο, και οι φυγοκεντρήσεις στους 4°C

1. Θανάτωση ποντικών, λήψη ~100 mg ιστού, γρήγορο ξέπλυμα σε 1 x PBS, γρήγορο στένγωμα σε απορροφητικό χαρτί, μεταφορά σε σωλήνα eppendorf 1.5 ml και ακαριαίο πάγωμα σε υγρό άζωτο μέχρι τη συλλογή όλων των ιστών.
2. Ο κατεψυγμένος ιστός τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο μέσα σε 3ml κρύου διαλύματος 6 M Urea / 3 M LiCl.
3. Ομογενοποίηση με μηχανικό ομογενοποιητή (Ultra-Turrax T25 Basic) σε μέγιστη ταχύτητα σε πάγο.
4. Χρήση υπερήχων για 30 δευτερόλεπτα με μέγιστη δύναμη στο πάγο
5. Επώαση στους 4 oC όλη τη νύχτα πάνω στον ανακινητή (shaker).
6. Μεταφορά του ομογενοποιημένου υλικού σε δυο σωλήνες eppendorf, 1.5 ml.
7. Φυγοκέντρηση στις 18300 g, 20 min και απομάκρυνση υπερκείμενου.
8. Ξέπλυμα pellet με 1ml διαλύματος 6 M Urea / 3 M LiCl.
9. Φυγοκέντρηση στις 18300 g, 15 min και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
10. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 200μl διαλύματος RNA-TES και επανένωση του δείγματος σε ένα eppendorf.
11. Εκχύλιση με 400μl διαλύματος φαινόλης:χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και έντονη ανάμειξη του δείγματος για 5 λεπτά.
12. Φυγοκέντρηση στις 18300 g, 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Μεταφορά 360μl του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα eppendorf, χωρίς να διαταραχθεί η ενδιάμεση φάση.
14. Προσθήκη 40μl διαλύματος 2M NaOAc και 1ml 100% αιθανόλης. Ανάμειξη του δείγματος και επώαση, -20 oC, 2 h ώρες ή όλη τη νύχτα.
15. Φυγοκέντρηση στις 16200 g, 10 min, προσεκτική απομάκρυνση όλου του υπερκείμενου και τοποθέτηση στον πάγο.
16. Ξέπλυμα του ιζήματος RNA με 400μl διαλύματος 70% αιθανόλη.
17. Φυγοκέντρηση στις 16200 g ,10min
18. Απομάκρυνση όλου του υπερκείμενου και τοποθέτηση στον πάγο.
19. Εξάτμιση διαλύματος αιθανόλης και διαλυτοποίηση σε ddH₂O.

Μετά την διαλυτοποίηση ακολουθεί ποσοτικοποίηση του RNA και έλεγχος της ποιότητάς του (βλέπε επόμενη ενότητα).

Διαλύματα

ddH₂O με DEPC για την εξουδετέρωση RNAsών: Προσθήκη 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) (Applichem, #A0881, 0020) σε ddH₂O, ανάδευση όλη τη νύχτα, και αποστείρωση 20min για την καταστροφή του DEPC.

RNA-TES

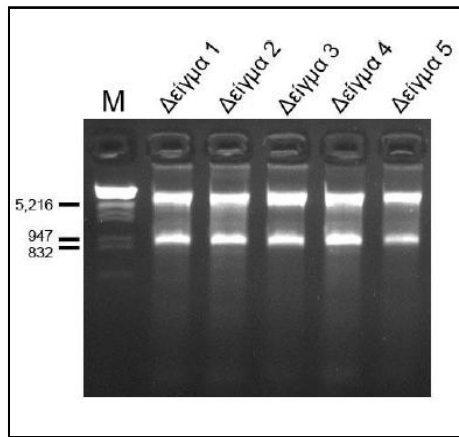
10mM Tris, 1mM EDTA, 0.5%SDS, pH=7.6. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο και αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.

LiCl / Urea

3M LiCl (Applichem, #A6286, 0250), 6M Urea (Sigma, #U5378) σε ddH₂O
Αποστείρωση με φιλτράρισμα από φίλτρο 0.22μm και αποθήκευση στους 4°C

2.24.2 Ποσοτικοποίηση RNA – Έλεγχος καθαρότητας και ακεραιότητας

Η ποσοτικοποίηση του RNA πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά με χρήση της συσκευής Nano-Drop ND-1000. Μετά την αρχικοποίηση (Initiation) του οργάνου με ddH₂O πραγματοποιείται μηδενισμός με χρήση ddH₂O με DEPC, δηλαδή το διαλύτη του διαλύματος RNA. Στη συνέχεια τα δείγματα RNA φωτομετρούνται διαδοχικά και αυτόματα σε τρία μήκη κύματος: 280, 260, και 230 nm. Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίζεται από την απορρόφηση στα 260 nm. Ο λόγος 260 / 280 χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της καθαρότητας του RNA από DNA ενώ ο λόγος 260 / 230 χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της καθαρότητας σε σχέση με υπολείμματα πρωτεϊνών, αλάτων, υδατανθράκων και οργανικών διαλυτών όπως η φαινόλη. Τα δείγματα εκείνα με λόγο 260 / 280 και 260 / 230 περίπου ίσο ή μεγαλύτερο από 2 χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω αξιολόγηση ακεραιότητα σε πήκτωμα αγαρόζης. Για το σκοπό αυτό 0.5 μg ολικού RNA αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης 2 % το οποίο είναι παρασκευασμένο καινούργιο για αποφυγή μόλυνσης με RNάσες. Στα δείγματα που δεν είναι αποικοδομημένα διακρίνονται οι δύο ζώνες του ριβοσωμικού RNA και ένας αριθμός άλλων λιγότερο άφθονων ζωνών (Εικόνα 2.23).



Εικόνα 2.23. Ανάλυση ολικού RNA Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2 %. Διακρίνεται στην πρώτη γραμμή ο δείκτης μεγέθους και πέντε δείγματα RNA στις υπόλοιπες. Οι δύο φωτεινές ζώνες που αντιστοιχούν στο ριβοσωμικό RNA είναι διακριτές ενώ διακρίνονται και πλήθος άλλων ζωνών χαμηλότερης φωτεινότητας. Οι αριθμοί είναι σε bp.

2.24.3 Σύνθεση cDNA

1. Σε αποστειρωμένο σωλήνα PCR 0.2 ml μεταφέρθηκαν 2μg ολικού RNA και προστέθηκε DEPC-ddH₂O για να φτάσει ο τελικός όγκος στα 8μl.
2. Προσθήκη 1μl από το διάλυμα αντίδρασης (reaction buffer) και 1μl DNase (Sigma).
3. Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 1μl διαλύματος τερματισμού (stop solution).
5. Θέρμανση, 70 oC , 10 min.
6. Άμεση μεταφορά στον πάγο.
7. Προσθήκη 1μl dNTPs και 1μl (91 pmol) εκκινητή oligo d(T) 18 (New England Biolabs, #S1316S).
8. Θέρμανση, 70 oC, 10 min.
9. Άμεση μεταφορά στον πάγο.
10. Προσθήκη 2μl διαλύματος αντίδρασης, 1μl Αντίστροφης Μεταγραφάσης M- MLV και 4μl ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl.
11. Θέρμανση, 37°C, 50 min.
12. Θέρμανση, 80°C, 10 min για απενεργοποίηση ενζύμου.

Ένζυμα/διαλύματα

DNase, reaction buffer και stop solution: amplification grade kit (Sigma, #AMPD1) M-MLV Reverse Transcriptase και διάλυμα αντίδρασης: (Sigma, kit #M1302)

Συσκευές

BioRad C1000 thermal cycler

2.24.4 Ποσοτικό PCR πραγματικού χρόνου (qPCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) είναι μια μέθοδος για την ποσοτικοποίηση mRNA στόχων κατά την οποία η συσσώρευση των προϊόντων της PCR μετρείται σε πραγματικό χρόνο, καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ενίσχυσης. Στην πράξη ένας αναλυτής (OCD βίντεο κάμερα), καταγράφει την δευτερογενή ακτινοβολία φθορισμού που εκπέμπεται από μία φθορίζουσα ομάδα η οποία ενσωματώνεται στο νεοσχηματιζόμενο προϊόν της αντίδρασης PCR. Η διέγερση της φθορίζουσας ομάδας γίνεται μέσω ακτινοβολίας διέγερσης (συνήθως μονοχρωματική ακτινοβολία laser) η οποία εκπέμπεται προς το δείγμα από ειδική λυχνία, η οποία περιλαμβάνεται στη συσκευή. Ο μετρούμενος φθορισμός μετρείται και καταρτίζεται ένα διάγραμμα σχέσης φθορισμού με κύκλο της αντίδρασης. Επιλέγεται αυθαίρετα ένα κατώφλι φθορισμού και έτσι καθορίζεται ο κύκλος στον οποίο η κάθε αντίδραση έφθασε αυτό το κατώφλι. Αυτός ο κύκλος ονομάζεται CT (Threshold Cycle). Η σύγκριση μεταξύ των CT των διαφόρων δειγμάτων επιτρέπει τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του κάθε γονιδίου-στόχου μεταξύ διαφορετικών καταστάσεων (π.χ. αγρίου τύπου – μεταλλαγμένο) εφόσον χαμηλότερες τιμές CT σημαίνουν υψηλότερη αρχική μήτρα και άρα υψηλότερη έκφραση και το αντίστροφο. Η κάθε τιμή κανονικοποιείται για ένα γονίδιο αναφοράς. Επίσης η περιοχή που θα πραγματοποιηθεί η σύγκριση των CT πρέπει να είναι εκείνη της εκθετικής φάσης αύξησης του προϊόντος. Χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος των CT ή αλλιώς η μέθοδος 2- $\Delta\Delta$ CT (Schmittgen & Livak 2008). Το κάθε ζευγάρι εκκινητών ελέγχεται πρώτα ότι παράγει ένα μοναδικό προϊόν το οποίο φαίνεται ως μια μοναδική απότομη κορυφή στο διάγραμμα dF/dT / θερμοκρασία και ως μια μοναδική ζώνη σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια παρασκευάζονται διαδοχικές αραιώσεις ενός δείγματος cDNA 1:2.5, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 και πραγματοποιείται qPCR για το γονίδιο στόχο και για ένα γονίδιο αναφοράς και υπολογίζεται η απόδοση της PCR για το κάθε ζευγάρι και η αραιώση εκείνη που αντιστοιχεί σε εκθετική φάση αύξησης. Η απόδοση της PCR πρέπει να είναι κοντά στο 1.00 και σε κάθε περίπτωση η διαφορά μεταξύ των δύο ζευγαριών (στόχου και αναφοράς) δεν πρέπει να υπερβαίνει η κάθε μία το 10 % της άλλης.

Στη συνέχεια πραγματοποιούνται διπλές αντιδράσεις για το κάθε δείγμα cDNA στην επιλεγμένη αραιώση, για το γονίδιο στόχο και για το γονίδιο αναφοράς, υπολογίζονται οι τιμές CT για το κάθε δείγμα και το κάθε ζευγάρι εκκινητών ως ο μέσος όρος των διπλών αντιδράσεων. Το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως φορές μεταβολής έκφρασης (fold change) και υπολογίζεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Φορές μεταβολής} = 2^{-[(\text{Ct στόχος} - \text{Ct αναφοράς}) \text{ δείγμα A} - (\text{Ct στόχος} - \text{Ct αναφοράς}) \text{ δείγμα B}]}$$

Όλοι οι υπολογισμοί και τα διαγράμματα πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Rotor-Gene 6000 (Corbett) και για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων το διάλυμα SsoFast EvaGreen – Supermix (BIORAD) το οποίο περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για την αντίδραση PCR πλην των εκκινητών. Η αντίδραση έχει ως εξής:

Συστατικά Αντίδρασης	Όγκος (μl)
cDNA	1
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
EvaGreen mix	5
ddH ₂ O	2
Τελικός όγκος αντίδρασης	10

Το ζευγάρι εκκινητών αναγνωρίζει τόσο το ανθρώπινο όσο και το ποντικίσιο μετάγραφο του RANKL. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ακόμη 2 ζευγάρια εκκινητών που αναγνωρίζουν στοχευμένα μόνο το ποντικίσιο RANKL και OPG. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε εκείνο της β2-μικροσφαιρίνης.

Όνομα Εκκινητή	Ακολουθία
RANKL H+M F	5'-ACCTGTACGCCAACATTTGC-3'
RANKL H+M R	5'-CTTGGGATTTTGATGCTGGT-3'
Hu.RANKL F	5'-ACGCGTATTTACAGCCAGTG-3'
Hu.RANKL R	5'-CCCGTAATTGCTCCAATCTG-3'
Mu.RANKL F	5'-TGTACTTTCGAGCGCAGATG-3'
Mu.RANKL R	5'-AGGCTTGTTTCATCCTCCTG-3'
Mu.OPG F	5'-CTTGCCTTGATGGAGAGCCT-3'
Mu.OPG R	5'-TCGCTCGATTTGCAGGTCT-3'
B2M F	5'-TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA-3'
B2M R	5'-CAGTATGTTTCGGCTTCCCATTTC-3'

2.25 Ιστολογική ανάλυση

2.25.1 Σκίνωση και τμήση

Αμέσως μετά τη θανάτωση του ποντικού, αφαιρείται ο ιστός και τοποθετείται σε φορμαλίνη (υδατικό διάλυμα 4% w/v φορμαλδεΐδης, VWR) σε σωλήνα ιστολογίας και αφήνεται 4 οC, όλη τη νύχτα για πλήρη μονιμοποίηση (fixation). Την επομένη ο ιστός ξεπλένεται σε 1 x PBS και αφήνεται στο ίδιο διάλυμα μέχρι την ημέρα σκίνωσης (αφυδάτωση και παραφινοποίηση). Για τη σκίνωση ο ιστός εμβαπτίζεται διαδοχικά στην ακόλουθη σειρά διαλυμάτων με χρήση ιστοκινέτας: 70% EtOH 2h, 85% EtOH 1.5 h, 96% EtOH 3 x 1h, 100% EtOH 2 x 1h, ξυλένιο 2 x 45 min, παραφίνη 1 x 2h, καθαρή παραφίνη 2-3 h, και την επομένη εγκλείεται σε μπλοκ παραφίνης. Με τη χρήση μικροτόμου λαμβάνονται τομές πάχους 4 μm. Οι τομές απλώνονται στην επιφάνεια dH₂O, 45 οC για λίγα λεπτά και στη συνέχεια συλλέγονται στην επιφάνεια γυάλινων αντικειμενοφόρων πλακών (SB) όπου αφήνονται να στεγνώσουν στην αρχή σε θερμή επιφάνεια για μερικά λεπτά και στη συνέχεια στον πάγκο, όλη τη νύχτα. Την επομένη οι τομές είναι έτοιμες για χρώση.

2.25.2 Χρώση Αιματοξυλίνης/Ηωσίνης

Αποπαραφίνωση: εμβάπτιση των τομών 3 x 3 min σε ξυλένιο 100%.

Ενυδάτωση: διαδοχική εμβάπτιση των τομών στα ακόλουθα διαλύματα μειούμενης συγκέντρωσης EtOH: 1 x 2 min EtOH 100%, 2 x 2 min EtOH 96%, 1 x 2 min EtOH 70%, 1 x 2 min EtOH 50%, 2 x 2 min dH₂O.

Χρώση: εμβάπτιση τομών σε διάλυμα αιματοξυλίνης 1.5 – 1.75 min και στη συνέχεια καλό ξέπλυμα με dH₂O μέχρι που να μην παρατηρείται απώλεια χρωστικής. Στη συνέχεια οι τομές εμβαπτίζονται στιγμιαία σε όξινη EtOH, ξεπλένονται στιγμιαία σε dH₂O και εμβαπτίζονται 3 min σε διάλυμα Scotch. Ακολούθως, ξεπλένονται στιγμιαία με εμβάπτιση σε dH₂O και εμβαπτίζονται στιγμιαία και διαδοχικά 5 x EtOH 50%, 5x EtOH 70% και ακολούθως σε διάλυμα ηωσίνης 2.5- 3 min. Ακολούθως οι τομές ξεπλένονται σε άφθονο dH₂O.

Αφυδάτωση και κάλυψη: με στιγμιαία εμβάπτιση στα ακόλουθα διαλύματα: 10 x EtOH 50 %, 10 x EtOH 70 %, 2 x 15 EtOH 90%, 20 x EtOH 100%, ξυλένιο, 1 x 3 min ξυλένιο. Στη συνέχεια οι τομές καλύπτονται με DPX mounting medium (VWR) και καλυπτρίδα και μετά από μερικά λεπτά που αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα είναι έτοιμες για παρατήρηση στο μικροσκόπιο.

Διαλύματα

όξινη EtOH: 70 % EtOH / 0.5 % HCl

διάλυμα Scotch: 2g KHCO₃, 20 g MgSO₄ * 7 H₂O σε 1 L dH₂O

Συσκευές

Ιστοκινέτα (Pathotec, Techno-TEC1)

Για εγκλεισμό σε μπλοκ παραφίνης (Meditex, TBS88, Paraffin Embedding System)

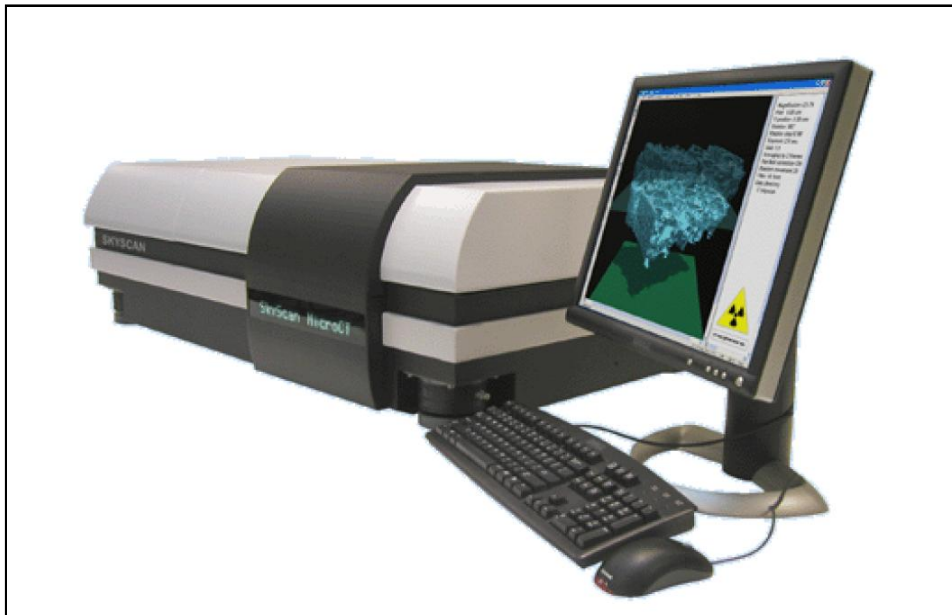
Μικροτόμος (Leica, RM2125RT)

Υδατόλουτρο (Leica, HI1210)

Μικροσκόπιο (Nikon Eclipse E800)

2.26 Μικροτομογραφία υψηλής Διακριτικής ανάλυσης (μCT analysis)

Η ανάλυση και ο ποσοτικός χαρακτηρισμός της μικρο-αρχιτεκτονικής των μακρών οστών καθώς και του 5ου σπόνδυλου της οσφυικής μοίρας έγινε με την χρήση μικροτομογράφου υψηλής ανάλυσης Skyscan1172 μCT scanner της εταιρίας Brucker-microCT (Βέλγιο) (Εικ.2.24). Η βασική αρχή της μικροτομογραφίας στηρίζεται στην χρήση ακτίνων X με σάρωση ενός αντικειμένου όπου καταγράφεται ο βαθμός απορρόφησης μιας δέσμης ακτίνων X σε έναν καταγραφέα με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η τρισδιάστατη απεικόνιση και μέτρηση της δομής.



Εικόνα 2.24. Απεικόνιση μικροτομογράφου υψηλής διακριτικής ανάλυσης Skyscan1172 μCT scanner (Brucker).

Τα πλεονεκτήματα ενός μικροτομογράφου εστιάζονται στην υψηλή χωρική ανάλυση ενός αντικειμένου που φθάνει στα 5μm, ενώ δεν χρειάζεται καμμία προετοιμασία του δείγματος πριν την σάρωση.

2.26.1 Προετοιμασία Δειγμάτων για Σάρωση

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλαμβάνει την απομόνωση των μακρών οστών και των σπονδύλων της οσφυϊκής μοίρας (L1-6). Ειδικότερα, έγινε εξαγωγή των μακρών οστών από ποντίκια και αφαίρεση των μυών που επιφύονται πάνω στα οστά. Ακολούθως, μεταφέρουμε τα οστά σε γάζα όπου προηγουμένως έχει εμβαπτιστεί σε διάλυμα 0.9% χλωριούχου νατρίου και φυλλάσσονται στους -20⁰C. Την ίδια διαδικασία ακολουθούμε επίσης για την απομόνωση των σπονδύλων της οσφυϊκής μοίρας.

2.26.2 Σάρωση δειγμάτων σε μικροτομογράφο Skyscan1172

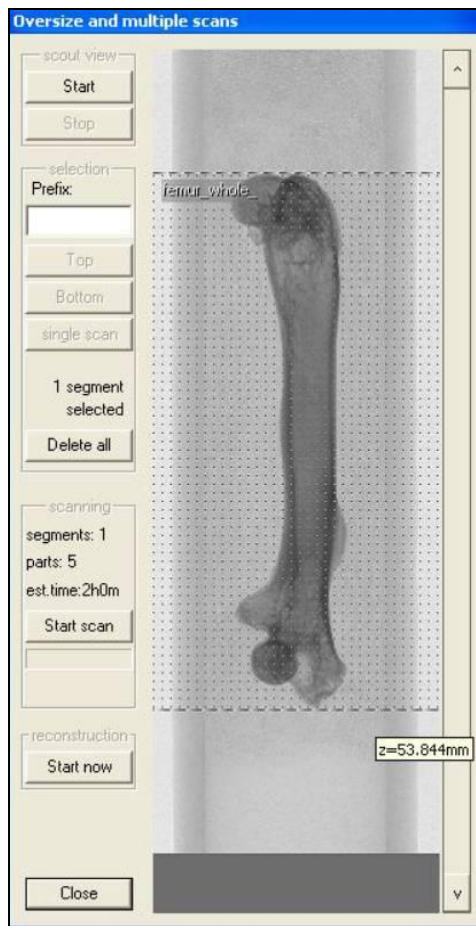
Η σάρωση των δειγμάτων στο Skyscan1172 περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια.

1. Προετοιμασία μηριαίου οστού ή σπόνδυλου της οσφυϊκής μοίρας με εμβάπτιση σε 0.9% χλωριούχου νατρίου και τοποθέτηση σε ειδικούς προσαρμοστές-βάσεις (βλέπε εικ. 2.25).



Εικόνα 2.25. Ειδική βάση τοποθέτησης δείγματος μηριαίου οστού διαμέτρου 6mm, ενώ για τοποθέτηση δείγματος σπονδυλικής στήλης χρησιμοποιούμε βάσεις διαμέτρου 10mm.

2. Ανοίγουμε το πρόγραμμα ελέγχου του μικροτομογράφου και θέτουμε σε λειτουργία την πηγή ακτίνων X.
3. Τοποθετούμε την ειδική βάση με τα δείγματα-οστά στην θέση σάρωσης του μικροτομογράφου.
4. Οριοθετούμε την περιοχή σάρωσης του οστού (βλέπε εικ. 2.26)



Εικόνα 2.26. Απεικόνιση του γραφικού περιβάλλοντος οριοθέτησης της περιοχής σάρωσης ενός δείγματος.

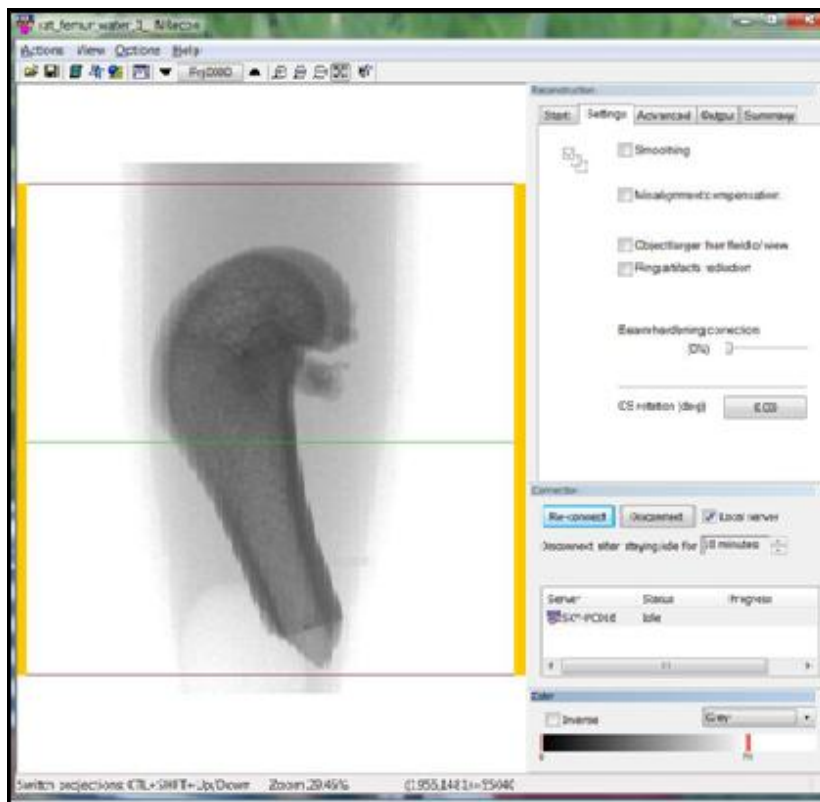
5. Ρυθμίζουμε τις παραμέτρους σάρωσης μέσω του προγράμματος ελέγχου όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Προτεινόμενες ρυθμίσεις σάρωσης	
X-ray voltage	50kV
X-ray current	120uA
Φίλτρο	0.5mm Φίλτρο Αλουμινίου
Image pixel size	6μM
Ανάλυση κάμερας	medium
Περιστροφή τομογράφου	180 ⁰
Βήμα περιστροφής	0.4
Μέσο Πλαίσιο Σάρωσης	2
Διάρκεια Σάρωσης	~30-45min

6. Πατάμε το κουμπί έναρξης σάρωσης.

2.26.3 Ανοικοδόμηση των δεδομένων σάρωσης μέσω του προγράμματος NRecon

Μετά την σάρωση των δειγμάτων το σύστημα αποθηκεύει μια δέσμη εικόνων προβολής σε μορφή tiff όπου μέσω του προγράμματος Nrecon πραγματοποιείται η ανοικοδόμηση των εικόνων-προβολών (βλέπε εικ. 2.27)



Εικόνα 2.27. Απεικόνιση του γραφικού περιβάλλοντος του Nrecon προγράμματος όπου γίνεται η ανοικοδόμηση των εικόνων σάρωσης.

Πριν την ανοικοδόμηση της δέσμης εικόνων σάρωσης γίνεται μια σειρά ρυθμίσεων και ελέγχων όπως η οριοθέτηση της άνω και κάτω περιοχής της προβολής της εικόνας (βλέπε κόκκινη γραμμή εικ.2.27), fine-tuning της εικόνας-προβολής ελέγχοντας τις παραμέτρους post-alignment, beam hardening correction, ring artifacts reduction and smoothing. Η ανοικοδόμηση της δέσμης εικόνων είναι μία διαδικασία που απαιτεί αρκετά μεγάλη επεξεργαστική ισχύ και διαρκεί αρκετά. Το αποτέλεσμα της ανοικοδόμησης των εικόνων είναι η δημιουργία μιας νέας δέσμης εικόνων σε μορφή bmp όπου θα χρησιμοποιηθούν για την κύρια ανάλυση.

2.26.4 Κύρια Ανάλυση Προσδιορισμού των οστικών παραμέτρων του σπογγώδους και φλοιώδους οστού μέσω του προγράμματος CtAn

Η κύρια ανάλυση περιλαμβάνει τον προσδιορισμό διάφορων οστικών παραμέτρων του σπογγώδους και φλοιώδους οστού, η οποία πραγματοποιήθηκε με την χρήση του ειδικού προγράμματος CtAn της Brucker. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι κύριοι οστικοί παράμετροι που υπολογίστηκαν και συμπεριλαμβάνονται στον πίνακα και με βάση την ονοματολογία από την ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research).

A

Parameter	Parameter symbol ¹⁰ , unit
Total (tissue) volume	TV (mm ³)
Bone volume	BV (mm ³)
Percent bone volume	BV/TV (%)
Bone surface	BS (mm ²)
Bone surface to volume ratio	BS/BV (mm ⁻¹)
Bone surface density	BS/TV (mm ⁻¹)
Trabecular thickness	Tb.Th (mm)
Trabecular separation	Tb.Sp (mm)
Trabecular number	Tb.N (mm ⁻¹)
Trabecular pattern factor	Tb.Pf (mm ⁻¹)
Structure model index	SMI
Euler connectivity	E.Con
Euler connectivity density	E.Con.D (mm ⁻³)
Degree of anisotropy	DA

B

Parameter	Parameter symbol, unit
Cortical bone volume	BV (mm ³)
Tissue volume (mm ³) (Total)	TV (mm ³)
Bone marrow volume	BMV (mm ³)
Percent cortical bone volume	BV/TV (%)
Closed Porosity	Po(cl) (%)
Open Porosity	Po(op) (%)

Πίνακας 2.1 Κύριοι οστικοί παράμετροι που προσδιορίζονται για το σπογγώδες (A) και φλοιώδες οστό (B) (ονοματολογία της ASBMR), σε μικροτομογράφο υψηλής ανάλυσης.

2.27 Χρώση λιποκυττάρων του μυελού των οστών με τετροξειδίο του οσμίου και ανάλυση σε μικροτομογράφο υψηλής Ανάλυσης

Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα του τετροξειδίου του οσμίου, το οποίο είναι ένα βαρύ μέταλλο, να καταλύει μια αναγωγική αντίδραση με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα του λιπώδη ιστού σχηματίζοντας έτσι ένα μαύρο προϊόν που αποτελεί κατάλληλο σκιαγραφικό παράγοντα στην μικροτομογραφία (Scheller et al. 2014).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

1. Επιλογή Tg5519 ποντικών ηλικίας 6 μηνών και θανάτωση με CO₂.
2. Εξώθηση των μακρών οστών και απομάκρυνση των μαλακών μυών που επιφύονται του οστού.
3. Μονιμοποίηση των οστών με διάλυμα φορμαλίνης 10% για 24 ώρες.
4. Ξέπλυμα των οστών με νερό βρύσης
5. Απασβεστοποίηση σε διάλυμα EDTA-απασβεστοποίησης για συνολικό διάστημα 2 εβδομάδων.
6. Ξέπλυμα των οστών με νερό βρύσης
7. Επώαση των απασβεστοποιημένων οστών σε διάλυμα τετροξειδίου του οσμίου 1% για 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου
8. Καλό ξέπλυμα των οστών με νερό βρύσης για 2 ώρες
9. Σάρωση του μηριαίου οστού σε μικροτομογράφο με βάση τις προτεινόμενες ρυθμίσεις όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.
10. Ανάλυση των δεδομένων σάρωσης χρησιμοποιώντας τα προγράμματα Nrecon, Ctan και CTvox.

Προτεινόμενες ρυθμίσεις σάρωσης	
X-ray voltage	55kV
X-ray current	120uA
Φίλτρο	0.5mm Φίλτρο Αλουμινίου
Image pixel size	6μM
Ανάλυση κάμερας	medium
Περιστροφή τομογράφου	180 ⁰
Βήμα περιστροφής	0.4
Μέσο Πλαίσιο Σάρωσης	2
Διάρκεια Σάρωσης	~30-45min

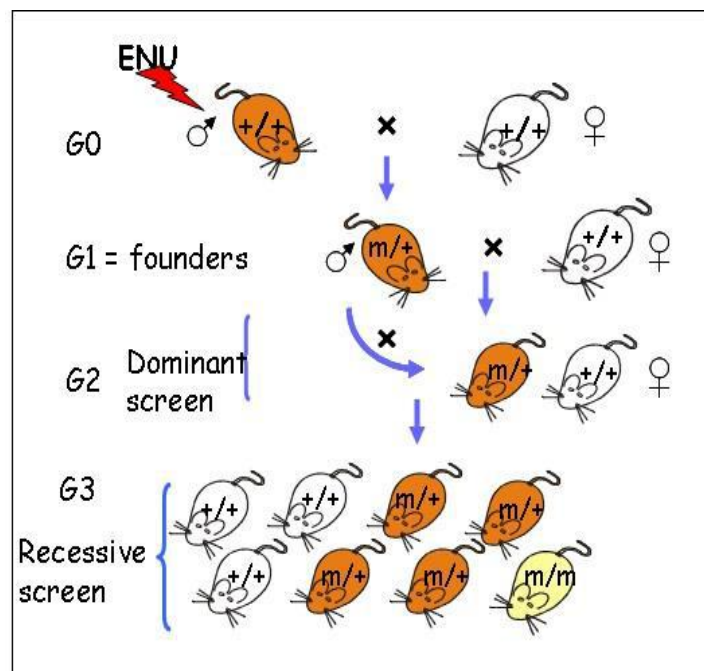
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ 1^ο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ Μέρος 1^ο: Χαρακτηρισμός μιας λειτουργικής μετάλλαξης στην πρωτεΐνη RANKL που προκαλεί οστεοπέτρωση

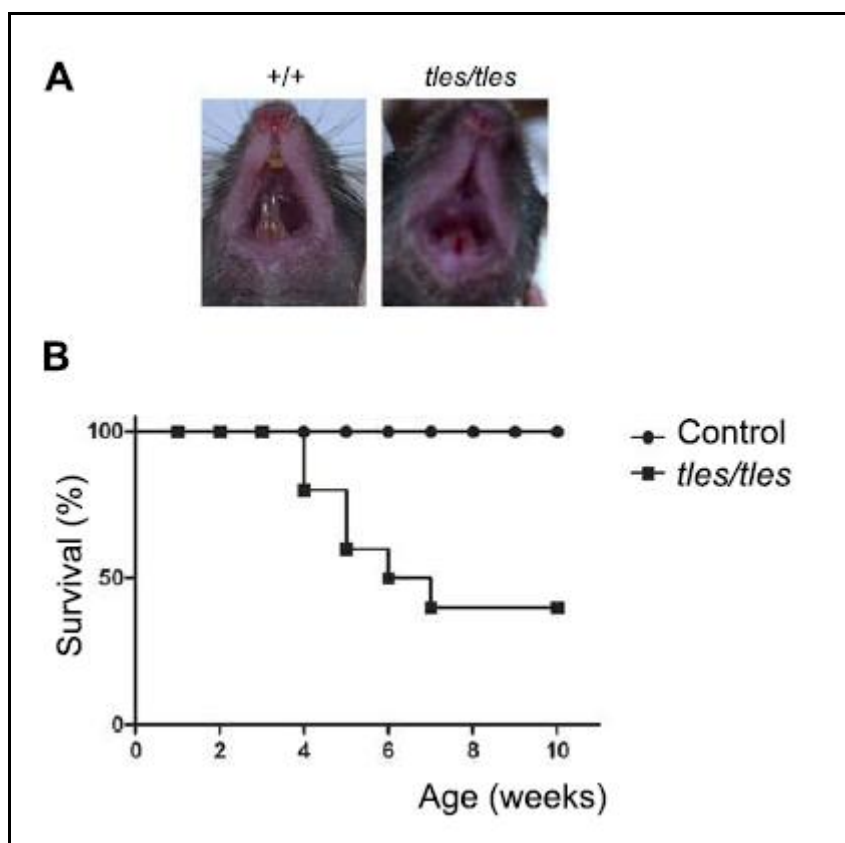
3.1 Δημιουργία και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των *tlcs* ποντικών

Στο παρελθόν πραγματοποιήθηκε από την Δρ Ελένη Ντούνη τυχαία χημική μεταλλαξογένεση στο ποντίκι χρησιμοποιώντας την μεταλλαξογόνο ένωση αιθυλνιτροζουρία (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU) για τη δημιουργία και επιλογή φαινοτύπων που σχετίζονται με το σκελετικό και νευρομυϊκό σύστημα με σκοπό την δημιουργία νέων ζωικών μοντέλων και την εύρεση των υπεύθυνων παθογενετικών μεταλλάξεων. Η αιθυλνιτροζουρία χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε αρσενικά ποντίκια G0 και στη συνέχεια ακολουθώντας ένα σχήμα διασταυρώσεων για την αναγνώριση υπολειπόμενων μεταλλάξεων (Εικ. 3.1), αναγνωρίστηκε ένας νέος φαινότυπος με αδυναμία έκφυσης δοντιών (Εικ. 3.2A) στους απογόνους της G3 γενιάς (Douni et al. 2012) που ονομάστηκε *toothless* (*tlcs*).



Εικόνα 3.1. ENU μεταλλαξογένεση και το πλάνο διασταυρώσεων που ακολουθήθηκε για την αναγνώριση υπολειπόμενων μεταλλάξεων. Οι μεταλλάξεις επάγονται στα αρσενικά ποντίκια της G0 γενιάς. Αρσενικά G1 με υπολειπόμενες μεταλλάξεις ($m/+$) διασταυρώνονται με WT ($+/+$) θηλυκά για να παραληφθούν G2 θηλυκοί απόγονοι, ορισμένοι από τους οποίους είναι ετερόζυγοι ($m/+$) και WT ($+/+$) οι οποίοι στη συνέχεια αναδιασταυρώνονται με τους G1 ετερόζυγους αρσενικούς γονείς, προκειμένου να προκύψουν απόγονοι G3 ($+/+$, $m/+$, m/m) οι οποίοι ελέγχονται για την εμφάνιση υπολειπόμενων φαινοτύπων (recessive screen).

Κλινικά, ο φαινότυπος αυτός χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη ανάπτυξη, υποπλασία του θύμου, σπληνομεγαλία, απουσία λεμφαδένων και πρόωρο θάνατο (Εικόνα 3.2B). Ο χαρακτήρας αυτός κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, ενώ παρουσιάζει πλήρη διεισδυτικότητα και εμφανίζεται εξίσου και στα δύο φύλα. Τα ετερόζυγα ποντίκια (+/*ties*) δεν διαφέρουν από τα άγριου-τύπου (WT) αδέρφια τους.



Εικόνα 3.2. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των οστεοπετρωτικών *ties/ties* ποντικών. (A) Αδυναμία έκφυσης των δοντιών στα *ties/ties* ποντίκια. **(B)** Καμπύλη επιβίωσης κατά Kaplan–Meier των άγριου τύπου, ετερόζυγων +/*ties* και *ties/ties* ποντικών.

Επειδή η αδυναμία έκφυσης δοντιών αποτελεί χαρακτηριστικό εύρημα της οστεοπέτρωσης (Stark & Savarirayan 2009) πραγματοποιήθηκε ιστολογική ανάλυση των μακρών οστών και ειδικότερα του μηριαίου οστού και της κνήμης για να εξεταστεί η μορφολογία των οστών. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν στοιχεία έντονης οστεοπέτρωσης των μακρών οστών λόγω της πλήρους απουσίας των οστεοκλαστών έπειτα από χρώση με όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό (Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) που αποτελεί δείκτης της ενεργότητας των οστεοκλαστών. Ως εκ τούτου παρατηρήθηκε έντονη οστεοποίηση και απουσία

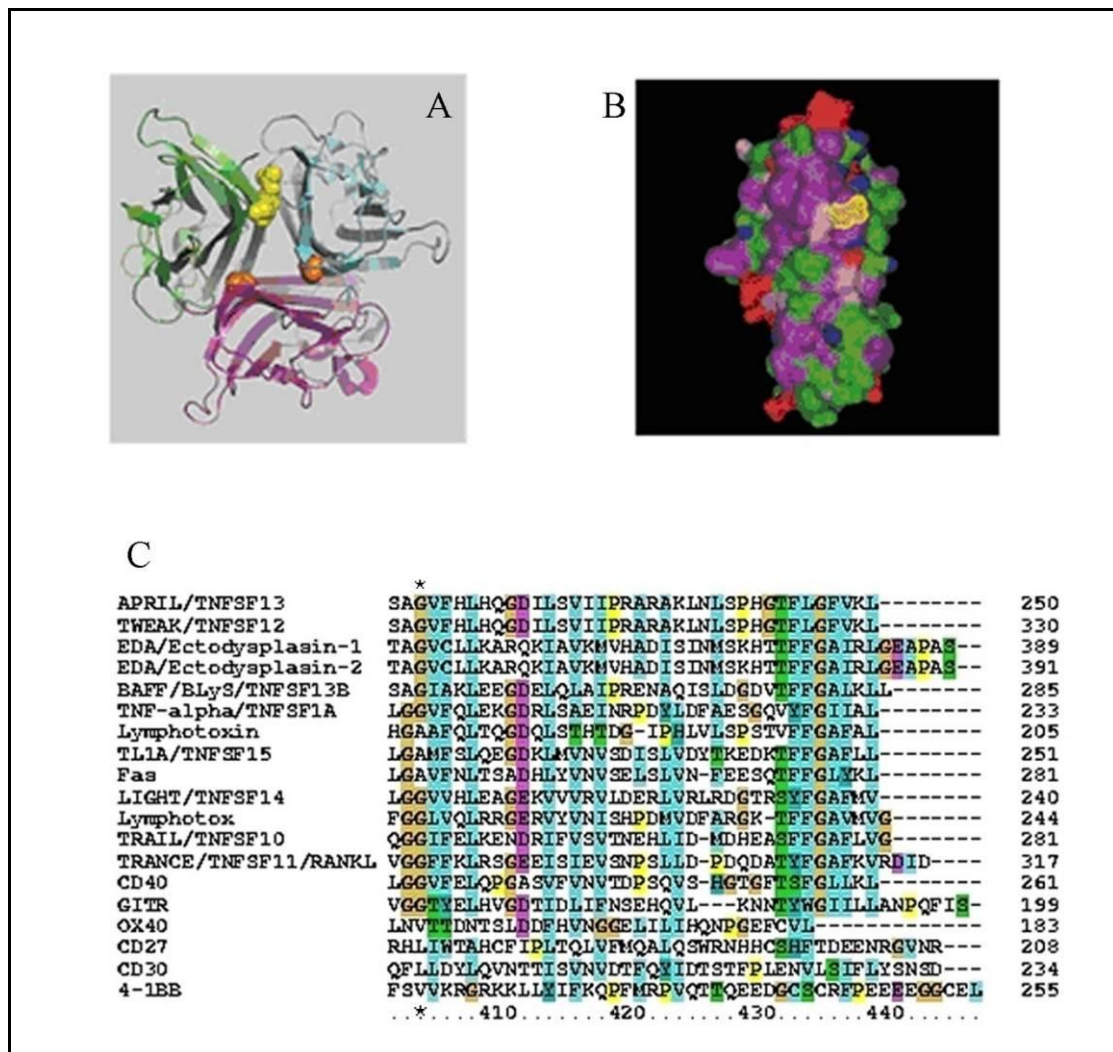
σχηματισμού της κοιλότητας του μυελού των οστών (Douni et al. 2012). Παρά ταύτα, πειράματα επαγωγής σχηματισμού οστεοκλαστών από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών τόσο από άγριου τύπου όσο και *tlcs* ποντίκια έδειξαν επαγωγή οστεοκλαστογένεσης *ex vivo*. Ακολούθως, πειράματα συν-καλλιέργειας οστεοβλαστών προερχόμενων από άγριου τύπου ποντίκια με πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών που απομονώθηκαν από *tlcs* ποντίκια οδήγησαν σε πλήρη σχηματισμό οστεοκλαστών, ενώ συν-καλλιέργειες οστεοβλαστών προερχόμενων από *tlcs* ποντίκια με πρόδρομους οστεοκλάστες από άγριου τύπου ζώα κατέδειξαν αδυναμία επαγωγής σχηματισμού οστεοκλαστών (Douni et al. 2012). Τα παραπάνω *ex vivo* πειράματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει κάποια εγγενής αδυναμία στον σχηματισμό οστεοκλαστών στα *tlcs* ποντίκια αλλά κάποια έλλειψη στην διακυτταρική επικοινωνία μεταξύ των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, δεδομένου ότι οι οστεοβλάστες είναι τα κύτταρα που προάγουν τον σχηματισμό των οστεοκλαστών στα οστά.

3.2 Εύρεση και περιγραφή της μετάλλαξης

Για την χαρτογράφηση της υπεύθυνης μετάλλαξης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση γενετικής σύνδεσης σε 124 F2 ποντίκια (62 με φαινότυπο και 62 μάρτυρες) χρησιμοποιώντας ένα σετ από 71 μοριακούς πολυμορφικούς δείκτες που περιελάμβαναν πολυμορφισμούς μήκους απλής αλληλουχίας (Simple Sequence Length Polymorphisms, SSLPs) και πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) οι οποίοι κάλυπταν ολόκληρο το γονιδίωμα πλην των φυλετικών χρωμοσωμάτων, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο χαρακτήρας ήταν αυτοσωμικός και υπολειπόμενος. Η στατιστική ανάλυση έδωσε τιμή LOD (Logarithm of Odds) 33,8 ανάμεσα στους πολυμορφικούς δείκτες (SNPs) rs13482262 και rs30965774 στο χρωμόσωμα 14. Περαιτέρω ανάλυση της περιοχής για υποψήφια γονίδια υπέδειξε την παρουσία του *rankl* γονιδίου που σχετίζεται με την επαγωγή οστεοπέτρωσης. Με αλληλούχιση της κωδικής περιοχής του εξωνίου 5 του *rankl* γονιδίου εντοπίστηκε μία σημειακή μετάλλαξη και πιο συγκεκριμένα μία αλλαγή βάσης από γουανίνη σε αδενίνη (GenBank NM_011613.3), η οποία οδηγεί σε αμινοξική αλλαγή μιας γλυκίνης σε αργινίνη στην θέση 278 (G278R) της RANKL πρωτεΐνης του ποντικού (NP_035743).

Η αμινοξική αλλαγή G278R εντοπίζεται στην έντονα υδρόφοβη F β-πτυχωτή επιφάνεια του μονομερούς της RANKL πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί μέρος της έσω A'AHCF β-πτυχωτής

επιφάνειας που σχετίζεται με τον τριμερισμό των μονομερών. Η G278R υποκατάσταση θα μπορούσε θεωρητικά να επηρεάζει τον τριμερισμό της RANKL πρωτεΐνης καθώς η εισαγωγή της αργινίνης φαίνεται να οδηγεί σε στερεοδομική παρεμπόδιση διαταράσσοντας την υδρόφοβη δια-επιφάνεια των μονομερών αφού αντικαθιστά τη γλυκίνη, που είναι το απλούστερο αμινοξύ, ενώ παράλληλα εισάγει θετικό φορτίο με μία πιο μεγάλη πλευρική αλυσίδα (Εικ. 3.3A-B). Η RANKL πρωτεΐνη είναι μέλος της TNF υπεροικογένειας και τα περισσότερα μέλη αυτής σχηματίζουν ομο-τριμερή. Πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών της RANKL με άλλα μέλη όπως τον TNF, BAFF, CD40L, TRAIL κατέδειξε υψηλή συντήρηση της γλυκίνης που αντιστοιχεί στη θέση 278 στη RANKL πρωτεΐνη του ποντικού (Εικ. 3.3C)

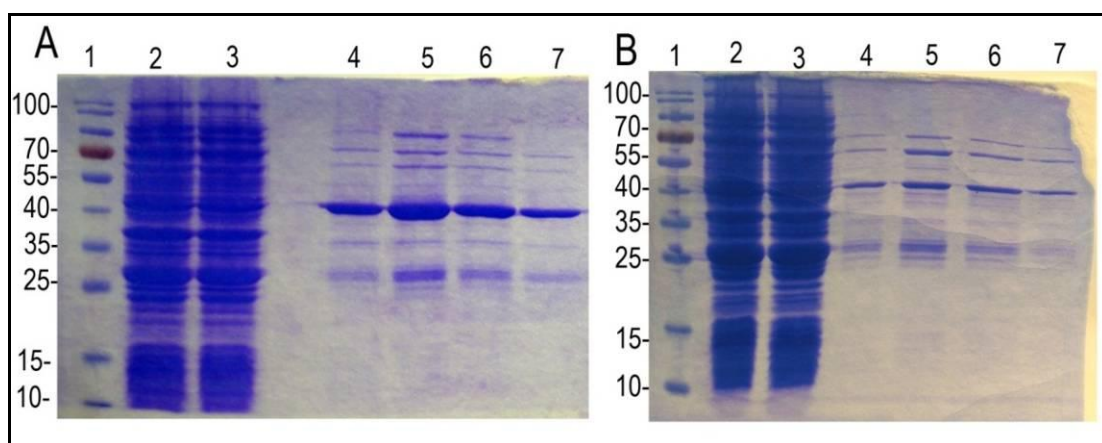


Εικόνα 3.3. Μοντελοποίηση της δομής της μεταλλαγμένης RANKL^{G278R} πρωτεΐνης. (Α) Γραφική απεικόνιση του τριμερούς της RANKL πρωτεΐνης με μοντελοποίηση τύπου ‘κορδέλα’ όπου στον άξονα συμμετρίας του τριμερούς με πορτοκαλί φαίνεται η γλυκίνη 278 του αγρίου τύπου μονομερούς ενώ με κίτρινο η αργινίνη του μεταλλαγμένου μονομερούς. (Β) Μοντελοποίηση τύπου space-filling του αγρίου τύπου

μονομερούς όπου η υποκατάσταση G278R φαίνεται χρωματισμένη με κίτρινο. Με μωβ απεικονίζονται τα υδρόφοβα αμινοξέα, με πράσινο τα πολικά αμινοξέα ενώ τα φορτισμένα αμινοξέα θετικά και αρνητικά με μπλε και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα. (C) Πολλαπλή ευθυγράμμιση της αμινοξικής ακολουθίας που αντιστοιχεί στην εξωκυττάρια F β-πτυχωτή περιοχή της RANKL του ποντικού με άλλα μέλη της υπερικογένειας του TNF. Με αστερίσκο επισημαίνεται το αμινοξύ της γλυκίνης 278 που εμφανίζει υψηλή συντήρηση ανάμεσα στα μέλη της υπερικογένειας του TNF.

3.3 Βιοχημικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός της G278R υποκατάστασης

Δεδομένου ότι η αμινοξική αλλαγή G278R εντοπίζεται στην περιοχή αλληλεπίδρασης των μονομερών θελήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο επηρεάζει την διαμόρφωση της RANKL πρωτεΐνης. Αρχικά, έγινε ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένης GST-RANKL πρωτεΐνης η οποία κωδικοποιεί την εξωκυττάρια περιοχή της RANKL πρωτεΐνης του ποντικού (αμινοξέα: 158-316), τόσο της άγριου τύπου (WT) όσο και της μεταλλαγμένης RANKL^{G278R} σε βακτηριακά στελέχη *E.coli* (βλέπε κεφάλαιο 2.1.1 και 2.1.2) χρησιμοποιώντας το πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P1 που επιτρέπει επαγωγή της έκφρασης έπειτα από χορήγηση IPTG στην βακτηριακή καλλιέργεια. Ακολούθως, έγινε εκλεκτική δέσμευση των GST-RANKL και GST-RANKL^{G278R} πρωτεϊνών του ποντικού σε σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης τα οποία εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με την GST πρωτεΐνη. Τελικώς, με έκλυση γλουταθειόνης, αποδεσμεύθηκαν οι GST-RANKL πρωτεΐνες από τα σφαιρίδια και συλλέχθηκαν οι χιμαιρικές GST-RANKL και GST-RANKL^{G278R} πρωτεΐνες (Εικ. 3.4).

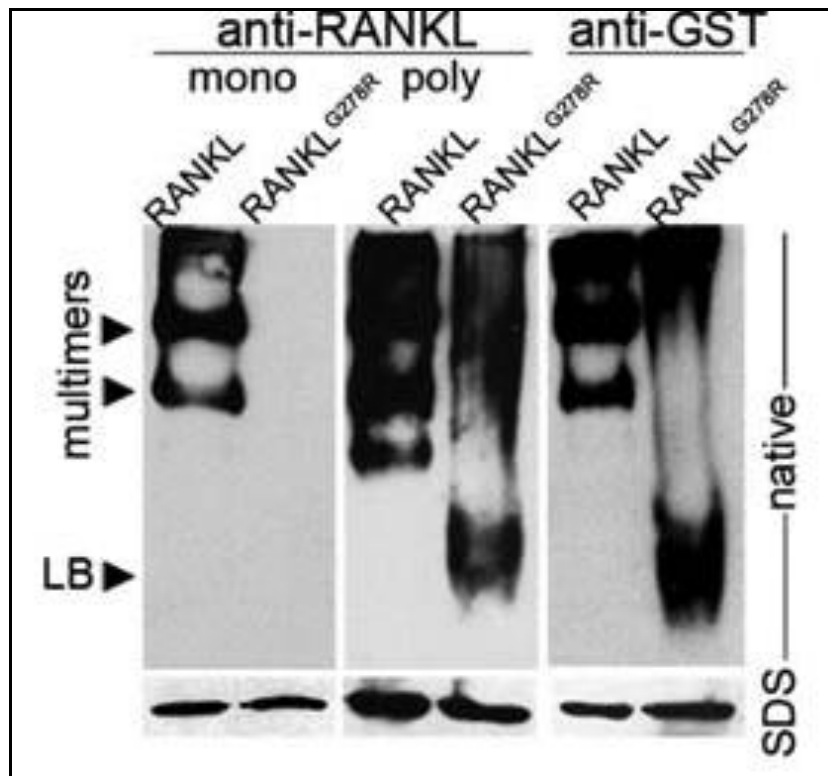


Εικόνα 3.4. Ετερόλογη έκφραση της άγριου τύπου GST-RANKL (A) και της μεταλλαγμένης GST-RANKL^{G278R} (B) πρωτεΐνης του ποντικού. Ηλεκτροφόρηση και χρώση Coomassie blue των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στα διάφορα στάδια απομόνωσης των GST-RANKL πρωτεϊνών. 1) Δείκτης με γνωστά μοριακά

βάρη, 2) Το σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται από το βακτήριο έπειτα από λύση, 3) Οι εναπομείνουσες πρωτεΐνες μετά την σύνδεση της χιμαρικής GST-WT-muRANKL στα σφαιρίδια αγαρόζης-γλουταθειόνης, 4) Τα σφαιρίδια μετά τα διαδοχικά στάδια έκλουσης της GST-WT-muRANKL, 5-7) Διαδοχικά στάδια συλλογής της χιμαρικής GST-RANKL μετά από προσθήκη γλουταθειόνης.

Η GST πρωτεΐνη έχει φανεί ότι δεν επηρεάζει την λειτουργικότητα της RANKL αλλά επιπλέον ενισχύει την δομική σταθερότητα των πρωτεϊνών προωθώντας τον διμερισμό τους (Gräslund et al. 2008). Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε αποδιατακτικά και μη αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης (native gels) και ακολούθησε western blot χρησιμοποιώντας αντισώματα για τον εντοπισμό τόσο της RANKL όσο και της GST. Παρατήθηκε ότι η WT GST-RANKL πρωτεΐνη σχηματίζει πολυμερή (multimers) ενώ αντίθετα η GST-RANKL^{G278R} δεν σχηματίζει τα αναμενόμενα πολυμερή είτε στοχεύοντας την RANKL με μονοκλωνικό και πολυκλωνικό αντίσωμα είτε στοχεύοντας την GST με πολυκλωνικό αντίσωμα σε western blot (Εικ. 3.5). Ειδικότερα, στην μεταλλαγμένη RANKL^{G278R} πρωτεΐνη παρατηρήσαμε μία ζώνη χαμηλού μοριακού βάρους όταν χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της RANKL ή της GST που πιθανότατα αντιστοιχεί σε μονομερή της GST-RANKL^{G278R}.

Αντίθετα, όταν επιχειρήσαμε να εντοπίσουμε την GST-RANKL^{G278R} με μονοκλωνικό anti-RANKL αντίσωμα δεν ανιχνεύσαμε απολύτως τίποτα, το οποίο ίσως να οφείλεται σε πιθανή μεταβολή της τριτοταγούς δομής της RANKL^{G278R} πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την καταστροφή ή την μη πρόσβαση (mask) των συγκεκριμένων επίτοπων που αναγνωρίζονται από το μονοκλωνικό αντίσωμα (Εικ. 3.5). Παράλληλα, ελέγχθησαν οι ποσότητες των ανασυνδυασμένων GST-RANKL και GST-RANKL^{G278R} πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στην προηγούμενη πειραματική διάταξη και σε αποδιατακτικό πηκτώμα ακρυλαμίδιου και western blot με τα αντίστοιχα αντισώματα (Εικ. 3.5) ώστε να δείχθει ότι όντως χρησιμοποιήθηκαν παρόμοιες ποσότητες. Επίσης, το πείραμα αυτό δείχνει ότι όλα τα αντισώματα αναγνωρίζουν και τις δύο πρωτεΐνες, GST-RANKL και GST-RANKL^{G278R} σε αποδιατακτικές συνθήκες, υποδηλώνοντας την ειδικότητά τους προς αυτές.



Εικόνα 3.5. Η μεταλλαγμένη GST-RANKL^{G278R} πρωτεΐνη δεν σχηματίζει πολυμερή (multimers) σε μη αποδιατακτικές συνθήκες σε σχέση με την άγριου τύπου RANKL. Ανασυνδυασμένη άγριου τύπου GST-RANKL και μεταλλαγμένη GST-RANKL^{G278R} αναλύθηκαν είτε σε αποδιατακτικά (SDS) είτε σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμιδίου (native gel) και ακολούθησε western blot χρησιμοποιώντας είτε μονοκλωνικό (mono) ή πολυκλωνικό (poly) anti- RANKL αντίσωμα ή πολυκλωνικό anti- GST αντίσωμα. Με τοξάκια επισημαίνονται τα πολυμερή (multimers) και μια μικρότερου μοριακού βάρους ζώνη (LB) που πιθανόν αντιστοιχεί στα μονομερή.

Σε επόμενο στάδιο, αφού είδαμε ότι η αμινοξική υποκατάσταση επιφέρει πιθανόν δομικές αλλαγές στην GST-RANKL^{G278R} πρωτεΐνη, απομακρύναμε το GST τμήμα και μελετήσαμε τον τριμερισμό της εκκριτικής εξωκυττάριας RANKL^{G278R} πρωτεΐνης. Η πρωτεολυτική απομάκρυνση της GST πρωτεΐνης από την RANKL πρωτεΐνη έγινε υπό την δράση της Prescission πρωτεάσης μιας και στον σχεδιασμό της πλασμιδιακής κατασκευής έκφρασης είχε προβλεφθεί η σχετική αμινοξική ακολουθία αναγνώρισης από το συγκεκριμένο ένζυμο σε θέση μεταξύ των GST και RANKL (Εικ. 3.6). Αφού έγινε δέσμευση της GST-RANKL στα σφαιρίδια γλουταθειόνης έγινε προσθήκη 4units/ml ανασυνδυασμένης Prescission πρωτεάσης όπου μετά από 16 ώρες επώασης παρατηρήσαμε την πλήρη αποκοπή της εκκριτικής RANKL πρωτεΐνης από την GST πρωτεΐνη. Στην συνέχεια έγινε συλλογή της εκκριτικής RANKL πρωτεΐνης για περαιτέρω βιοχημικό χαρακτηρισμό.

Κατά τη διαδικασία απομόνωσης παρατήσαμε ότι ενώ η εκκριτική εξωκυττάρια WT-RANKL πρωτεΐνη παράγεται σε ικανοποιητικές ποσότητες και αποδεσμεύεται κανονικά από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης, η RANKL^{G278R} παράγεται σε πολύ μικρότερες ποσότητες και μεγάλο μέρος της παρέμεινε εγκλωβισμένο στα σφαιρίδια γεγονός που ίσως αποδίδεται στο μεγάλο βαθμό υδροφοβικότητας της RANKL^{G278R} με τον σχηματισμό διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Εικ. 3.7).

GST + εκκριτικού τύπου mouse RANKL(399 AA)-->MW 45kDa

```

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPN
LPYYIDGDVCLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIA
YSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVL
YMDPMCLDA↓PKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHP
KSDLEVLFGQPLGSPPEFGRLEMKPEAQPF AHLTINAASIPSGSHKVTLSWYH
DRGWAKISNMTLSNGKLRVNQDGFYYLYANICFRHHETSGSVPTDYLQLMVYV
VKTSIKIPSSHNLMKGGSTKNW SGNSEFH FYSINVG GFFKLRAGEEISIQVSNPS
LLDPDQDATYFGAFKVQDID
  
```

GST PRESCISSON SITE POLYLINKER MOUSE RANKL

↓ Cleavage site

εκκριτική άγριου τύπου RANKL μετά την πρωτεολυτική πέψη (173aa)->MW 19.25kD

```

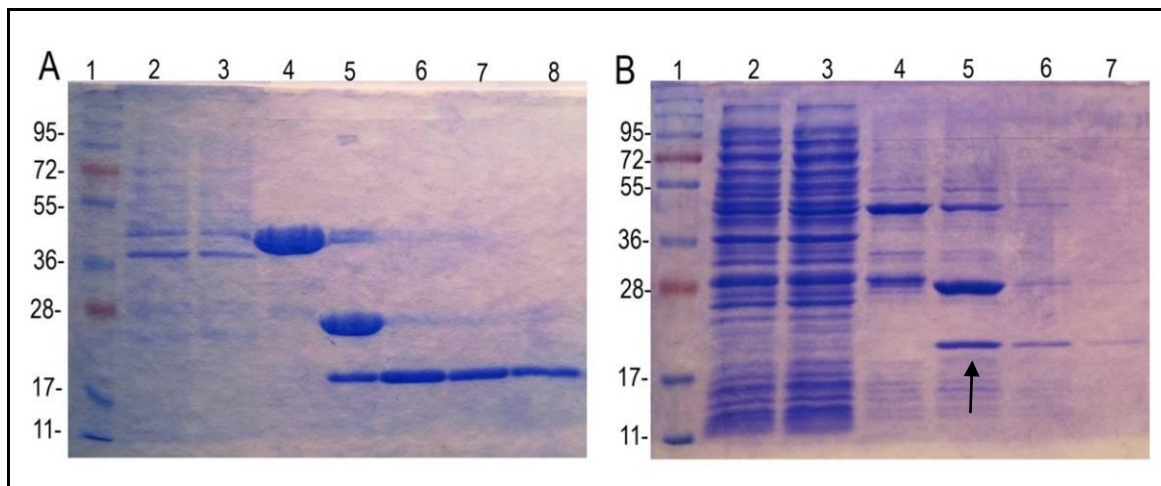
GPLGSPPEFGRLEMKPEAQPF AHLTINAASIPSGSHKVTLSWYHDRGWAKIS
NMTLSNGKLRVNQDGFYYLYANICFRHHETSGSVPTDYLQLMVYVVKTSIKIPS
SHNLMKGGSTKNW SGNSEFH FYSINVG GFFKLRAGEEISIQVSNPSLLDPDQDA
TYFGAFKVQDID
  
```

εκκριτική τύπου mouse RANKL^{G278} μετά την πρωτεολυτική πέψη (173aa)->MW 19.25kD

```

GPLGSPPEFGRLEMKPEAQPF AHLTINAASIPSGSHKVTLSWYHDRGWAKIS
NMTLSNGKLRVNQDGFYYLYANICFRHHETSGSVPTDYLQLMVYVVKTSIKIPS
SHNLMKGGSTKNW SGNSEFH FYSINVG RFFKLRAGEEISIQVSNPSLLDPDQDA
TYFGAFKVQDID
  
```

Εικόνα 3.6. Σχηματική απεικόνιση τόσο της αμινοξικής ακολουθίας της GST-muRANKL όσο και της εκκριτικής άγριου τύπου και μεταλλαγμένης muRANKL πρωτεΐνης. Απελευθέρωση της εκκριτικής muRANKL και muRANKL^{G278R} πρωτεΐνης από την GST μετά από πέψη με την πρωτεάση PreScission. Επάνω φαίνεται η αμινοξική αλληλουχία της χιμαιρικής GST-RANKL πρωτεΐνης που παράγεται από τα βακτήρια. Με πράσινο χρώμα τονίζεται η ακολουθία αναγνώρισης της πρωτεάσης ενώ με το βέλος η θέση αποκοπής. Με κυανό χρώμα τονίζεται η ακολουθίας της εκκριτικής muRANKL και muRANKL^{G278R} (με κόκκινο η θέση της υποκατάστασης G278R) και με κίτρινο η GST πρωτεΐνη. Με μπλε τονίζεται τα εναπομείναντα αμινοξικά κατάλοιπα του πλασμιδιακού φορέα μετά την αποκοπή με την πρωτεάση.

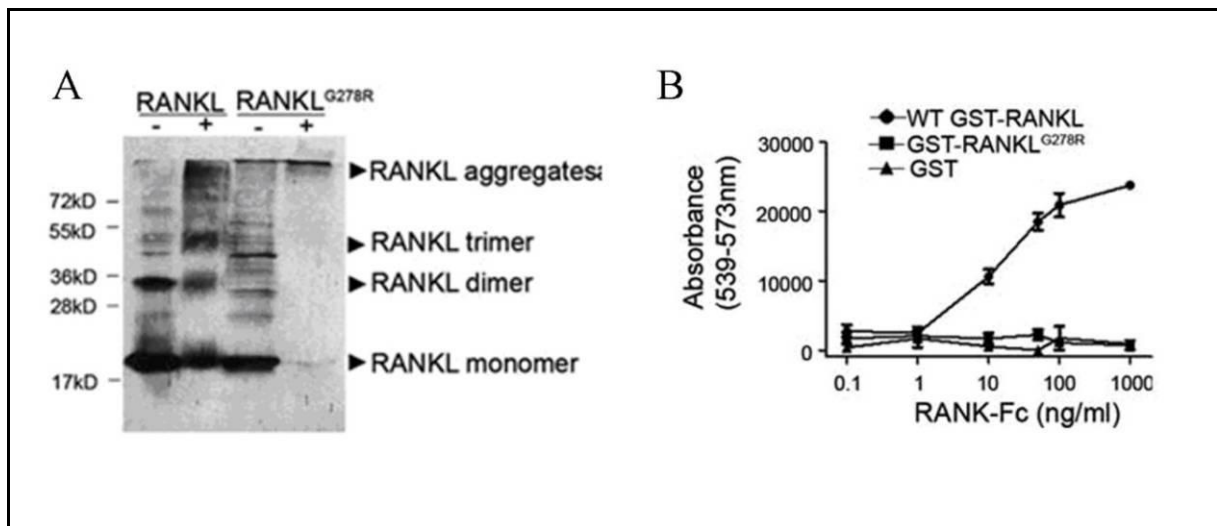


Εικόνα 3.7. Απομόνωση της εκκριτικής άγριου τύπου (A) και μεταλλαγμένης (B) muRANKL πρωτεΐνης έπειτα από απομάκρυνση της GST με πέψη από την πρωτεάση PreScission. (A-B) Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στα διάφορα στάδια απομόνωσης της RANKL πρωτεΐνης. 1) Δείκτης με γνωστά μοριακά βάρη, 2) Το σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται από το βακτήριο, 3) Οι εναπομείνουσες πρωτεΐνες μετά την σύνδεση της χιμαρικής GST-RANKL στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, 4) σφαιρίδια πριν την πέψη με την πρωτεάση PreScission, 5) Τα σφαιρίδια μετά την πέψη με την πρωτεάση PreScission, 6-8) στάδια έκλουσης της εκκριτικής muRANKL πρωτεΐνης (WT ή μεταλλαγμένης), Με τα βέλη επισημαίνεται η muRANKL πρωτεΐνη που παραμένει στα σφαιρίδια αγαρόζης με γλουταθειόνη μετά την πέψη με PreScission.

Για τον έλεγχο του τριμερισμού της RANKL πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διασύνδεσης (cross-linking) μέσω της ένωσης disuccinimidyl suberate (DSS). Το DSS περιέχει έναν εστέρα υδροξυηλεκτριμίδιου (amine-reactive N-hydroxysuccinimide (NHS) ester) ο οποίος αντιδρά με τις αμίνες των αμινοξέων σχηματίζοντας σταθερούς αμιδικούς δεσμούς με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της δομής των πρωτεϊνών και αποτροπή αποδιάταξής τους παρουσία του απορρυπαντικού SDS κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα ακρυλαμίδης. Ακολούθως, αναλύθηκαν ίσες ποσότητες (3μg) της εκκριτικής WT-RANKL και της RANKL^{G278R} που είχαν προεπωαστεί με τον παράγοντα διασύνδεσης DSS (βλέπε κεφ.2.16) σε αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδιου και western blot χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό anti-RANKL αντίσωμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η WT-RANKL όπως αναμένεται σχηματίζει τριμερή, διμερή καθώς και μονομερή (στα αναμενόμενα μοριακά βάρη). Αντίθετα, η RANKL^{G278R} πρωτεΐνη δεν σχηματίζει τριμερή αλλά μόνο λίγα μονομερή και κυρίως ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο μεγάλου μοριακού βάρους (aggregates) που προφανώς οφείλεται στην μη ειδική συγκόλληση των RANKL^{G278R} μονομερών λόγω της έκθεσης υδρόφοβων περιοχών στην επιφάνειά τους που λειτουργούν ως «κόλλα» μεταξύ των πρωτεϊνών (Εικ. 3.8A). Για τον ποσοτικό έλεγχο των ανασυνδυασμένων

RANKL πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αυτά αναλύθηκαν επίσης χωρίς την παρουσία του παράγοντα cross-linker DSS οι ίδιες ποσότητες RANKL ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε αποδιατακτικά πηκτώματα όπου παρατηρήθηκε η παρουσία των αποδιαταγμένων μονομερών (πείραμα μάρτυρας). Τα πειράματα cross-linking μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μεταλλαγμένη RANKL^{G278R} πρωτεΐνη δεν σχηματίζει τριμερή, που αποτελούν την λειτουργική μορφή του μορίου, αλλά κυρίως μη ειδικά συσσωματώματα σε αντίθεση με την WT-RANKL. Η απώλεια τριμερισμού πιθανόν έχει αντίκτυπο στην λειτουργικότητά της αφού αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόσδεσή της στον υποδοχέα RANK (Liu et al. 2010).

Έτσι, θέλοντας να ελέγξουμε κατά πόσο είναι δυνατή η πρόσδεση της RANKL^{G278R} πρωτεΐνης στον υποδοχέα RANK προχωρήσαμε σε δοκιμές της ανοσοενζυμικής μεθόδου ELISA όπου σειριακές αραιώσεις του υποδοχέα RANK-Fc του ποντικού επωάστηκαν με WT GST-RANKL, GST-RANKL^{G278R} και GST. Για τις δοκιμές αυτές χρησιμοποιήθηκε μια υβριδική μορφή του υποδοχέα RANK του ποντικού που περιέχει και τμήμα της σταθερής περιοχής Fc των ανοσοσφαιρινών η οποία επιτρέπει τον διμερισμό του υποδοχέα και επομένως την πρόσδεση της RANKL πρωτεΐνης. Παρατηρήσαμε ότι ενώ η άγριου τύπου GST-RANKL πρωτεΐνη προσδέεται κανονικά στον υποδοχέα RANK-Fc του ποντικού, αντίθετα η GST-RANKL^{G278R} εμφανίζει πλήρη αδυναμία πρόσδεσης, απόρροια όπως φαίνεται της απώλειας τριμερισμού της μεταλλαγμένης GST-RANKL^{G278R} πρωτεΐνης (Εικ.3.8B). Τέλος, δείξαμε ότι η GST πρωτεΐνη δεν αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα RANK-Fc, αποδεικνύοντας ότι η ειδικότητα της πρόσδεσης του GST-RANKL μορίου στον υποδοχέα RANKL-Fc οφείλεται αποκλειστικά στην παρουσία της λειτουργικής RANKL πρωτεΐνης.

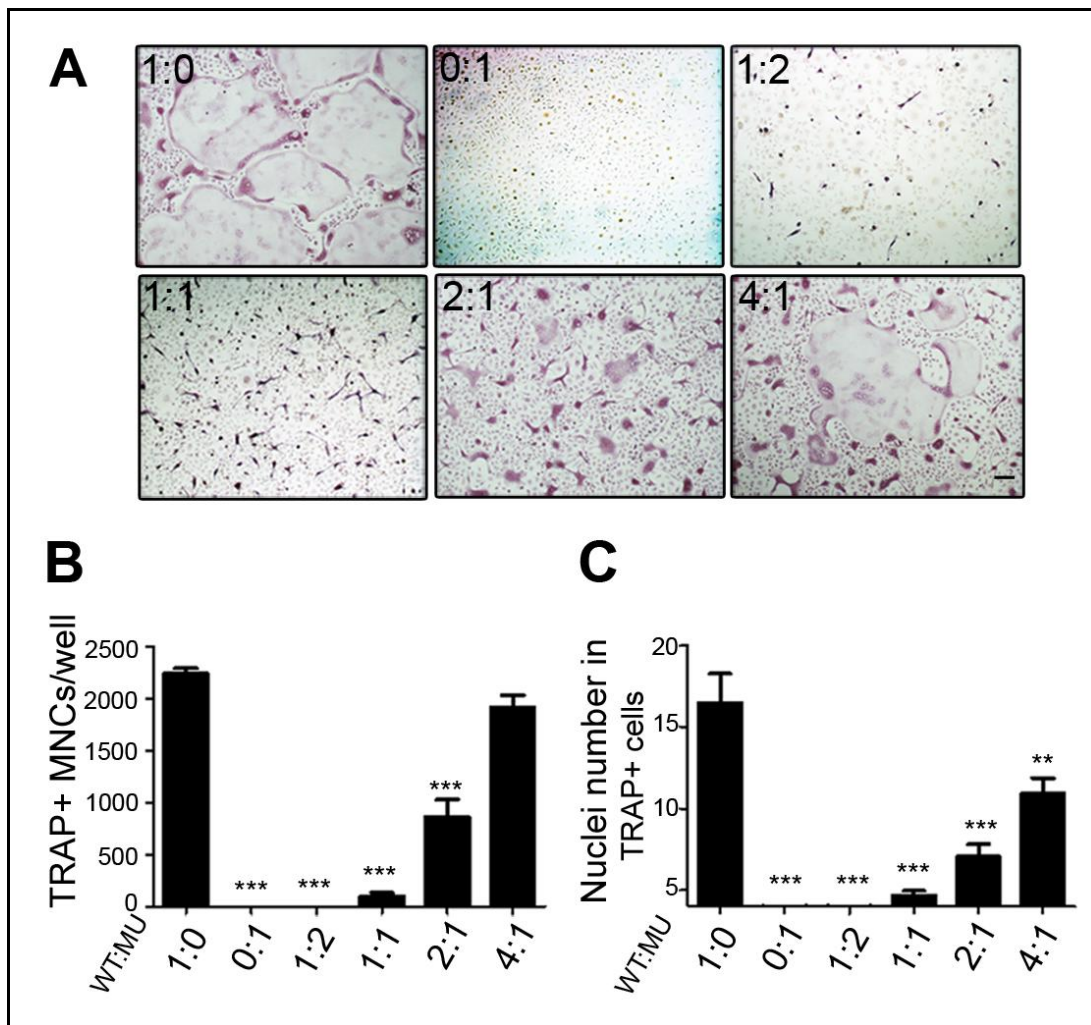


Εικόνα 3.8. Η RANKL^{G278R} πρωτεΐνη δεν σχηματίζει ομο-τριμερή και δεν προσδένεται στον υποδοχέα RANK-Fc. (A) Ίσες ποσότητες (3μg) της άγριου τύπου RANKL πρωτεΐνης και της μεταλλαγμένης RANKL^{G278R} αναλύθηκαν, έπειτα από cross-linking παρουσία (+) ή απουσία (-) του παράγοντα DSS, σε western blot. Η ανοσοανίχνευση έγινε με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της RANKL πρωτεΐνης του ποντικού. Στην αριστερή πλευρά επισημαίνονται γνωστά μοριακά βάρη, ενώ στην δεξιά οι διάφορες μορφές του RANKL όπως τα τριμερή (trimer), διμερή (dimer), μονομερή (monomer) αλλά και τα συσσωματώματα (aggregates). (B) Διάφορες συγκεντρώσεις του υποδοχέα RANK-Fc του ποντικού από 0,1 mg/ml έως 1000ng/ml επώαστηκαν σε πλάκες ELISA όπου πρώτα είχαν επιστρωθεί με 3μg/ml τόσο άγριου τύπου GST-RANKL όσο και μεταλλαγμένης GST-RANKL^{G278R}. Η πρόσδεση ελέγχθηκε με φθορισμό χρησιμοποιώντας δεύτερο φθορίζων αντίσωμα που αναγνωρίζει την Fc περιοχή (PE-goat anti-human IgG). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές ενώ οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (SEM).

3.4 Έλεγχος της λειτουργικότητας της RANKL^{G278R} πρωτεΐνης σε πειράματα οστεοκλαστογένεσης και παρεμποδιστική δράση στην ενεργότητα της RANKL άγριου τύπου

Η επαγωγή σχηματισμού πολυπύρηνων TRAP⁺ οστεοκλαστών αποτελεί μια διαδικασία που ρυθμίζεται άμεσα από την δράση της RANKL πρωτεΐνης. Η πρόσδεση του RANKL στον υποδοχέα RANK σηματοδοτεί μια σειρά γεγονότων που οδηγούν στον σχηματισμό των οστεοκλαστών (Dougall et al. 1999). Καθότι η μεταλλαγμένη RANKL^{G278R} πρωτεΐνη δεν σχηματίζει τριμερή και δεν δύναται να προσδεθεί στον υποδοχέα RANK, ελέγξαμε την λειτουργικότητά της σε κυτταρικές δοκιμές οστεοκλαστογένεσης. Επίσης, διερευνήθηκε εάν η RANKL^{G278R} πρωτεΐνη παρεμποδίζει την δράση της άγριου τύπου RANKL πρωτεΐνης.

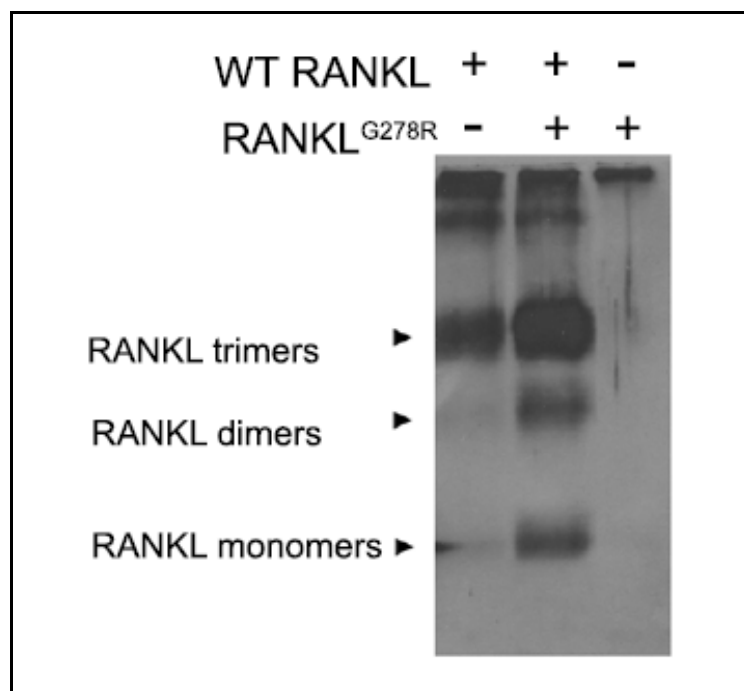
Στη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης πρόδρομοι οστεοκλάστες επωάζονται με RANKL και με την κυτταροκίνη M-CSF, που επάγει την έκφραση του RANK υποδοχέα, για 5 ημέρες όπου γίνεται χρώση με όξινη φωσφατάση ανθεκτική στο τρυγικό (TRAP). Οι ώριμοι οστεοκλάστες είναι θετικοί για τη χρώση TRAP και έχουν τουλάχιστον 3 πυρήνες. Έτσι πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών διαφοροποιήθηκαν σε οστεοκλάστες προσθέτοντας στο θρεπτικό μέσο 25 ng/ml M-CSF και 50 ng/ml GST-RANKL για διάστημα 5 ημερών παρουσία ή απουσία στο μέσο διαφοροποίησης της μεταλλαγμένης GST-RANKL^{G278R} σε διάφορες συγκεντρώσεις από 12.5 μέχρι 100 ng/ml. Παρατηρήσαμε ότι παρουσία μόνο της άγριου τύπου GST-RANKL (1:0) στο μέσο διαφοροποίησης επάγεται ο σχηματισμός ευμεγέθων πολυπύρηνων οστεοκλαστών ενώ αντίθετα όταν προστέθηκε μόνο η μεταλλαγμένη GST-RANKL^{G278R} (0:1) στο μέσο διαφοροποίησης δεν παρατηρήθηκε οστεοκλαστογένεση (Εικ. 3.9A). Όταν έγινε προεπάση της άγριου τύπου GST-RANKL με την μεταλλαγμένη GST-RANKL^{G278R} διαπιστώθηκε παρεμπόδιση στην οστεοκλαστογένεση. Συγκεκριμένα, όταν η αναλογία GST-RANKL: GST-RANKL^{G278R} είναι 1:1 ή 1:2 παρατηρήθηκε σημαντική παρεμπόδιση της οστεοκλαστογένεσης με σχηματισμό μόνο μικρών TRAP⁺ κυττάρων τόσο σε απόλυτο αριθμό κυττάρων όσο και αριθμό πυρήνων σε σχέση με τους οστεοκλάστες που προήλθαν παρουσία μόνο της άγριου τύπου GST-RANKL (Εικ. 3.9A-C). Σε περίσσεια WT GST-RANKL όπου η αναλογία είναι 4:1 ή και υψηλότερα δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αναστολή στην διαδικασία επαγωγής οστεοκλαστών (Εικ. 3.9A-C). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η GST-RANKL^{G278R} έχει απωλέσει την βιολογική της δράση και την ικανότητα να επάγει τον σχηματισμό οστεοκλαστών σε *ex vivo* δοκιμές και η παρουσία της στο μέσο διαφοροποίησης ασκεί έντονη παρεμποδιστική επίδραση στην ικανότητα της WT GST-RANKL να επάγει τον σχηματισμό οστεοκλαστών.



Εικόνα 3.9. Παρεμποδιστική δράση της GST-RANKL^{G278R} στην επαγωγή σχηματισμού οστεοκλαστών. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από καλλιέργειες οστεοκλαστών έπειτα από TRAP χρώση όπου έγινε διαφοροποίηση κυττάρων του μυελού των οστών προσθέτοντας M-CSF και GST-RANKL απουσία (1:0) ή παρουσία GST-RANKL^{G278R} σε διάφορες συγκεντρώσεις όπως 100 ng/ml (1:2), 50ng/ml (1:1), 25ng/ml (2:1) και 12.5ng/ml (4:1). (B) Αριθμός θετικών κατά χρώση TRAP οστεοκλαστών με τουλάχιστον 3 πυρήνες. (C) Αριθμός πυρήνων σε κύτταρα θετικά κατά χρώση TRAP. Οι πειραματικές τιμές είναι οι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, (**P<0.001, ***P<0.0001).

Θέλοντας να δώσουμε μια ερμηνεία στο φαινόμενο της παρεμποδιστικής επίδρασης που ασκεί η μεταλλαγμένη RANKL^{G278R} στην οστεοκλαστογενετική δράση της άγριου τύπου WT RANKL, προχωρήσαμε με βιοχημική προσέγγιση στην ανάλυση μίας δυνητικά πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ της WT RANKL και της RANKL^{G278R} πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, σε πειράματα cross-linking ισομοριακές ποσότητες της εκκριτικής άγριου

τύπου RANKL και της μεταλλαγμένης RANKL^{G278R} (100ng) προεπεώστηκαν για 1 ώρα και ακολούθως προσθέσαμε τον παράγοντα cross-linking DSS όπου και αναλύθηκαν σε αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμιδίου και ακολούθως έγινε εντοπισμός με western blot. Παρατηρήσαμε ότι το σύμπλοκο RANKL-RANKL^{G278R} εμφανίζει σημαντική αύξηση της έντασης στις ζώνες που αντιστοιχεί στα τριμερή, διμερή και μονομερή σε σχέση με την WT RANKL (Εικ. 3.10A), στοιχείο που μας υποδηλώνει πιθανή αλληλεπίδραση της RANKL^{G278R} με την άγριου τύπου RANKL και τον σχηματισμό ετεροτριμερών (2WT:1 RANKL^{G278R}). Τα βιοχημικά δεδομένα έρχονται σε πλήρη συμφωνία με πειράματα ανοσοκαθίζησης μεταξύ WT-RANKL και RANKL^{G278R} πρωτεΐνης έπειτα από ταυτόχρονη υπερέκφρασή τους σε ευκαρυωτικά κύτταρα HEK 293FT χρησιμοποιώντας πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της WT-RANKL-FLAG με WT-RANKL-Myc ή RANKL^{G278R}-Myc. Ανοσοκαθίζηση της WT-RANKL-Myc ή της RANKL^{G278R}-Myc πρωτεΐνης με Myc αντίσωμα έδειξε ότι συν-ανοσοκαθίζάνει η WT-RANKL-FLAG και στις δύο περιπτώσεις, στοιχείο που φανερώνει αλληλεπίδραση της WT-RANKL με την RANKL^{G278R} πρωτεΐνη (Douni et al. 2012)

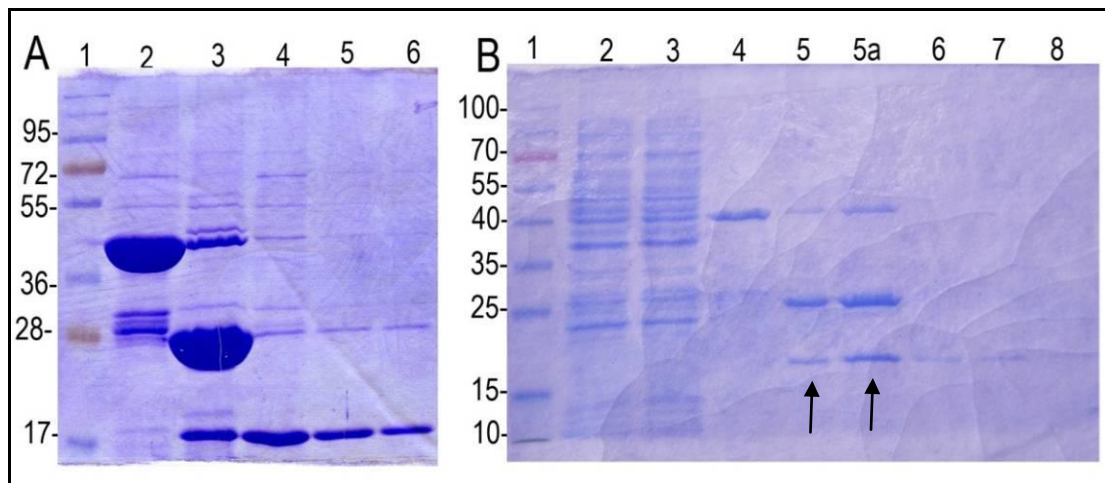


Εικόνα 3.10. Ισομοριακές ποσότητες της εκκριτικής WT RANKL and RANKL^{G278R} αλληλεπιδρούν μεταξύ τους αυξάνοντας τα τριμερή, διμερή και μονομερή. (A) Ίσες ποσότητες WT RANKL και RANKL^{G278R} προεπεώστηκαν για 1 ώρα στους 37⁰C και στη συνέχεια έγινε cross-linking με DSS όπου αναλύθηκαν σε 12% SDS και εντοπισμός με αντί-RANKL πολυκλωνικό αντίσωμα.

3.5 Παρόμοια αμινοξική αντικατάσταση σε άλλα μέλη της TNF υπεροικογένειας οδηγεί σε απώλεια τριμερισμού και λειτουργικότητας

Η γλυκίνη στη θέση 278 (G278) της RANKL πρωτεΐνης του ποντικού, που έχει αντικατασταθεί από αργινίνη στα *tlcs* ποντίκια, εμφανίζει υψηλή συντηρητικότητα ανάμεσα σε διάφορα μέλη της υπεροικογένειας του TNF (Εικ. 3.3C) όπως τον TNF, BAFF, CD40L, TRAIL και άλλα. Έτσι, επιλέξαμε να μελετήσουμε το αποτέλεσμα μιας αντίστοιχης αντικατάστασης της γλυκίνης από αργινίνη σε δύο σημαντικά μέλη της TNF υπεροικογένειας, τις πρωτεΐνες TNF και BAFF του ανθρώπου που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ενώ η απορύθμισή τους σχετίζεται με την παθολόγηση αυτοάνοσων νοσημάτων (Douni et al. 2007; Davidson 2009; Nashi E, Wang Y 2010; Davidson 2011). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες, όπως και ο RANKL, παράγονται ως μια διαμεμβρανική μορφή από την οποία προκύπτει η εκκριτική μορφή συνήθως με πρωτεολυτική αποκοπή. Η εκκριτική μορφή περιλαμβάνει την εξωκυτταρική περιοχή η οποία τριμερίζεται και προσδένεται στον υποδοχέα γι' αυτό και επιλέγεται για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών αυτών.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του TNF υποκλωνοποιήθηκε η εκκριτική μορφή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 77-233 και έγινε αντικατάσταση της γλυκίνης από αργινίνη στη θέση 122 (G122R) της εκκριτικής μορφής (ή G198R στην διαμεμβρανική πρωτεΐνη) με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές σε αντιδράσεις PCR. Ακολούθησε υποκλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1 που περιέχει την GST πρωτεΐνη όπου έγινε ετερόλογη έκφραση τόσο του άγριου τύπου GST-TNF όσο και του μεταλλαγμένου GST-TNF^{G122R} και στη συνέχεια με πρωτεάση PreScission, απομονώθηκε μόνο η εκκριτική TNF πρωτεΐνη (Εικ. 3.11). Και σε αυτή την περίπτωση η απελευθέρωση της εκκριτικής TNF^{G122R} πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια γλουταθειόνης είναι περιορισμένη αφού η μεγαλύτερη ποσότητα παραμένει εγλωβισμένη στη γλουταθειόνη πιθανόν λόγω της αυξημένης υδροφοβικότητας των μονομερών (Εικ. 3.11).



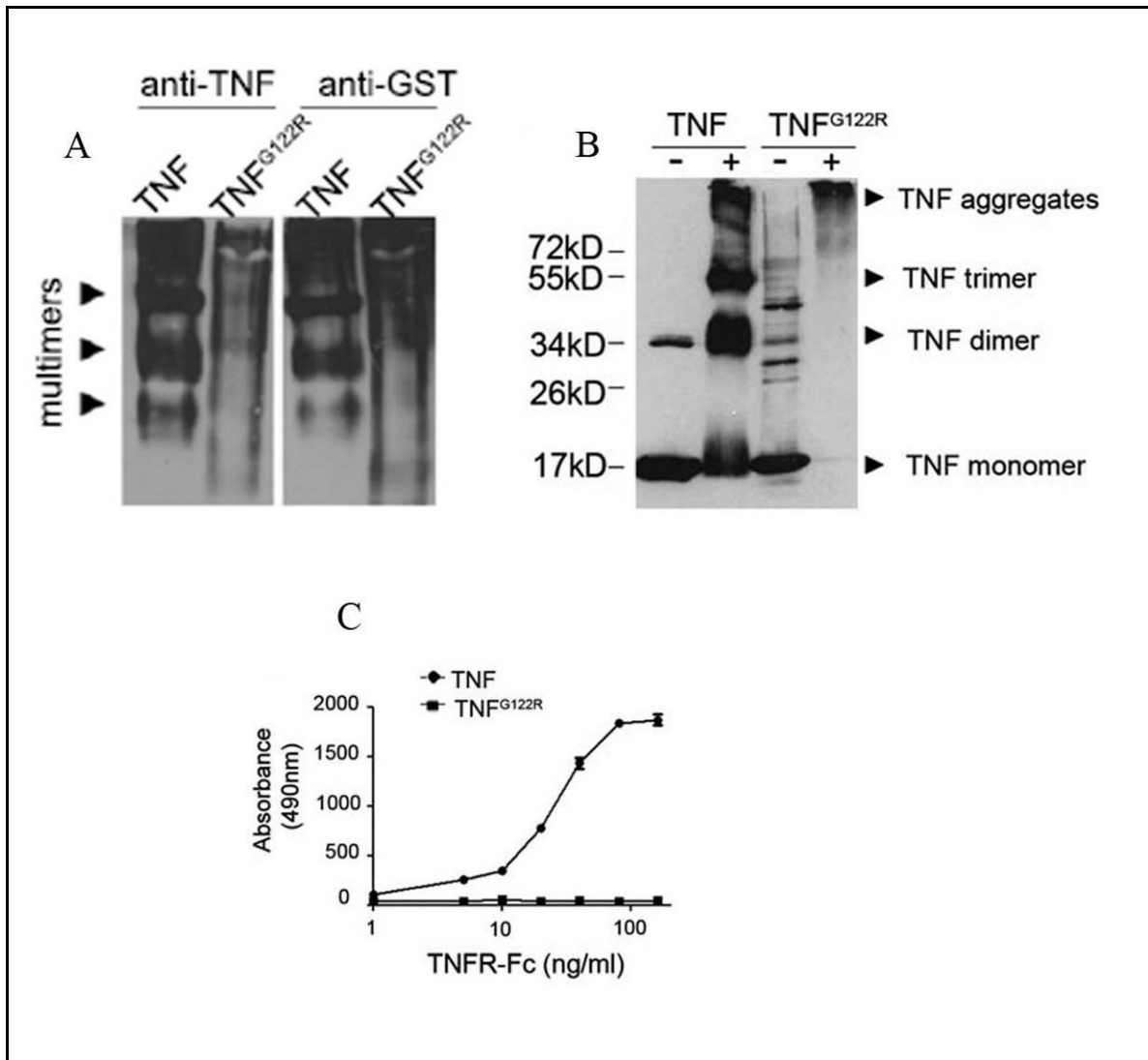
Εικόνα 3.11. Ετερόλογη έκφραση της χμιαρικής άγριου τύπου και μεταλλαγμένης huTNF πρωτεΐνης και απόμάκρυνση της GST μετά από πέψη με την πρωτεάση PreScission. (A) Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στα διάφορα στάδια απομόνωσης της εκκριτικής άγριου τύπου TNF πρωτεΐνης. 1) Δείκτης με γνωστά μοριακά βάρη, 2) WT GST-TNF προσκολλημένη σε σφαιρίδια γλουταθειόνης πριν την πέψη με την πρωτεάση PreScission, 3) Τα σφαιρίδια μετά την πέψη με την πρωτεάση PreScission, 4-6) Στάδια έκλουσης της εκκριτικής WT TNF πρωτεΐνης. **(B)** Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στα διάφορα στάδια απομόνωσης της εκκριτικής TNF^{G122R} πρωτεΐνης. 1) Δείκτης με γνωστά μοριακά βάρη, 2) Το σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται από το βακτήριο, 3) Οι εναπομείνουσες πρωτεΐνες μετά την σύνδεση της χμιαρικής GST-TNF^{G122R} στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, 4) Σφαιρίδια πριν την πέψη με την πρωτεάση PreScission, 5-5a) Τα σφαιρίδια μετά την πέψη με την πρωτεάση PreScission, 6-8) Στάδια έκλουσης της εκκριτικής TNF^{G122R} πρωτεΐνης. Με τα βέλη επισημαίνεται η TNF^{G122R} πρωτεΐνη που παραμένει στα σφαιρίδια γλουταθειόνης μετά την πέψη με PreScission.

Για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό τους, ίσες ποσότητες (4μg) των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, άγριου τύπου GST-TNF και GST-TNF^{G122R}, αναλύθηκαν σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμιδίου (native gel) και ακολούθησε western blot με πολυκλωνικό αντι-TNF αντίσωμα. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι η GST-TNF^{G122R} πρωτεΐνη δεν σχηματίζει πολυμερή σε αντίθεση με την άγριου τύπου GST-TNF, στοχεύοντας τόσο με πολυκλωνικό αντί-TNF αντίσωμα όσο και αντί-GST αντίσωμα. Φαίνεται μάλλον ότι η GST-TNF^{G122R} σχηματίζει τυχαία πρωτεϊνικά σύμπλοκα μεγάλου μοριακού βάρους λόγω της υψηλής υδροφοβικότητας που προκαλεί η G122R υποκατάσταση (Εικ. 3.12A).

Η δομική αλλαγή που εμφανίζει η GST-TNF^{G122R} επιβεβαιώθηκε με πειράματα cross-linking χρησιμοποιώντας την εκκριτική WT-TNF πρωτεΐνη όσο και την μεταλλαγμένη TNF^{G122R} που προέκυψαν ύστερα από πρωτεολυτική απόμάκρυνση της GST. Παρατηρήσαμε ότι ο TNF^{G122R} δεν σχηματίζει τριμερή, διμερή ή μονομερή όπως ο WT TNF αλλά κυρίως

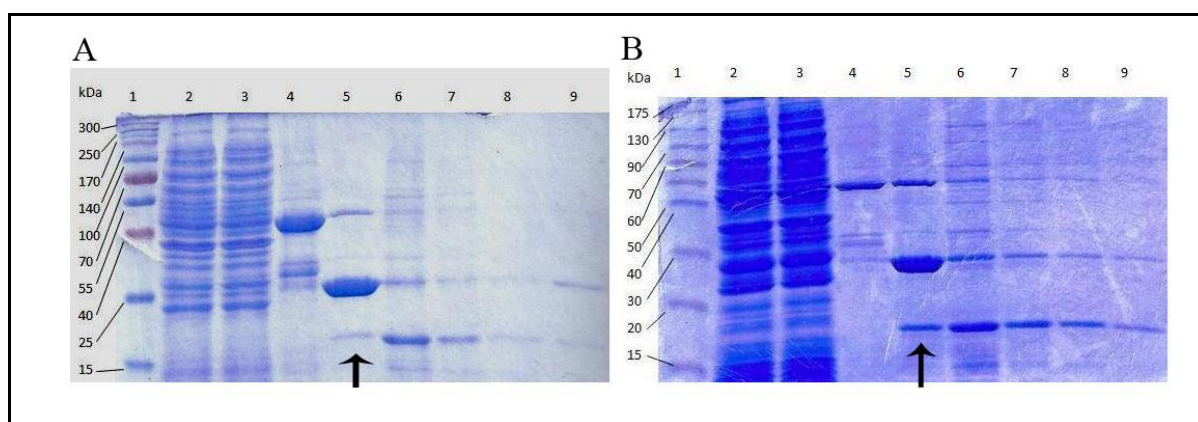
παρουσιάζει συσσώρευση μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνικών συμπλόκων, αποτέλεσμα της υψηλής υδροφοβικότητας των TNF^{G122R} μονομερών (Εικ. 3.12.B).

Ο TNF^{G122R} αξιολογήθηκε περαιτέρω στην ικανότητα πρόσδεσής του στον υποδοχέα του p75TNFR. Για τις δοκιμές αυτές χρησιμοποιήθηκε επίσης μια υβριδική μορφή του υποδοχέα p75TNFR που περιέχει και τμήμα της σταθερής περιοχής Fc των ανοσοσφαιρινών η οποία επιτρέπει τον διμερισμό του υποδοχέα και επομένως την πρόσδεση του TNF. Διαφορετικές συγκεντρώσεις του υποδοχέα p75TNFR-Fc από 1ng/ml έως 160ng/ml επώαστηκαν σε πλάκες ELISA όπου πρώτα είχαν επιστρωθεί με άγριου τύπου TNF ή TNF^{G122R} συγκέντρωσης 3μg/ml. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι ο TNF^{G122R} δεν μπορεί να προσδεθεί στον υποδοχέα p75TNFR-Fc σε αντίθεση με τον WT-TNF ο οποίος προσδένεται στον p75TNFR-Fc συναρτήσει της ποσότητάς του (Εικ. 3.12C). Συμπερασματικά, παρατηρούμε ότι η αντικατάσταση της γλυκίνης από αργινίνη στην θέση 122 (G122R) της εκκριτικής TNF πρωτεΐνης οδηγεί επίσης σε αποσταθεροποίηση της τριτοταγούς δομής και απώλεια τριμερισμού με αποτέλεσμα την αδυναμία πρόσδεσης στον υποδοχέα p75TNFR.



Εικόνα 3.12. Η υποκατάσταση G122R προκαλεί απώλεια τριμερισμού του TNF και μη πρόσδεσή του στον υποδοχέα του. **(A)** Ίσες ποσότητες ανασυνδυασμένων WT GST-TNF και GST-TNF^{G122R} πρωτεϊνών αναλύθηκαν σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμίδης (native gel), και ακολούθησε western blot με πολυκλωνικά αντί-TNF και αντί-GST αντισώματα. Με τοξάκια επισημαίνονται τα πολυμερή (multimers) των WT GST-TNF πρωτεϊνών. **(B)** Σε ίσες ποσότητες (1,5μg) WT-TNF και TNF^{G122R} πραγματοποιήθηκε cross-linking παρουσία (+) ή απουσία DSS (-) και western blot με πολυκλωνικό αντί-TNF αντίσωμα. Στην αριστερή πλευρά επισημαίνονται γνωστά μοριακά βάρη, ενώ στην δεξιά οι διάφορες μορφές του TNF όπως τα τριμερή (trimer), διμερή (dimer), μονομερή (monomer) αλλά και τα συσσωματώματα (aggregates). **(C)** Διαφορετικές συγκεντρώσεις του υποδοχέα p75TNFR-Fc από 1ng/ml έως 160ng/ml επώαστηκαν σε πλάκες ELISA όπου πρώτα είχαν επιστρωθεί με άγριου τύπου TNF ή TNF^{G122R} 3μg/ml. Η πρόσδεση ελέγχθηκε φωτομετρικά χρησιμοποιώντας δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει την Fc περιοχή (HRP-goat anti-human IgG). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές ενώ οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (SEM).

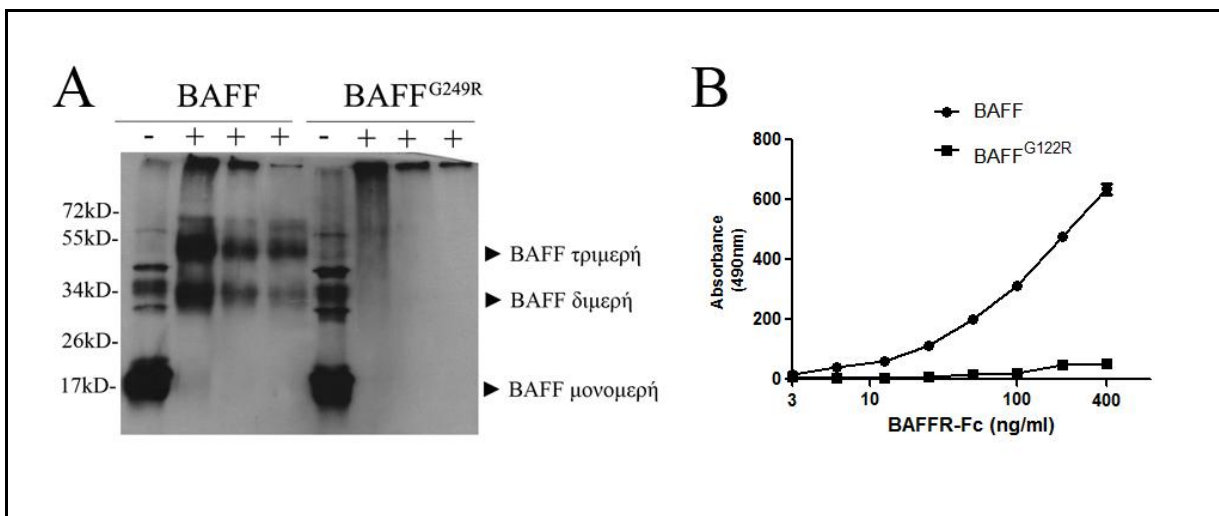
Παρόμοια πειραματική προσέγγιση ακολουθήθηκε για την μελέτη ενός άλλου μέλους της TNF υπερικογένειας, την πρωτεΐνη BAFF. Αρχικά, προχωρήσαμε στην υποκλωνοποίηση της εκκριτικής μορφής του BAFF που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 134-285 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση της γλυκίνης από αργινίνη στη θέση 249 (G249R) της εξωκυτταρικής περιοχής του BAFF με κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές σε αντιδράσεις PCR. Στη συνέχεια έγινε υποκλωνοποίηση στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P1 για ετερόλογη έκφραση της άγριου τύπου GST-BAFF και της GST-BAFF^{G249R} πρωτεΐνης. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε πρωτεολυτική πέψη των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με αποδέσμευση των εκκριτικών πρωτεϊνών WT BAFF και BAFF^{G249R} (Εικ.3.13).



Εικόνα 3.13. Ετερόλογη έκφραση της χιμαιρικής άγριου τύπου (A) και μεταλλαγμένης BAFF (B) πρωτεΐνης και απομάκρυνση της GST μετά από πέψη με την πρωτεάση PreScission. Ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στα διάφορα στάδια απομόνωσης της εκκριτικής BAFF πρωτεΐνης 1) Δείκτης με γνωστά μοριακά βάρη, 2) Το σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται από το βακτήριο, 3) Οι εναπομείνουσες πρωτεΐνες μετά την σύνδεση της χιμαιρικής GST-BAFF στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, 4) σφαιρίδια πριν την πέψη με την πρωτεάση PreScission, 5) Τα σφαιρίδια μετά την πέψη με την πρωτεάση PreScission, 6-9) στάδια έκλυσης της εκκριτικής BAFF πρωτεΐνης (WT ή μεταλλαγμένης). Με τα βέλη επισημαίνεται η BAFF πρωτεΐνης που παραμένει στα σφαιρίδια γλουταθειόνης μετά την πέψη με PreScission.

Σε πειράματα cross-linking, αναλύθηκαν ίσες ποσότητες των εκκριτικών πρωτεϊνών WT BAFF και BAFF^{G249R} σε western blot όπου παρατηρήθηκε ότι ενώ η WT BAFF πρωτεΐνη σχηματίζει τριμερή, διμερή ή μονομερή, αντίθετα στη μεταλλαγμένη BAFF^{G249R} δεν σχηματίζονται τριμερή αλλά ανιχνεύονται μόνο μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνικά σύμπλοκα (aggregates). Επιπλέον, με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA διαπιστώσαμε ότι η BAFF^{G249R} πρωτεΐνη αδυνατεί να προσδεθεί στον υποδοχέα BAFFR-Fc. Συμπερασματικά, η

μεταλλαγμένη BAFF^{G249R} ακολουθεί και επαληθεύει τον ίδιο μηχανισμό, που παρατηρήσαμε με τις δύο παραπάνω πρωτεΐνες RANKL και TNF. Συνεπώς, η γλυκίνη 278 της RANKL πρωτεΐνης του ποντικού φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικότατο αμινοξύ για την λειτουργία της πρωτεΐνης και η αντικατάστασή της από αργινίνη οδηγεί σε απώλεια της λειτουργικότητας όχι μόνο του RANKL αλλά και άλλων μελών της TNF υπερικογένειας όπως του TNF και του BAFF. Επομένως, η γλυκίνη αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον σχεδιασμό νέων αναστολέων που στοχεύουν την περιοχή αλληλεπίδρασης των μονομερών σε RANKL, TNF και BAFF.



Εικόνα 3.14 Η υποκατάσταση G249R προκαλεί απώλεια τριμερισμού και μη πρόσδεση του BAFF στον υποδοχέα του. (Α) Ποσότητες 1,15μg, 0,75μg και 0,28μg της εκκριτικής WT-BAFF και BAFF^{G249R} αντίστοιχα, αναλύθηκαν με cross-linking παρουσία DSS (+) ή παρουσία μάρτυρα με PBS(-) και ακολούθησε ανοσοεντοπισμός με πολυκλωνικό αντί-BAFF αντίσωμα. **(Β)** Διαφορετικές συγκεντρώσεις του υποδοχέα BAFFR-Fc από 3ng/ml έως 400ng/ml επώαστηκαν σε πλάκες ELISA όπου πρώτα είχαν επιστρωθεί με άγριου τύπου BAFF και μεταλλαγμένης BAFF^{G249R} συγκέντρωσης 3μg/ml. Η πρόσδεση ελέγχθηκε φωτομετρικά χρησιμοποιώντας δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει την Fc περιοχή (HRP-goat anti-human IgG). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές ενώ οι τιμές είναι μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (SEM).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

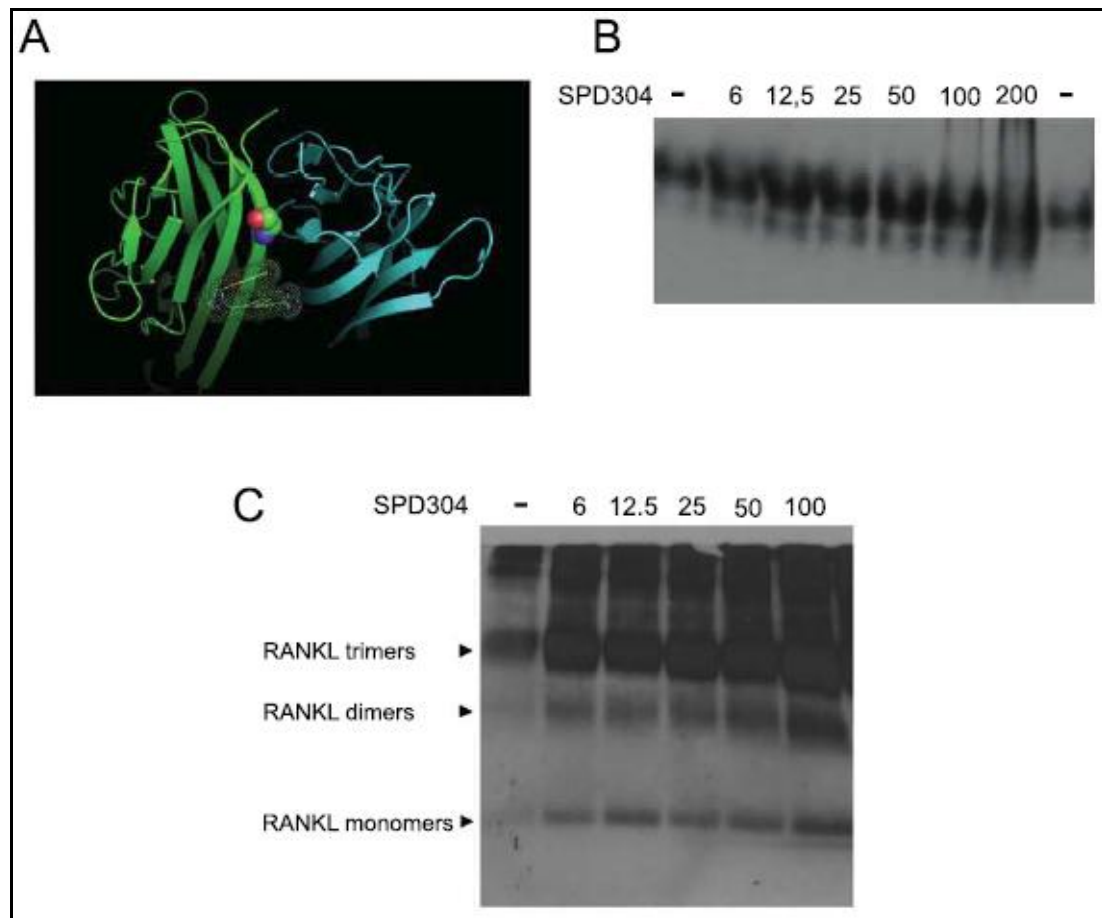
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ 2^ο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ 2^ο: ΔΟΚΙΜΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ RANKL ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ ΤΟΝ ΤΡΙΜΕΡΙΣΜΟ ΤΟΥ

4.1 Το μικρό μόριο SPD-304 αναστέλλει την δράση του RANKL

Το SPD-304 είναι ένα μικρό μόριο αναστολέας του TNF που έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά με τη δομή του TNF προκαλώντας αποδιάταξη του τριμερούς και σχηματισμό μη λειτουργικών διμερών (He et al. 2005). Το σημείο αλληλεπίδρασης του SPD-304 με το τριμερές του TNF περιλαμβάνει την θέση 122, που αντιστοιχεί με την θέση υποκατάστασης 278 της RANKL του ποντικού. Θέλοντας να διερευνήσουμε την πιθανή θέση αλληλεπίδρασης του SPD-304 με την δομή του RANKL, προχωρήσαμε σε *in silico* πρόβλεψη σύμφωνα με την οποία υπάρχει αλληλεπίδραση και μάλιστα σε περιοχή πολύ κοντά στην θέση υποκατάστασης G278 ($<4 \text{ \AA}$) (Douni et al. 2012) (Εικ. 4.1A). Πειραματική επιβεβαίωση μίας δυνητικά πιθανής αλληλεπίδρασης του SPD-304 με την εκκριτική RANKL πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκε μελετώντας τη δομή της εκκριτικής WT RANKL πρωτεΐνης (χωρίς GST) σε μη αποδιατακτικά πηκτώματα ακρυλαμιδίου (native gel) παρουσία του SPD-304 σε διάφορες συγκεντρώσεις και western blot ανιχνεύοντας την πρωτεΐνη με πολυκλωνικό αντί-RANKL αντίσωμα. Αρχικά, έγινε προεπάση της εκκριτικής WT RANKL πρωτεΐνης με το SPD-304 μόριο σε ένα εύρος συγκεντρώσεων (6-200 μ M) διατηρώντας σταθερή την ποσότητα της πρωτεΐνης (60ng). Παρατηρήσαμε ότι απουσία του SPD-304 (μάρτυρας) ανιχνεύεται μία κύρια ζώνη που αντιστοιχεί στην φυσική διαμόρφωση του τριμερούς RANKL ενώ με παρουσία του SPD-304 εντοπίζεται επιπρόσθετα μία ακόμη ζώνη μικρότερου μοριακού βάρους, η οποία μάλιστα είναι αυξανόμενης έντασης όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του SPD-304 (Εικ. 4.1B). Το πρότυπο αυτό που βλέπουμε ίσως είναι μία ένδειξη ότι η παρουσία του SPD-304 προκαλεί τροποποίηση της δομής του τριμερούς RANKL με ταυτόχρονη αποδέσμευση μονομερών. Βιοχημική επιβεβαίωση της παραπάνω ερμηνείας έγινε με πειράματα cross-linking και προεπάση του SPD-304 με την εκκριτική WT RANKL δοκιμάζοντας στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων (6-100 μ M). Παρομοίως, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έντασης των διμερών και μονομερών όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του SPD-304 σε σχέση με το μάρτυρα (απουσία του SPD-304). Το γεγονός ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του SPD-304 αυξάνεται ανάλογα και η ένταση του τριμερούς, φαίνεται οξύμωρο ωστόσο μία ερμηνεία αυτού του φαινομένου θα μπορούσε να είναι ότι ο αναστολέας SPD-304 προκαλεί τέτοια τροποποίηση στην διαμόρφωση του τριμερούς με

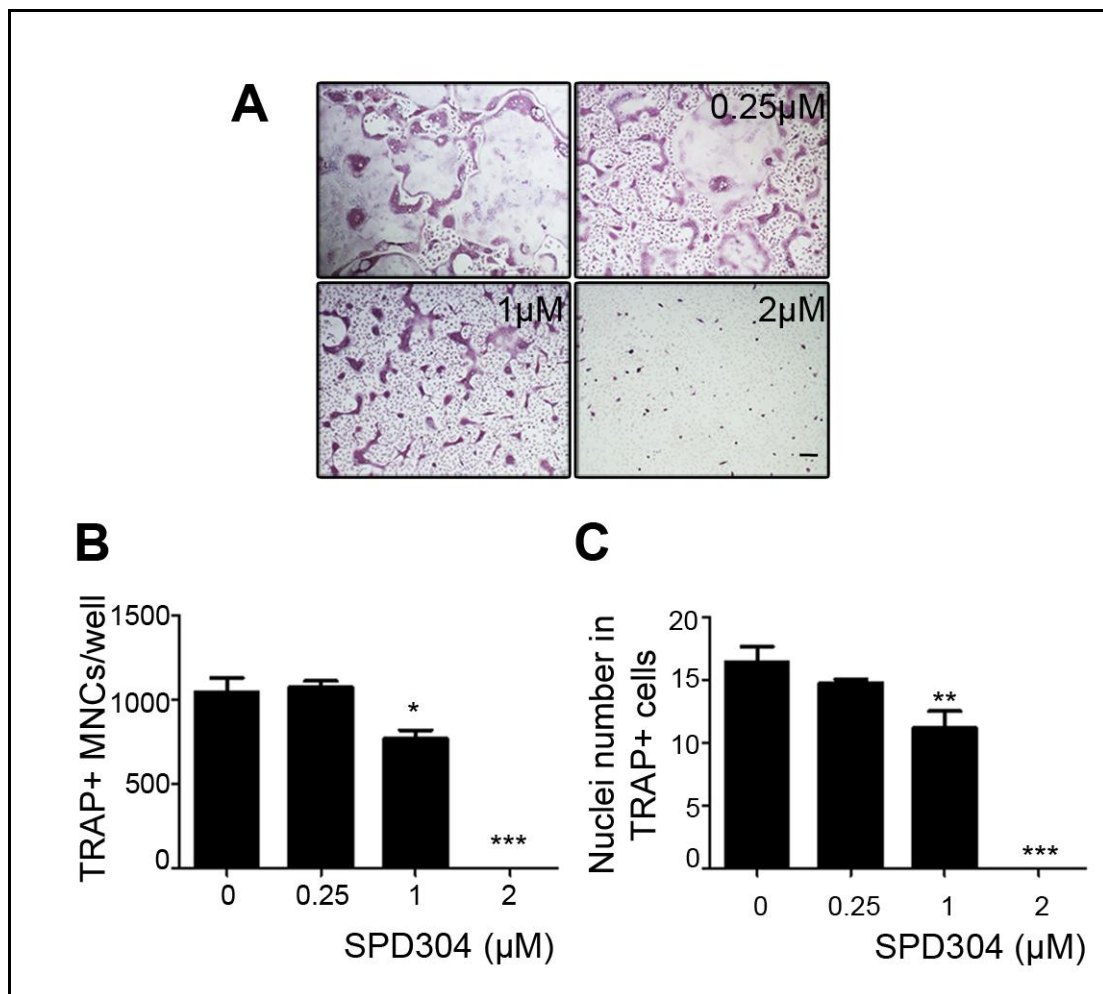
αποτέλεσμα να είναι πιο εύκολα προσβάσιμο και ανιχνεύσιμο από το πολυκλωνικό αντίσωμα (περισσότεροι επιτόποι προσβάσιμοι) (unmask) (Εικ. 4.1C).



Εικόνα 4.1 Επίδραση του SPD-304 στην δομή της RANKL πρωτεΐνης του ποντικού. (A) Μοριακή πρόβλεψη για την αλληλεπίδραση του διμερούς RANKL με το SPD-304 σε περιοχή που βρίσκεται πολύ κοντά στην θέση G278 ($<4\text{\AA}$) όπως απεικονίζεται μέσω του προγράμματος PYMOL v1.3. Οι μπλε και πράσινες κορδέλες αντιστοιχούν στα 2 μονομερή του RANKL, ενώ η γλυκίνη 278 απεικονίζεται με σφαιρίδια και το SPD304 έχει τη δομή θηλιάς. **(B)** Ανάλυση της δομής της εκκριτικής RANKL πρωτεΐνης παρουσία SPD-304 (6-200μM) ή απουσία SPD-304 (-) σε μη αποδιατακτικές συνθήκες με προεπάση στους 37°C για 1 ώρα και ανίχνευση με πολυκλωνικό αντί-RANKL αντίσωμα. **(C)** Πειράματα cross-linking με DSS όπου έγινε προεπάση της εκκριτικής RANKL πρωτεΐνης με SPD-304 (6-100μM) ή απουσία SPD-304 (-), ηλεκτροφόρηση σε 12% πηκτώμα ακρυλαμίδιου και ανοσοαποτύπωση με πολυκλωνικό αντι-RANKL αντίσωμα. Με τοξάκια επισημαίνονται τα τριμερή (trimers), διμερή (dimers) και μονομερή (monomers). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

Η πιθανή αλληλεπίδραση του SPD-304 με την εκκριτική RANKL πρωτεΐνη, μας οδήγησε στο να μελετήσουμε την επίδραση που έχει στην βιολογική δραστηριότητα του RANKL σε

δοκιμές οστεοκλαστογένεσης. Ειδικότερα, προχωρήσαμε σε ex vivo δοκιμές πρόδρομων κυττάρων του μυελού των οστών παρουσία 25ng/ml M-CSF και 80ng/ml GST-RANKL (ποντικού), προσθέτοντας το μικρό μόριο SPD-304 σε τελικές συγκεντρώσεις από 0,25μM μέχρι 2μM στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης. Παρατηρήσαμε ότι παρουσία του SPD-304 σε συγκέντρωση 1μM μειώνει τόσο τον αριθμό όσο και το μέγεθος των οστεοκλαστών ενώ σε συγκέντρωση 2μM παρεμποδίζεται πλήρως ο σχηματισμός πολυπύρηνων TRAP⁺ οστεοκλαστών (Εικ. 4.2). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το μικρό μόριο SPD-304 αναστέλλει τη δράση του RANKL πιθανώς ακολουθώντας τον μηχανισμό παρεμπόδισης της λειτουργίας του TNF, μέσω διάσπασης των λειτουργικών τριμερών.



Εικόνα 4.2 Το μικρό μόριο SPD-304 αναστέλλει την RANKL-επαγόμενη οστεοκλαστογένεση. (A) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από καλλιέργεια οστεοκλαστών (χρώση TRAP) παρουσία M-CSF, GST-RANKL και SPD-304 σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από (0-2μM). Φαίνεται η επίδραση του SPD304 στο σχηματισμό οστεοκλαστών σε σχέση με κύτταρα μάρτυρες που διαφοροποιήθηκαν σε οστεοκλάστες απουσία SPD-304. **(B)** Μέτρηση του αριθμού των πολυπύρηνων TRAP⁺ οστεοκλαστών με τουλάχιστον 3 πυρήνες και **(C)** του αριθμού

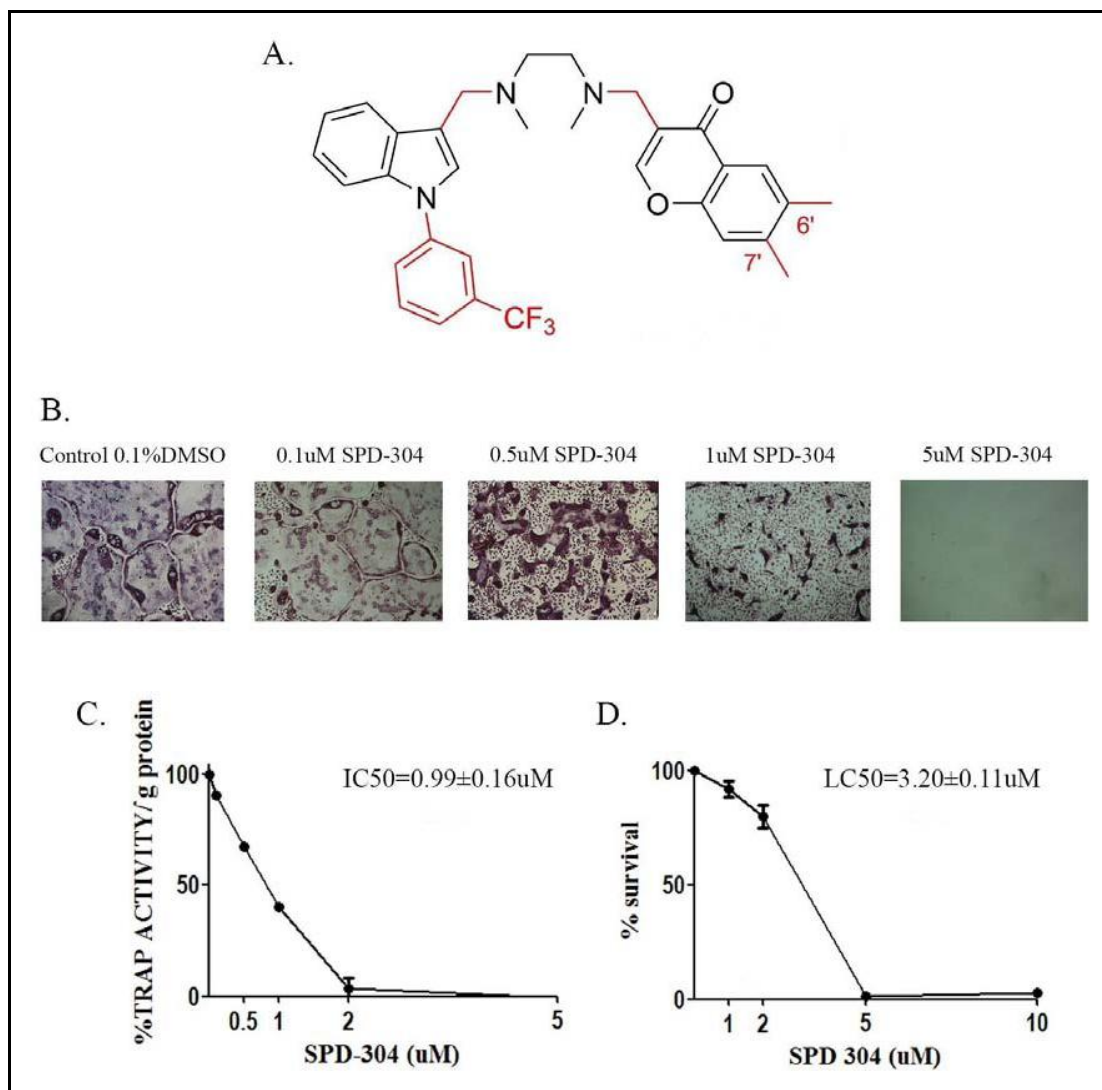
των πυρήνων ανά οστεοκλάστη. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα (*P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001).

4.2 Σχεδιασμός νέων μικρών μορίων ανάλογων του SPD-304 ως αναστολείς του RANKL του ανθρώπου

Η ανακάλυψη του προσδέτη RANKL ως κεντρικό ρυθμιστικό παράγοντα στη διαφοροποίηση, ενεργοποίηση και επιβίωση των οστεοκλαστών (Lacey et al. 1998) άνοιξε νέους ορίζοντες στην θεραπεία ασθενειών που χαρακτηρίζονται από αυξημένη ενεργότητα των οστεοκλαστών όπως είναι η οστεοπόρωση. Απόδειξη αποτελεί το γεγονός ότι το νέο φάρμακο κατά της οστεοπόρωσης που πρόσφατα εγκρίθηκε από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και την αντίστοιχη Ευρωπαϊκή (EMA) είναι ένα μονοκλωνικό αντισώμα, το denosumab (Prolia), έναντι του RANKL του ανθρώπου (Raje 2012). Ωστόσο, η ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών που στοχεύουν τον RANKL δεν περιορίζεται από την στιγμή που πέρασε στην κυκλοφορία το denosumab. Αντίθετα, το ενδιαφέρον παραμένει υψηλό αν αναλογιστεί κανείς κάποια μειονεκτήματα και σκέψεις που προκύπτουν με την χρήση του denosumab. Η παρατεταμένη χρήση ενός αντισώματος, όπως του denosumab, θα μπορούσε να προκαλέσει ανεπιθύμητη ανοσολογική απόκριση στον οργανισμό (Miller et al., 2011). Επίσης, το υψηλό κόστος παρασκευής αντισωμάτων αλλά και η αποκλειστικότητα μίας πατέντας δυσχεραίνουν την παρασκευή και διάθεση νέων αντισωμάτων που στοχεύουν τον RANKL. Επίσης, είναι γνωστό ότι η κυκλοφορία και η δράση των αντισωμάτων περιορίζεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό οπότε δεν περνούν στον εγκέφαλο, ένα όργανο που έχει αυξημένη έκφραση του RANKL (Rinotas et al., 2014) ο οποίος έχει δειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην θερμορύθμιση (Hanada et al. 2009). Για όλους αυτούς τους λόγους η εύρεση νέων μικρών μορίων (small molecules) αναστολέων του RANKL αποτελεί πρόκληση και ένα εναλλακτικό τρόπο θεραπευτικής προσέγγισης.

Αναφέραμε παραπάνω ότι το SPD-304 αναστέλλει την RANKL-επαγόμενη διαδικασία διαφοροποίησης, ενεργοποίησης και ωρίμανσης των οστεοκλαστών ενώ αλληλεπιδρά τροποποιώντας την φυσική διαμόρφωση της δομής της RANKL (Εικ. 4.2). Εκτός από τον RANKL του ποντικού ελέγξαμε την δράση του SPD-304 και στον RANKL του ανθρώπου μιας και αναστολή της δράσης του έχει πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές. Συγκεκριμένα, διαπιστώσαμε ότι αν και το SPD-304 αναστέλλει αποτελεσματικά την δράση του RANKL του ανθρώπου σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις (IC₅₀=0.99μM) (Εικ. 4.3) εντούτοις

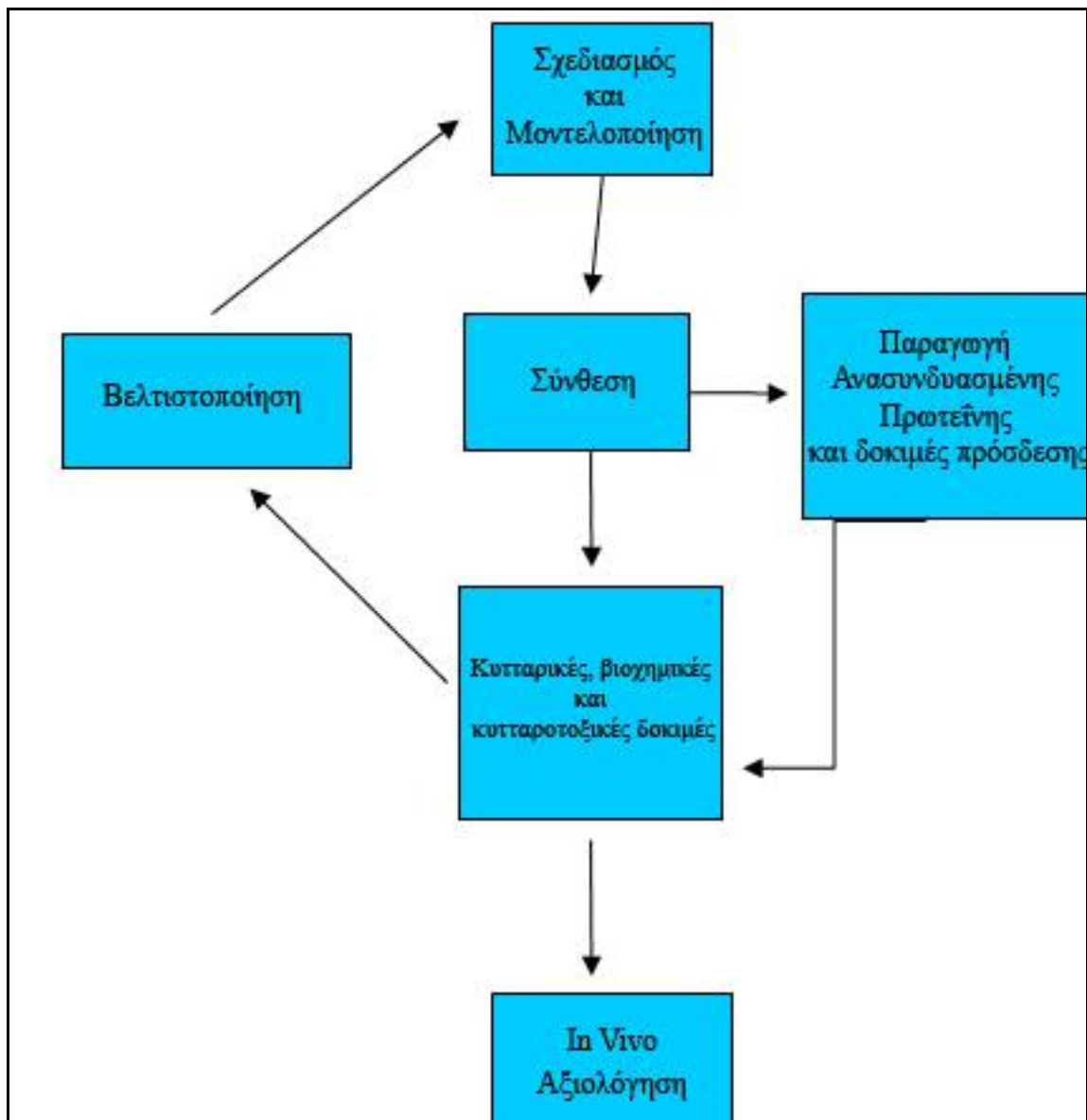
προκαλεί τοξικότητα σε πρόδρομους οστεοκλάστες ($LC_{50}=3.2 \mu M$) (Εικ. 4.3D). Και άλλες μελέτες έχουν δείξει ως βασικό μειονέκτημα του SPD-304 την υψηλή κυτταροτοξικότητά του (Sun & Yost 2008). Οι Sun και συνεργάτες έδειξαν ότι ο 3-μεθυλ-ινδολικός δακτύλιος του SPD-304 μπορεί να αφυδρογονωθεί από τα ένζυμα του P450 κυτοχρώματος παράγοντας ακόρεστα ιμίνια (iminium), τα οποία είναι ιδιαίτερα τοξικά. Ακόμη, στην χημική δομή του SPD-304 εντοπίζονται 2 μεθύλια στην διμεθυλοχρωμόνη η υδροξυλίωση των οποίων ίσως προκαλεί τοξικότητα (Εικ.4.3.A). Η υψηλή κυτταροτοξικότητα καθιστά το SPD-304 ακατάλληλο για προκλινικές δοκιμές.



Εικόνα 4.3. Η επίδραση του SPD-304 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. (A) Η χημική δομή του SPD-304. **(B)** Παρεμπόδιση της οστεοκλαστογένεσης επαγόμενης από RANKL του ανθρώπου σε ένα εύρος συγκεντρώσεων SPD-304 από 0.1-5 μM . **(C)** Ποσοτικός προσδιορισμός της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις του SPD-304 από 0.1-5 μM ($IC_{50}=0.99 \pm 0.16 \mu M$). **(D)** Ποσοτικός προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις του SPD-304 από 1-10 μM ($LC_{50}=3.2 \pm 0.11 \mu M$). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

Χρησιμοποιώντας το SPD-304 ως οδηγό μόριο (lead compound) σχεδιάστηκαν και συνθέθηκαν ανάλογα του SPD-304 με σκοπό την δημιουργία νέων φαρμάκων που διατηρούν ή ακόμα βελτιώνουν την ανασταλτική δράση έναντι της πρωτεΐνης-στόχου RANKL ενώ ταυτόχρονα είναι λιγότερο τοξικά. Με τη λογική αυτή έγινε σχεδιασμός και σύνθεση 72 ανάλογων του SPD-304 στα οποία πραγματοποιήθηκαν στοχευμένες ή τυχαίες υποκαταστάσεις πάνω στην χημική δομή του SPD-304. Η διαδικασία σχεδιασμού, σύνθεσης και αξιολόγησης των αναλόγων αυτών του SPD-304 πραγματοποιήθηκε υπό την συντονισμένη δράση 4 ανεξάρτητων ερευνητικών ομάδων κάθε μία με διαφορετικό πεδίο δράσης και εξειδίκευσης (Εικ. 4.4). Η ερευνητική ομάδα του Καθ. Ηλία Ηλιόπουλου συμμετείχε στον σχεδιασμό και την μοντελοποίηση των νέων μορίων, η ερευνητική ομάδα του Καθ. Ηλία Κουλαδούρου στην χημική σύνθεση, η ερευνητική ομάδα του Αν. Καθ. Γιώργου Κοντοπίδη στον προσδιορισμό της ικανότητας δέσμευσης των μορίων στην ανθρώπινη RANKL και η ερευνητική ομάδα της Επικ. Καθ. Ελένης Ντούνη στην αξιολόγηση των νέων μορίων σε RANKL-επαγόμενες λειτουργικές δοκιμές οστεοκλαστογένεσης και σε δοκιμές κυτταροτοξικότητας (Εικ. 4.4). Ο έλεγχος των SDP-304 αναλόγων πραγματοποιήθηκε στην ανασυνδυασμένη RANKL πρωτεΐνη του ανθρώπου λόγω της φαρμακευτικής σημασίας της.

Ο διαλύτης που επιλέχθηκε για την διαλυτοποίηση των περισσότερων ενώσεων είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide-DMSO) κυρίως λόγω της εξαιρετικής διαλυτικής του δράσης. Σε πρώτη φάση έγινε αξιολόγηση των 72 ανάλογων του SPD-304 σε δοκιμές οστεοκλαστογένεσης σε συγκέντρωση 5μM. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση επιλέχθηκε με βάση την συμπεριφορά του SPD-304, το οποίο ενώ ανέστειλε την δημιουργία των ώριμων οστεοκλαστών σε μικρότερες συγκεντρώσεις ($IC_{50}=0.99 \pm 0.16 \mu M$) (Εικ. 4.3C) στην συγκέντρωση των 5μM ήταν ιδιαίτερα τοξικό προκαλώντας τον θάνατο των κυττάρων ($LC_{50}=3.2 \pm 0.11 \mu M$) (Εικ. 4.3D). Ειδικότερα, από τις 72 ενώσεις εντοπίσαμε 17 ανάλογα του SPD-304 που εμφανίζουν πλήρη παρεμποδιστική δράση στον σχηματισμό ώριμων οστεοκλαστών και 12 με μερική παρεμπόδιση δηλαδή να μην σχηματίζονται οστεοκλάστες ωστόσο είτε υπολείπονται σε αριθμό TRAP+ κυττάρων ή σε μέγεθος και πολυπυρήνωση. Οι ενώσεις που παρουσίασαν μερική ή ολική αναστολή της δράσης του RANKL, ελέγχθησαν επίσης για την επαγωγή κυτταροτοξικότητας σε πρόδρομους οστεοκλάστες μετρώντας την βιωσιμότητα των κυττάρων με την μέθοδο MTT. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται συνοπτικά οι 72 ενώσεις και τα αποτελέσματα αυτών σε RANKL λειτουργικές δοκιμές οστεοκλαστογένεσης και σε δοκιμές κυτταροτοξικότητας (Πίνακας 4.1).



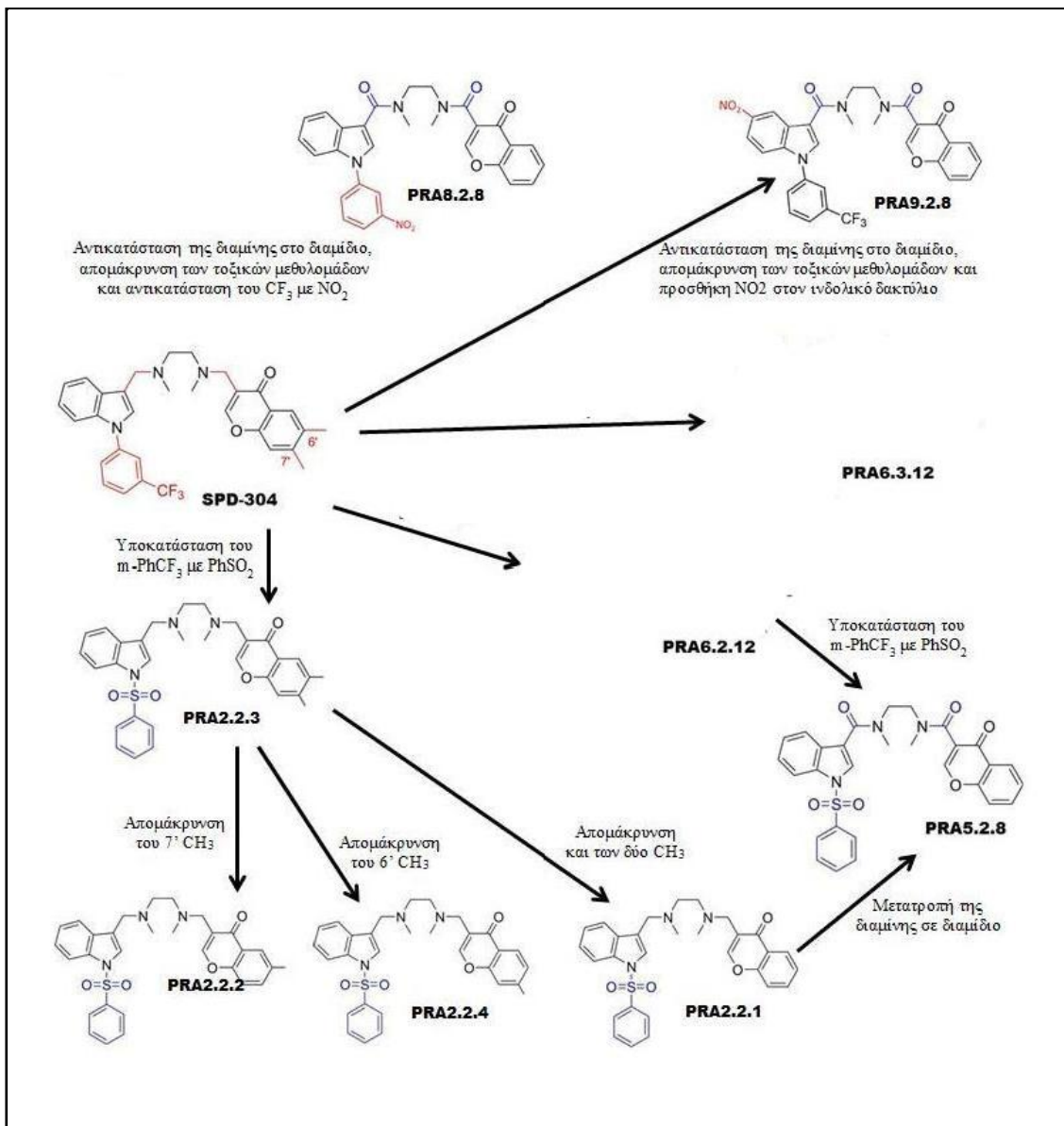
Εικόνα 4.4. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τον σχεδιασμό, σύνθεση και αξιολόγηση των SPD-304 αναλόγων.

a/a	Όνομα Χημικής Ένωσης	Χημικός Τύπος	In Vitro πειράματα RANKL	
			Οστεοκλαστογένηση SuM	Κυτταροτοξικότητα (IC50 [μΜ])
0	SPD304	C32H34F3N3O2Cl2	τοξικό	3.4
1	PRA_1_2_3	C25H29N3O2	πλήρης παρεμπόδιση	8.5
2	PRA_1_3_5m	C22H24N4	πλήρης παρεμπόδιση	12.1
3	PRA_2_1_5m	C32H30N4O4S2	πλήρης παρεμπόδιση	18.4
4	PRA_2_2_0	C19H23N3O2S	μερική παρεμπόδιση	>50
5	PRA_2_2_1	C29H29N3O4S	πλήρης παρεμπόδιση	57.5
6	PRA_2_2_2	C30H31N3O4S	τοξικό	4.8
7	PRA_2_2_3	C31H33N3O4S	τοξικό	4
8	PRA_2_2_4	C30H31N3O4S	πλήρης παρεμπόδιση	14
9	PRA_2_3_3	C31H31N3O4S	μη παρεμπόδιση	>20
10	PRA_2_2_5m	C34H34N4O4S2	πλήρης παρεμπόδιση	8.2
11	PRA_3_1_5m	C34H28F6N4	μη παρεμπόδιση	0
12	PRA_3_2_2	C31H30F3N3O2	πλήρης παρεμπόδιση	>20
13	PRA_3_2_3	C32H32F3N3O2	πλήρης παρεμπόδιση	7.2
14	PRA_3_3_2	C31H28F3N3O2	μη παρεμπόδιση	>20
15	PRA_3_3_3	C32H30F3N3O2	πλήρης παρεμπόδιση	11.3
16	PRA_3_3_5	C31H26F3N3O	μη παρεμπόδιση	0
17	PRA_3_3_7	C27H24F3N3O	μερική παρεμπόδιση	>20
18	PRA_3_3_8	C30H24F3N3O3	μερική παρεμπόδιση	>20
19	PRA_3_3_5m	C36H30F6N4	μη παρεμπόδιση	>20
20	PRA_5_1_5	C28H23N3O4S	μη παρεμπόδιση	0
21	PRA_5_1_8	C27H21N3O6S	μη παρεμπόδιση	0
22	PRA_5_1_5m	C32H26N4O6S2	0	0
23	PRA_5_2_5	C30H27N3O4S	μη παρεμπόδιση	0
24	PRA_5_2_6	C23H23N5O4S	μη παρεμπόδιση	0
25	PRA_5_2_7	C26H25N3O4S	μη παρεμπόδιση	0
26	PRA_5_2_8	C29H25N3O6S	πλήρης παρεμπόδιση	63.7
27	PRA_5_2_9	C26H24FN3O4S	μερική παρεμπόδιση	>20
28	PRA_5_2_10	C53H49N7O10S3	πλήρης παρεμπόδιση	>20
29	PRA_5_2_5m	C34H30N4O6S2	μερική παρεμπόδιση	>20
30	PRA_5_3_5	C30H25N3O4S	μη παρεμπόδιση	0
31	PRA_5_3_8	C29H23N3O6S	μερική παρεμπόδιση	>20
32	PRA_5_3_9	C26H22FN3O4S	μη παρεμπόδιση	0
33	PRA_5_3_10	C24H21N3O4S2	μη παρεμπόδιση	0
34	PRA_5_3_5m	C34H28N4O6S2	μη παρεμπόδιση	0
35	PRA_5_4_5	C29H25N3O4S	μη παρεμπόδιση	0
36	PRA_5_4_7	C25H23N3O4S	μη παρεμπόδιση	0
37	PRA_5_4_8	C28H23N3O6S	μη παρεμπόδιση	0
38	PRA_5_5_5	C30H27N3O4S	μη παρεμπόδιση	0
39	PRA_5_5_7	C26H25N3O4S	μη παρεμπόδιση	0
40	PRA_5_5_8	C29H25N3O6S	μη παρεμπόδιση	0
41	PRA_6_2_12	C32H28F3N3O4	πλήρης παρεμπόδιση	27.5
42	PRA_6_3_12	C32H26F3N3O4	πλήρης παρεμπόδιση	8.75
43	PRA_6_3_5	C31H24F3N3O2	μη παρεμπόδιση	0
44	PRA_6_3_6	C24H20F3N5O2	μερική παρεμπόδιση	17.2
45	PRA_6_3_7	C27H22F3N3O2	μη παρεμπόδιση	0
46	PRA_7_2_5m	C36H30F6N6O4	μερική παρεμπόδιση	>20
47	PRA_7_3_5	C31H25F3N4O3	μερική παρεμπόδιση	>20
48	PRA_7_3_8	C30H23F3N4O5	πλήρης παρεμπόδιση	7.5
49	PRA_7_3_5m	C36H28F6N6O4	μη παρεμπόδιση	0
50	PRA_8_2_8	C29H24N4O6	πλήρης παρεμπόδιση	45
51	PRA_8_3_8	C29H22N4O6	μη παρεμπόδιση	>20
52	PRA_9_2_8	C30H23F3N4O6	πλήρης παρεμπόδιση	13.8
53	PRA_9_2_9	C27H22F4N4O4	0	0
54	PRA_9_3_8	C30H21F3N4O6	μη παρεμπόδιση	>20
55	PRA_9_6_8	C34H21F3N4O6	μη παρεμπόδιση	0
56	PRA_10_2_8	C29H26N4O4	μη παρεμπόδιση	0
57	PRA_10_3_8	C29H24N4O4	μη παρεμπόδιση	0
58	PRA_11_3_8	C29H21N5O8	μη παρεμπόδιση	0
59	PRA_12_3_8	C29H25N5O4	μερική παρεμπόδιση	>20
60	PRA_12_3_11	C29H27N5O4	μη παρεμπόδιση	0
61	PRA_13_6_8	C34H23F3N4O4	μη παρεμπόδιση	0
62	PRA_14_2_8	C29H24N4O8S	πλήρης παρεμπόδιση	>20
63	PRA_14_3_8	C29H22N4O8S	μη παρεμπόδιση	0
64	PRA_15_2_8	C29H26N4O6S	μη παρεμπόδιση	0
65	PRA_15_3_8	C29H24N4O6S	μη παρεμπόδιση	0
66	PRA_16_3_8	C23H18N4O6	μη παρεμπόδιση	0
67	PRA_16_3_9	C20H17FN4O4	μερική παρεμπόδιση	>20
68	PRA_16_3_10	C18H16N4O4S	μη παρεμπόδιση	0
69	PRA_5m_1_8	C22H16N2O6	μη παρεμπόδιση	0
70	PRA_5m_2_8	C24H20N2O6	μη παρεμπόδιση	0
71	PRA_5m_3_8	C24H18N2O6	μη παρεμπόδιση	0
72	PRA_5m_2_5	C26H24N2O2	μερική παρεμπόδιση	0

Πίνακας 4.1. Συνοπτικός πίνακας των 72 ενώσεων ανάλογων του SPD-304. Στην πρώτη στήλη δίνονται τα ονόματα των ενώσεων, με πράσινο χρώμα σημαίνονται οι ενώσεις με πλήρη παρεμπόδιση ενώ με κίτρινο χρώμα με μερική παρεμπόδιση. Δίνεται, επίσης, ο χημικός τύπος της ένωσης και συνοπτικά τα *in vitro* αποτελέσματα των δοκιμών.

Από τα 17 ανάλογα του SPD-304 που εμφάνισαν πλήρη παρεμπόδιση σε δοκιμές οστεοκλαστογένεσης σε συγκέντρωση 5μM, επικεντρωθήκαμε σε 7 ενώσεις που έδειξαν χαμηλή κυτταροτοξικότητα. Περαιτέρω αξιολόγηση των ενώσεων αυτών έγινε σε δοκιμές οστεοκλαστογένεσης για να προσδιοριστεί η κρίσιμη συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή της RANKL-επαγόμενης διαφοροποίησης στο 50% των πρόδρομων κυττάρων (IC50) και σε δοκιμές MTT τοξικότητας για να βρεθεί η συγκέντρωση που προκαλεί τον θάνατο του 50% του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού (LC50). Οι 7 ενώσεις είναι οι παρακάτω: PRA2.2.1, PRA2.2.4, PRA5.2.8, PRA6.2.12, PRA6.3.12, PRA8.2.8, και PRA9.2.8. Επίσης, αξιολογήθηκαν και οι ενώσεις PRA2.2.2, PRA2.2.3 παρά το γεγονός ότι ήταν τοξικές για να συγκριθούν με τις PRA2.2.1, PRA2.2.4 αφού ανήκουν στην ίδια κατηγορία. Συνεπώς, αξιολογήθηκαν πλήρως 9 ενώσεις.

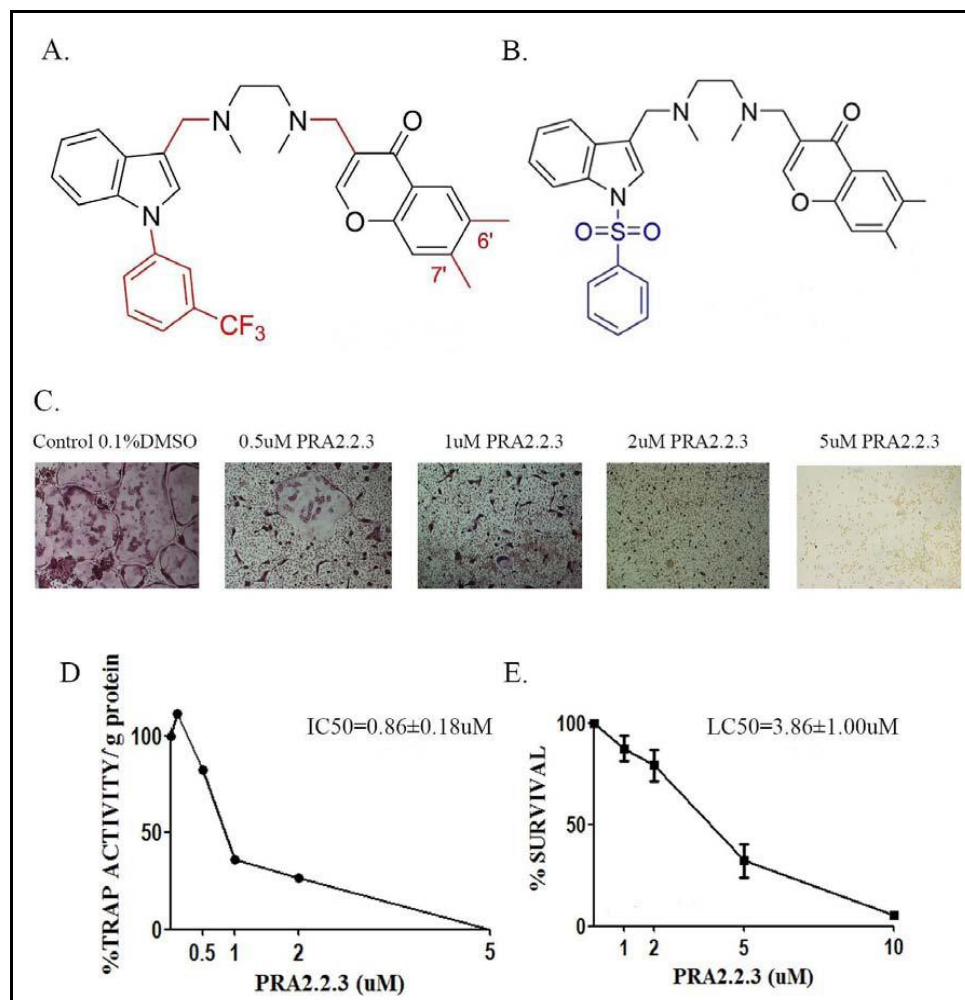
Ειδικότερα στις ενώσεις της σειράς PRA2.2_έγινε αντικατάσταση του τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτυλίου (trifluoromethylphenyl moiety) με αρωματικό δακτύλιο και μια θειϊκή ομάδα (PhSO₂) (PRA2.2.3). Ακολούθως, στα μόρια αυτά έγινε απομάκρυνση των μεθυλομάδων όπως το 7' μεθύλιο (PRA2.2.2), το 6' μεθύλιο (PRA2.2.4) ή και τα δύο (PRA2.2.1) από την διμεθυλοχρωμόνη. Στη σειρά των ενώσεων PRA6.2_ έγινε αντικατάσταση ----(PRA6.2.12) και -----(PRA6.3.12). Στην ένωση PRA5.2.8 έχουν πραγματοποιηθεί υποκαταστάσεις που περιλαμβάνονται τόσο στο PRA2.2.1 όσο και στο PRA6.2.12 δηλαδή αλλαγή της διαμίνης σε διαμίδιο, αφαίρεση και των δύο μεθυλίων και αντικατάσταση του τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτυλίου σε αρωματικό δακτύλιο με μια θειϊκή ομάδα (PhSO₂). Στο μικρό μόριο PRA8.2.8 έχει αντικατασταθεί το τριφθορομεθύλιο σε αζωτούχα ομάδα (NO₂), έχει γίνει αλλαγή της διαμίνης σε διαμίδιο και απομάκρυνση των δύο μεθυλίων από τη διμεθυλοχρωμόνη. Τέλος, η ένωση PRA9.2.8 περιλαμβάνει αντικατάσταση της διαμίνης σε διαμίδιο αφαίρεση των δύο μεθυλίων και προσθήκη αμινοομάδας (NO₂) στον ινδολικό δακτύλιο (Εικ. 4.5).



Εικόνα 4.5. Σχηματική απεικόνιση της πορείας σύνθεσης και υποκατάστασης των 9 ενώσεων αναλόγων του SPD-304.

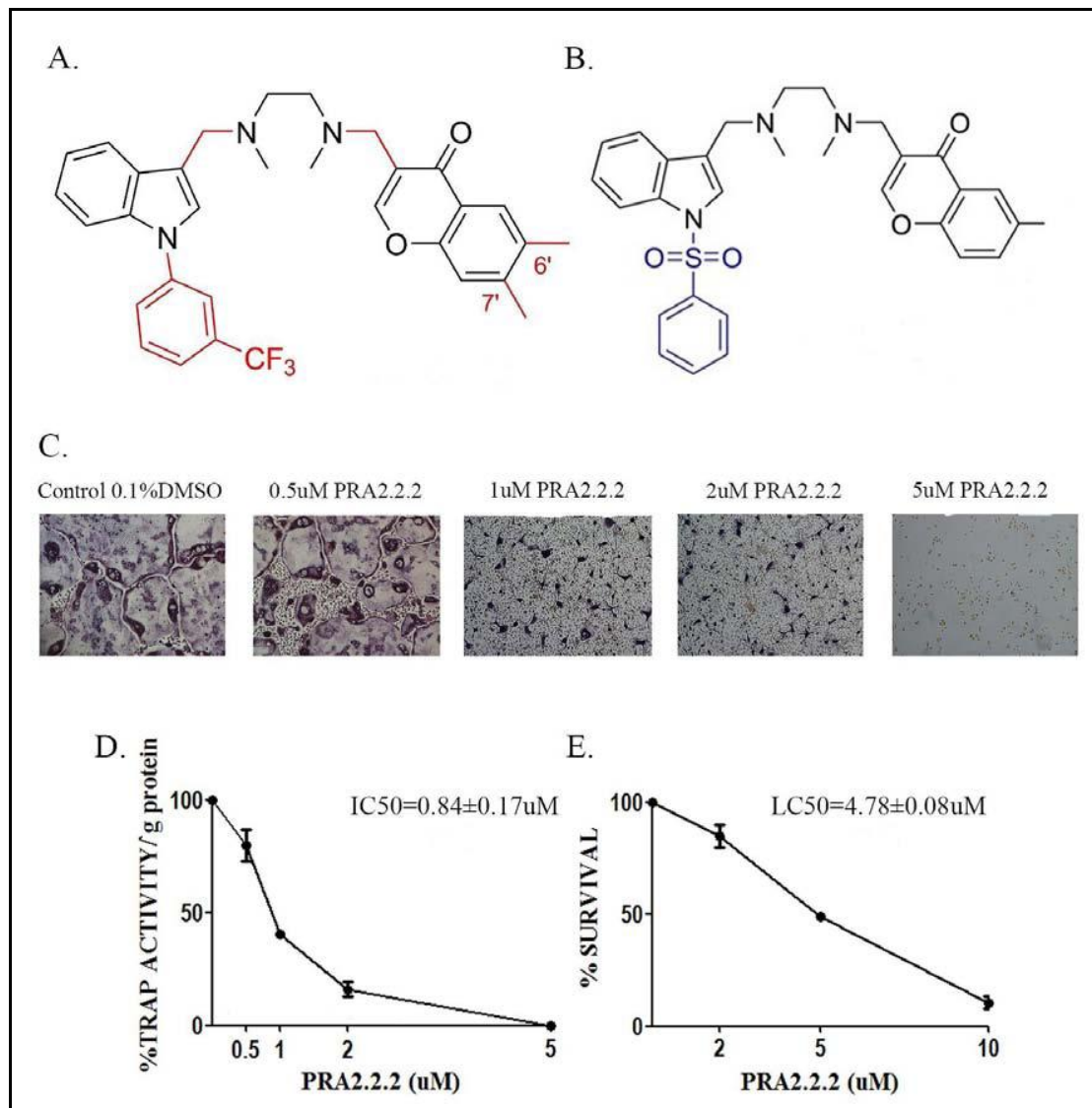
4.3. Αξιολόγηση των μικρών μορίων της σειράς PRA2.2

Σε όλα τα μόρια της σειράς PRA2.2 έγινε αντικατάσταση του τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτυλίου με αρωματικό δακτύλιο και μια θειϊκή ομάδα (PhSO₂). Το μόριο PRA2.2.3 εμφανίζει αρκετά παρόμοια χαρακτηριστικά με το SPD-304. Το PRA2.2.3 προκαλεί αναστολή της RANKL-επαγόμενης οστεοκλαστογένεσης ήδη από την συγκέντρωση των 0.5 μM (IC₅₀=0.86 ± 0.18 μM) με παρόμοια τοξικότητα σε σχέση με το SPD-304 (LC₅₀=3.86 ± 1 μM) (Εικ.4.6).



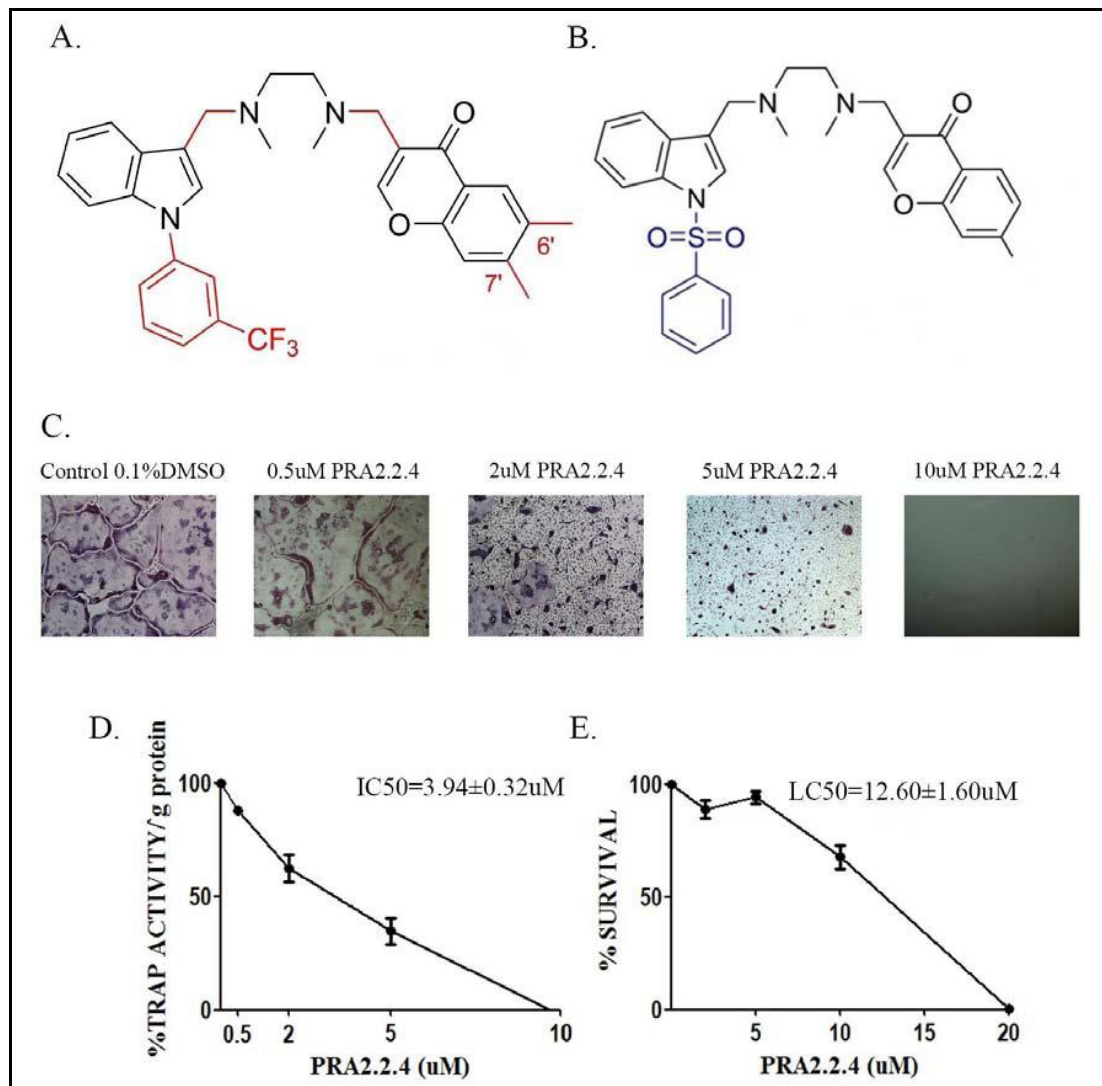
Εικόνα 4.6. Η επίδραση του PRA2.2.3 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. Σύγκριση της χημικής δομής του SPD-304 (A) με την αντίστοιχη του PRA2.2.3 (B) όπου με μπλε χρώμα υποδηλώνεται η ομάδα που αντικαταστάθηκε στο SPD-304. (C) Παρεμπόδιση της RANKL-επαγόμενης οστεοκλαστογένεσης οστεοκλαστών σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.5-5 μM. (D) Ποσοτικός προσδιορισμός της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις του PRA2.2.3 από 0.1-5 μM (IC₅₀=3.86 ± 1.00 μM, n=3). (E) Ποσοτικός προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις του PRA2.2.3 από 1-10 μM (LC₅₀=3.86 ± 1 μM, n=3). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

Στο μικρό μόριο PRA2.2.2 έγινε επιπλέον απομάκρυνση του 7'μεθυλίου της διμεθυλοχρωμόνης. Ωστόσο, το PRA2.2.2 εμφανίζει ίδια συμπεριφορά αναστολής σε δοκιμές οστεοκλαστογένεσης με το PRA2.2.3 ($IC_{50}=0.84 \pm 0.17 \mu M$) και τοξικότητας ($LC_{50}=4.78 \pm 0.08 \mu M$) (Εικ. 4.7).



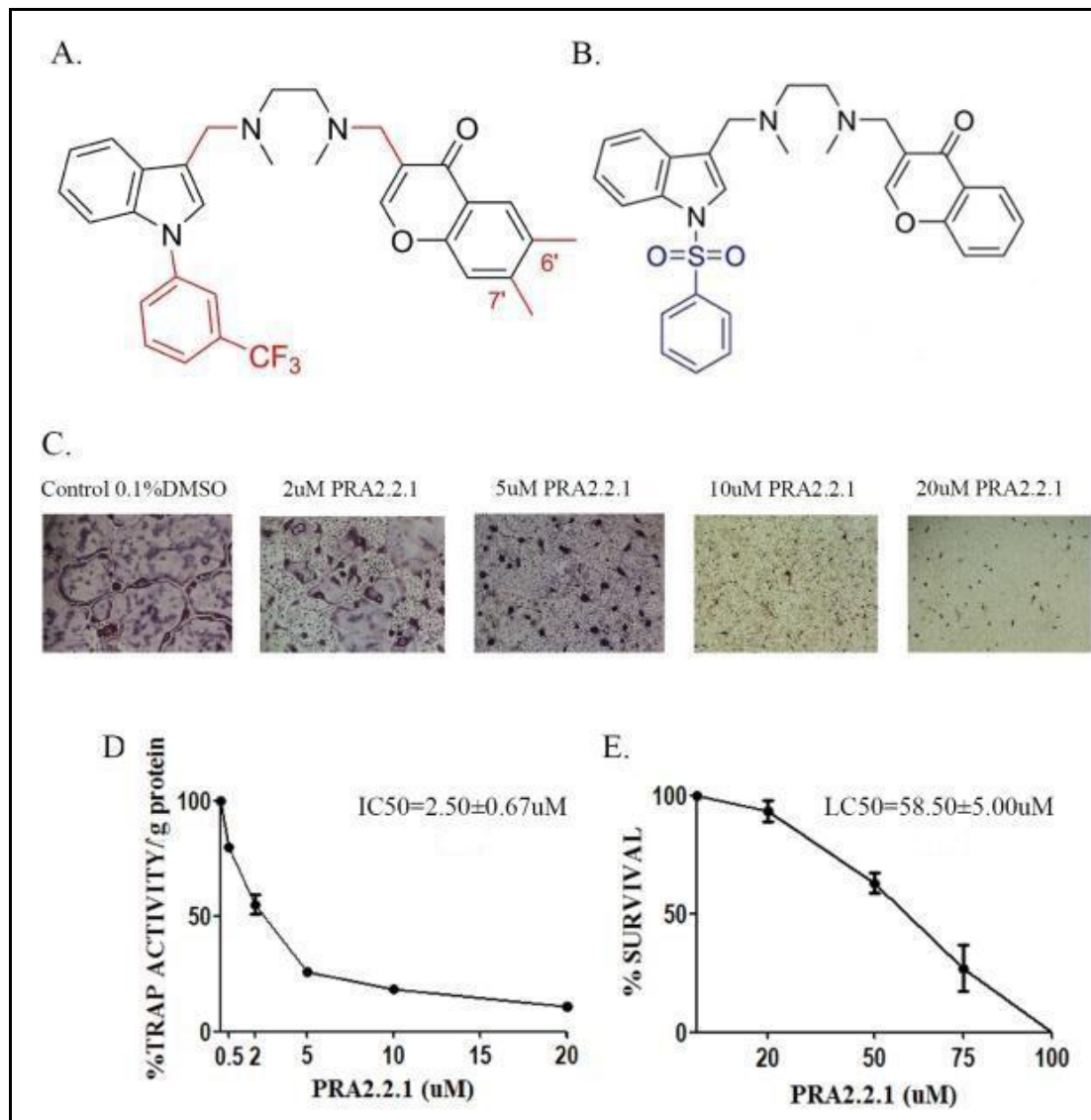
Εικόνα 4.7. Η επίδραση του PRA2.2.2 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. (A) Σύγκριση της χημικής δομής του SPD-304 με (B) αυτή του PRA2.2.2. (C) Παρεμπόδιση της RANKL-επαγόμενης διαδικασίας σχηματισμού οστεοκλαστών σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.5-5 μM. (D) Ποσοτικός προσδιορισμός της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις του PRA2.2.2 από 0.5-5 μM ($IC_{50}=0.84 \pm 0.17 \mu M$, n=3). (E) Ποσοτικός προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις του PRA2.2.2 από 2-10 μM ($LC_{50}=4.78 \pm 0.08 \mu M$, n=3). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

Στο μόριο PRA2.2.4 έχει απομακρυνθεί το 6' μεθύλιο από την διμεθυλοχρωμόνη με αποτέλεσμα να παρουσιάζει μικρότερη αναστολή σε δοκιμές 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 (Εικ. 4.8).



Εικόνα 4.8. Η επίδραση του PRA2.2.4 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. (A) Η χημική δομή του SPD304 συγκρίνεται με (B) την αντίοιχη του PRA2.2.4. (C) Παρεμπόδιση της RANKL-επαγόμενης διαδικασίας σχηματισμού οστεοκλαστών σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.5-10μM. (D) Ποσοτικός προσδιορισμός της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις του PRA2.2.4 από 0.5-10μM ($IC_{50}=3.94 \pm 0.32 \mu M$, n=3). (E) Ποσοτικός προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις του PRA2.2.4 από 2-20 μM ($LC_{50}=12.6 \pm 1.6 \mu M$, n=3). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

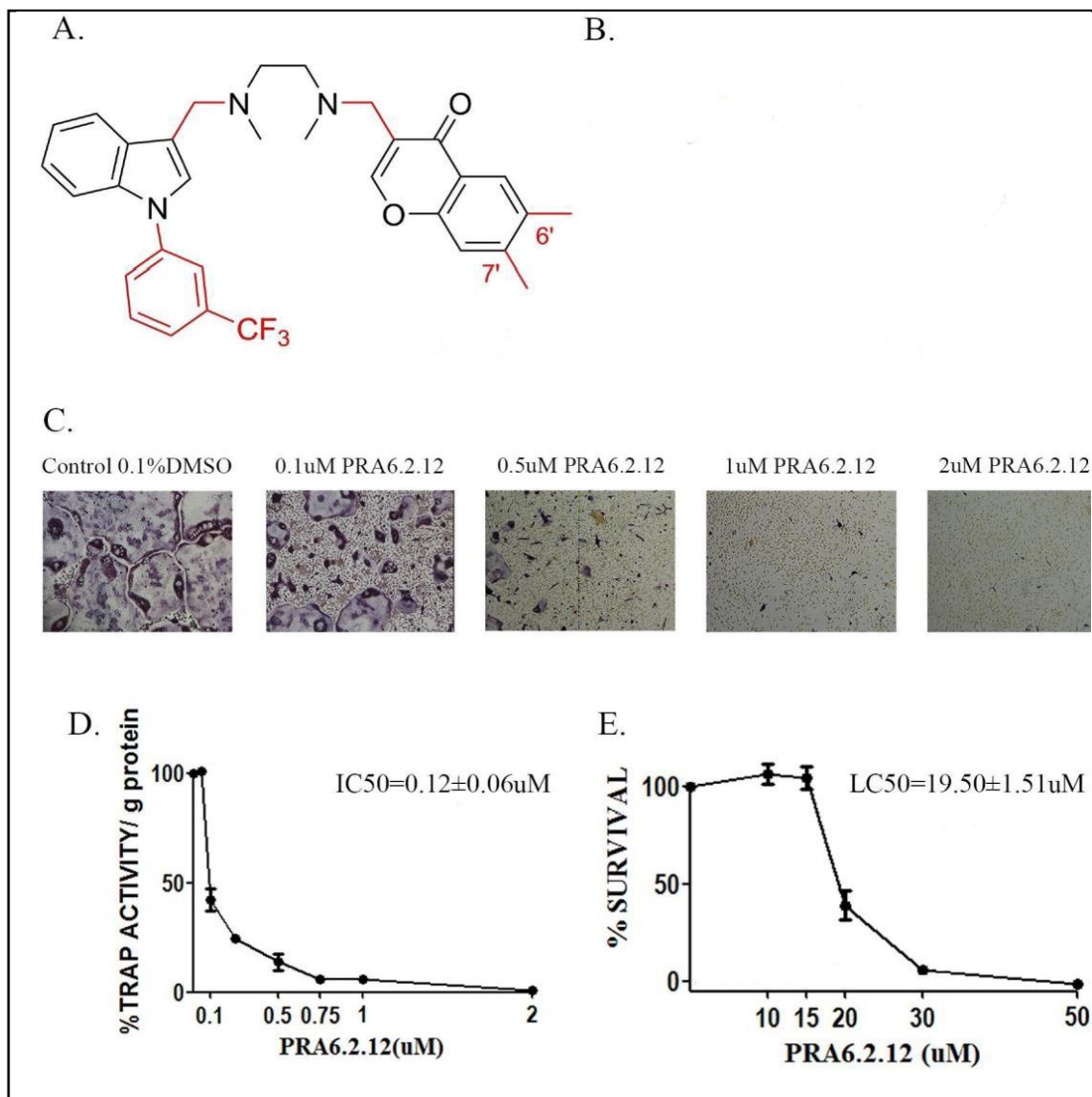
Τέλος, το μόριο PRA2.2.1 εμφανίζει την καλύτερη συμπεριφορά από όλα τα μόρια της σειράς PRA2.2 καθώς επιδεικνύει αρκετά καλή αναστολή της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=2.5 \pm 0.67 \mu M$) αλλά σαφώς μικρότερη τοξικότητα ($LC_{50}=58.5 \pm 5 \mu M$) σε σχέση με το SPD-304 (Εικ. 4.9).



Εικόνα 4.9. Η επίδραση του PRA2.2.1 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. (A) Η χημική δομή του SPD304 και (B) η αντίστοιχη του PRA2.2.1. (C) Παρεμπόδιση της RANKL-επαγόμενης διαδικασίας σχηματισμού οστεοκλαστών σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 2-20 μM . (D) Ποσοτικός προσδιορισμός της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις του PRA2.2.1 από 0.5-20 μM ($IC_{50}=2.5 \pm 0.67 \mu M$, $n=3$). (E) Ποσοτικός προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις του PRA2.2.1 από 20-100 μM ($LC_{50}=58.5 \pm 5 \mu M$, $n=4$). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

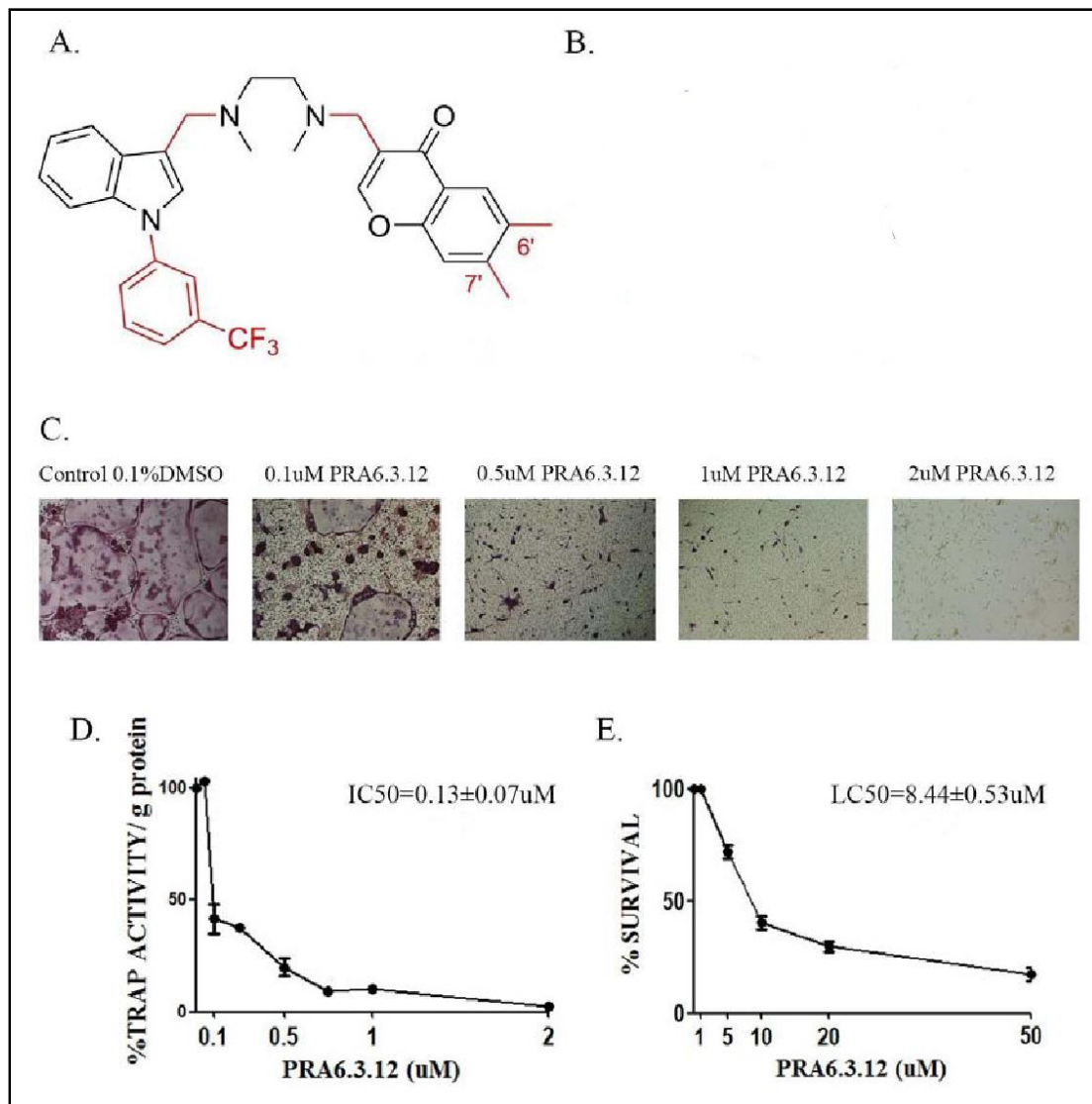
4.4. Αξιολόγηση των αναστολέων PRA6.2.12 και PRA6.2.13

Στην ομάδα των PRA6.2._ μελετήσαμε 2 ενώσεις, τις PRA6.2.12 και PRA6.3.12, με πολύ θετικά αποτελέσματα στην αναστολή της οστεοκλαστογένεσης σε συγκέντρωση 5μM. Το μόριο PRA6.2.12 στο οποίο έχει γίνει ----, παρουσιάζει ιδιαίτερη δραστικότητα στην 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 (Εικ. 4.10).



Εικόνα 4.10. Η επίδραση του PRA6.2.12 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. (A) Η χημική δομή του SPD304 συγκρίνεται με (B) την αντίστοιχη του PRA6.2.12 όπου με μπλε χρώμα υποδηλώνονται ----. (C) Παρεμπόδιση της RANKL-επαγόμενης διαδικασίας σχηματισμού οστεοκλαστών σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.1-2μM. (D) Ποσοτικός προσδιορισμός της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις του PRA6.2.12 από 0.05-2μM ($IC_{50}=0.12 \pm 0.06 \mu M$, $n=4$). (E) Ποσοτικός προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις του PRA6.2.12 από 10-50 μM ($LC_{50}=19.5 \pm 1.51 \mu M$, $n=3$). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

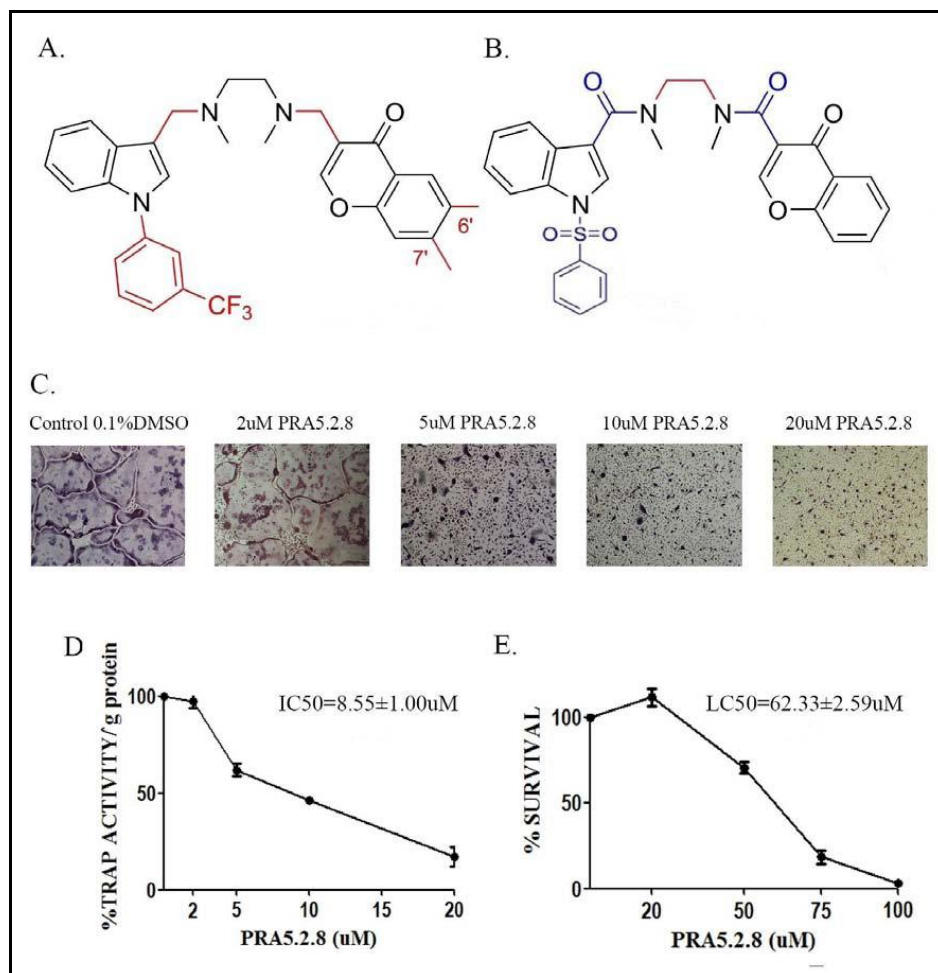
Το άλλο μόριο της σειράς, το PRA6.3.1.2, στο οποίο έχει γίνει ----- εμφανίζεται και αυτό αρκετά δραστικό σε δοκιμές οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=0.13 \pm 0.07 \mu M$) και παρουσιάζει ελαφρώς μειωμένη τοξικότητα ($LC_{50}=8.44 \pm 0.53 \mu M$) σε σχέση με το SPD-304 (Εικ. 4.11).



Εικόνα 4.11. Η επίδραση του PRA6.3.12 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. Σύγκριση της χημικής δομής του (A) SPD304 με την αντίστοιχη του (B) PRA6.3.12. (C) Παρεμπόδιση της RANKL-επαγόμενης διαδικασίας σχηματισμού οστεοκλαστών σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.1-2 μM . (D) Ποσοτικός προσδιορισμός της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις του PRA6.3.12 από 0.05-2 μM ($IC_{50}=0.13 \pm 0.07 \mu M$, n=3). (E) Ποσοτικός προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις του PRA6.3.12 από 1-50 μM ($LC_{50}=8.44 \pm 0.53 \mu M$, n=3). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

4.5. Αξιολόγηση του αναστολέα PRA5.2.8

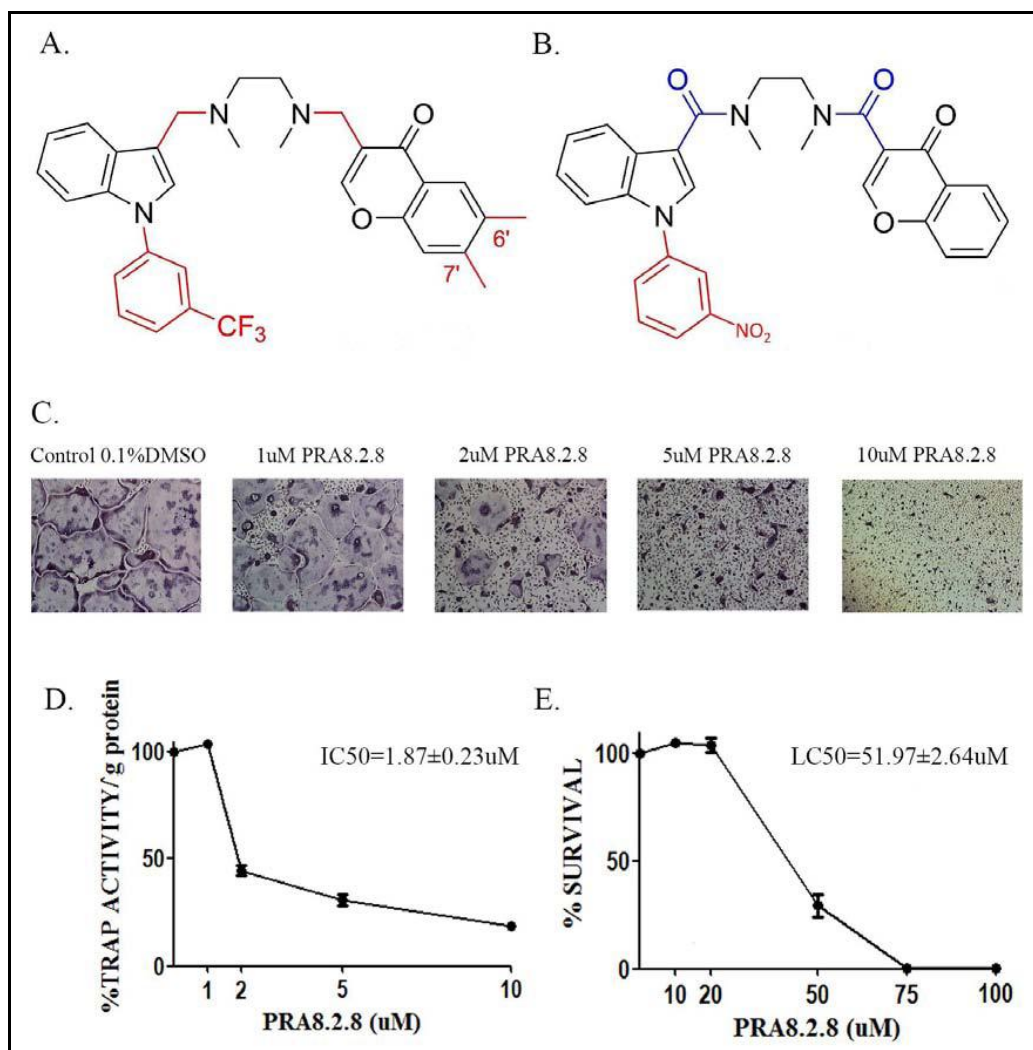
Το μικρό μόριο PRA5.2.8 περιέχει όλες τις ευεργετικές τροποποιήσεις των PRA2.2.1 και PRA6.2.12. Το μόριο PRA5.2.8 εμφανίζει μικρότερη αναστολή της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=8.55\pm 1\mu M$) αλλά σαφώς αρκετά μικρότερη τοξικότητα ($LC_{50}=62.33 \pm 2.59 \mu M$) σε σχέση με το SPD-304 (Εικ. 4.12).



Εικόνα 4.12. Η επίδραση του PRA5.2.8 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. **(A)** Η χημική δομή του SPD-304 και **(B)** η αντίστοιχη του PRA5.2.8. **(C)** Παρεμπόδιση της RANKL-επαγόμενης οστεοκλαστογένεσης σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 2-20 μM . **(D)** Ποσοτικός προσδιορισμός της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις του PRA5.2.8 από 2-20 μM ($IC_{50}=8.55 \pm 1 \mu M$, $n=3$). **(E)** Ποσοτικός προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις του PRA5.2.8 από 20-100 μM ($LC_{50}=62.33 \pm 2.59 \mu M$, $n=3$) Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

4.6. Αξιολόγηση του μικρού αναστολέα PRA8.2.8

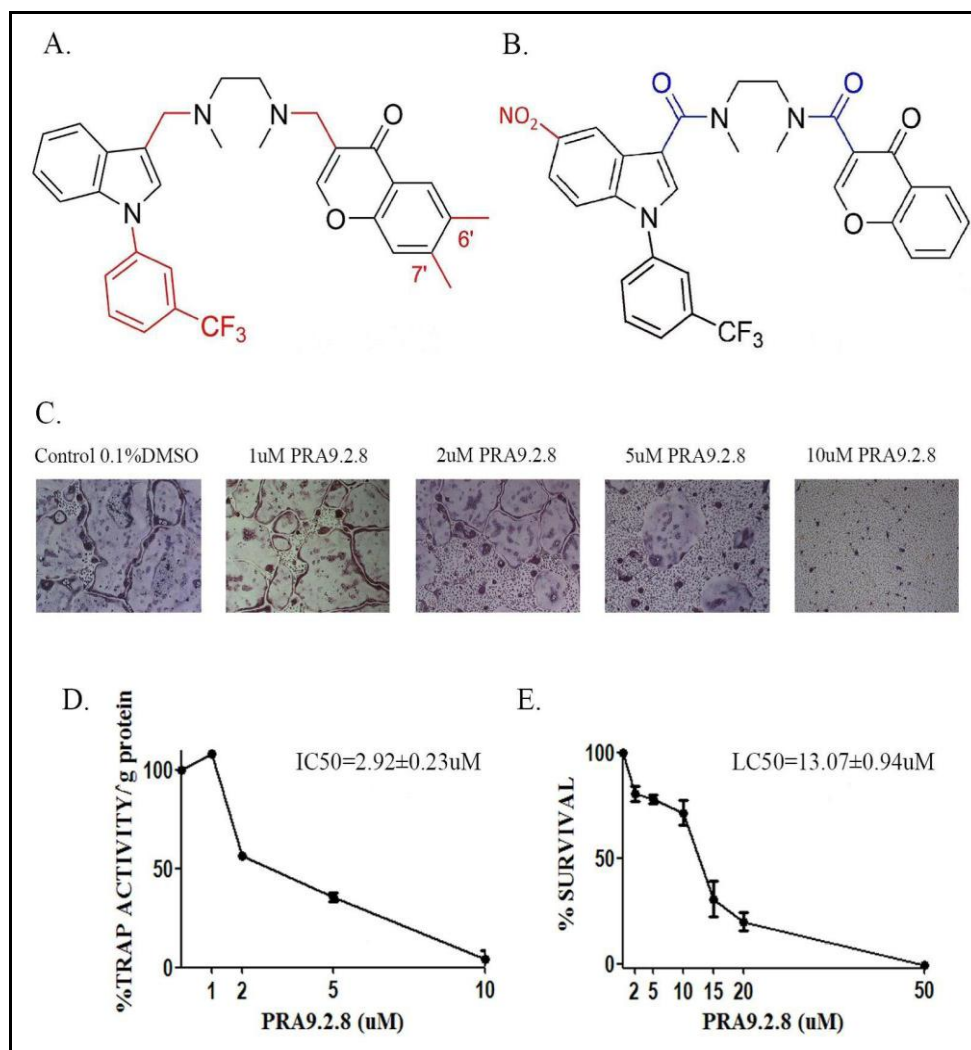
Το μόριο PRA8.2.8 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, και έχει προκύψει ύστερα από αντικατάσταση της διαμίνης σε διαμίδιο, απομάκρυνση και των 2 μεθυλίων της διμεθυλοχρωμόνης και αντικατάσταση του τριφθορομεθύλιου με μια αζωτούχα ομάδα (NO₂). Παρουσιάζει σημαντική αναστολή της οστεοκλαστογένεσης (IC₅₀=1.87 ± 0.23 μM) καθώς και αρκετά μικρότερη τοξικότητα (LC₅₀=51.97 ± 2.64 μM) σε σχέση με το SPD-304 (Εικ. 4.13).



Εικόνα 4.13. Η επίδραση του PRA8.2.8 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. (A) Η χημική δομή του SPD304 και (B) του PRA8.2.8. (C) Παρεμπόδιση της RANKL-επαγόμενης διαδικασίας σχηματισμού οστεοκλαστών σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 1-10 μM. (D) Ποσοτικός προσδιορισμός της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις του PRA8.2.8 από 1-10 μM (IC₅₀=1.87 ± 0.23 μM, n=4). (E) Ποσοτικός προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις του PRA8.2.8 από 10-100 μM (LC₅₀=51.97 ± 2.64 μM, n=4). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

4.7. Αξιολόγηση του αναστολέα PRA9.2.8

Ακόμη ένα μόριο το PRA9.2.8 που παρουσιάζει ενδιαφέρον, το οποίο προκύπτει ύστερα από αντικατάσταση της διαμίνης σε διαμίδιο, απομάκρυνση και των 2 μεθυλίων της διμεθυλοχρωμόνης και πρόσθεση μιας αζωτούχα ομάδα (NO₂) στον ινδολικό δακτύλιο (Εικ. 4.14A-B). Παρουσιάζει καλή αναστολή της οστεοκλαστογένεσης (IC₅₀=2.92 ± 0.23 μM) καθώς και μικρότερη τοξικότητα (LC₅₀=13.07 ± 0.94 μM) σε σχέση με το SPD-304 (Εικ. 4.14C-E).



Εικόνα 4.14. Η επίδραση του PRA9.2.8 στην RANKL-επαγόμενη δοκιμή οστεοκλαστογένεσης και στην επιβίωση των κυττάρων. (A) Η χημική δομή του SPD304 και (B) του PRA9.2.8. (C) Παρεμπόδιση της RANKL-επαγόμενης διαδικασίας σχηματισμού οστεοκλαστών σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 1-10 μM. (D) Ποσοτικός προσδιορισμός της TRAP ενεργότητας σε συγκεντρώσεις του PRA9.2.8 από 1-10 μM (IC₅₀=2.92 ± 0.23 μM, n=3). (E) Ποσοτικός προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων σε συγκεντρώσεις του PRA9.2.8 από 2-50 μM (LC₅₀=13.07 ± 0.94 μM, n=3). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές.

4.8. Προσδιορισμός της ικανότητας δέσμευσης των SPD-304 αναλόγων στην πρωτεΐνη RANKL του ανθρώπου

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν δοκιμάζοντας τα 7 ανάλογα του SPD-304 σε πειράματα οστεοκλαστογένεσης και τοξικότητας δείχνουν ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστικότητα και μειωμένη τοξικότητα σε σχέση με το πρωτότυπο SPD-304. Τα πειραματικά αυτά δεδομένα έρχονται να επιβεβαιώσουν και μια σειρά πειραμάτων προσδιορισμού της ικανότητας δέσμευσης των μορίων αυτών με την πρωτεΐνη-στόχο RANKL. Η ερευνητική ομάδα του καθ. Γιώργου Κοντοπίδη (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) εφάρμοσε *in vitro* πειράματα δέσμευσης για τον υπολογισμό της σταθεράς διάστασης (Kd) του συμπλόκου μικρού μορίου:πρωτεΐνης RANKL (Papanophytou et al. 2013). Στον παρακάτω πίνακα σημειώνονται τα αποτελέσματα πρόσδεσης των εννέα αναστολέων που μελετήθηκαν όπου παρατηρούμε ότι τον μεγαλύτερο βαθμό συγγένειας με τον RANKL εμφανίζουν οι ενώσεις PRA6.2.12, PRA8.2.8 και PRA9.2.8 με Kd ίση με 0.7, 2.18 και 2.82μM αντίστοιχα. Επίσης, υψηλό βαθμό δέσμευσης με τον RANKL εμφανίζουν οι PRA2.2.1, PRA2.2.4, PRA5.2.8 και PRA6.3.12 (Πίνακας 4.II). Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι και τα εννέα ανάλογα του SPD-304 εμφανίζουν μεγαλύτερη προσδετική ικανότητα σε σχέση με το SPD-304 (14.1μM).

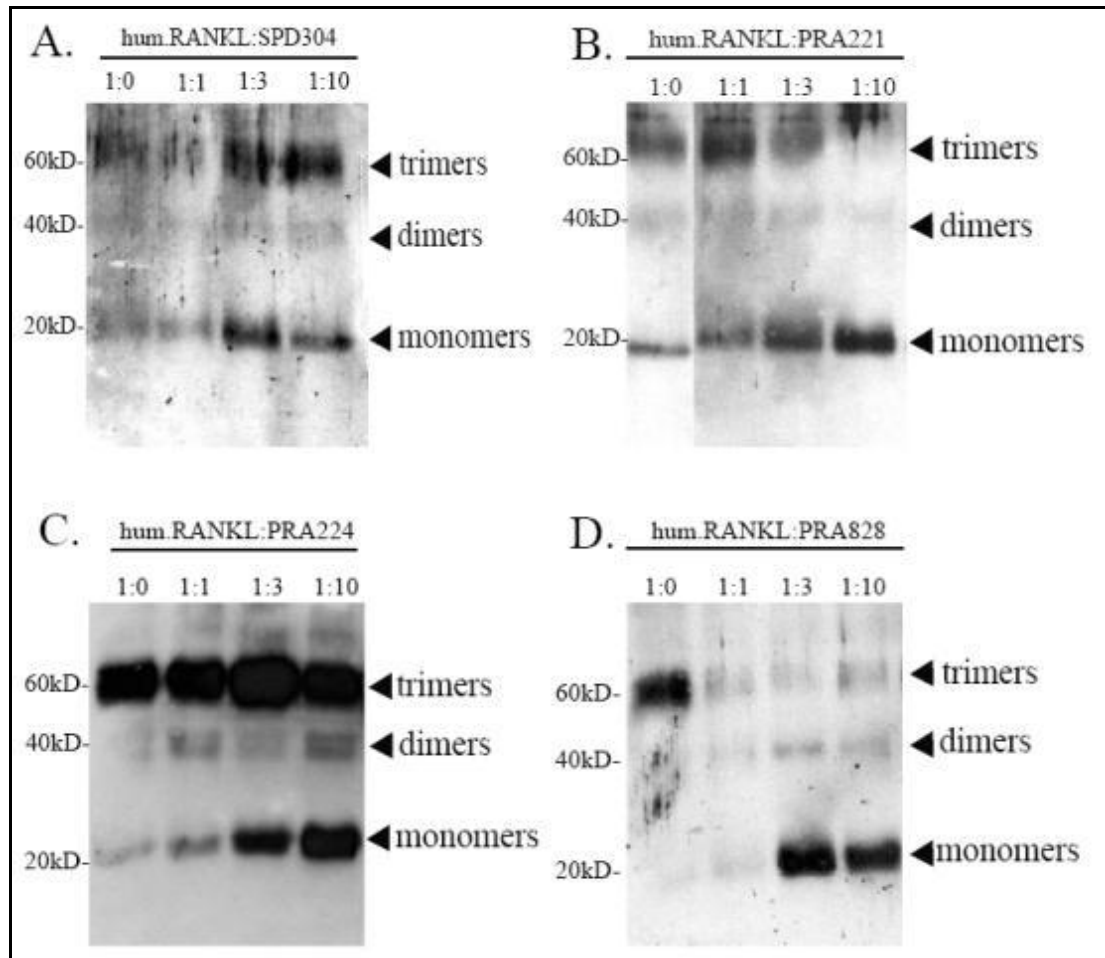
a/a	Compound ID	Kd (μM)
1	PRA_2_2_1	5.24
2	PRA_2_2_2	6.62
3	PRA_2_2_3	8.71
4	PRA_2_2_4	4.9
5	PRA_5_2_8	4.6
6	PRA_6_2_12	0.7
7	PRA_6_3_12	4.6
8	PRA_8_2_8	2.18
9	PRA_9_2_8	2.82
10	SPD-304	14.1

Πίνακας 4.II. Συνοπτικός πίνακας με την σταθερά διάστασης (Kd) των εννέα αναστολέων και του SPD-304.

4.9. Ανίχνευση του ανασταλτικού μηχανισμού δράσης των SPD-304 αναλόγων με την πρωτεΐνη-στόχο RANKL του ανθρώπου

Προηγουμένως, είδαμε ότι το SPD-304 αλληλεπιδρά με τη εξωκυτταρική RANKL πρωτεΐνη του ποντικού τροποποιώντας την φυσική διαμόρφωση αυτής. Ειδικότερα, είδαμε ότι προκαλεί αποσταθεροποίηση του RANKL τριμερούς με ταυτόχρονη αποδέσμευση των μονομερών με πιθανό επακόλουθο την αδυναμία πρόσδεσης στον υποδοχέα RANK που σηματοδοτεί την διαφοροποίηση και ωρίμανση των οστεοκλαστών. Ομοίως, η παρεμποδιστική δράση των SPD-304 αναλόγων σε πειράματα οστεοκλαστογένεσης χρησιμοποιώντας ανθρώπινο RANKL μας ώθησε να διερευνήσουμε τον πιθανό μηχανισμό αναστολής του τριμερισμού της εξωκυτταρικής RANKL πρωτεΐνης του ανθρώπου σε πειράματα cross-linking και ανοσοαποτύπωσης.

Αρχικά, έγινε προεπάση του RANKL με τα μικρά μόρια αναστολείς σε διάφορες μοριακές αναλογίες (1:1), (1:3) και (1:10) διατηρώντας σταθερή την ποσότητα του RANKL. Η μοριακή αναλογία των μικρών μορίων σε κάθε αντίδραση προεπάσης υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό μορίων του RANKL ανά τριμερές έτσι ώστε π.χ ένα μόριο αναστολέα να αντιστοιχεί με ένα μόριο τριμερούς της RANKL πρωτεΐνης (1:1). Σε πειράματα cross-linking δοκιμάσαμε το SPD-304 και τρεις αναστολείς: το PRA2.2.1, PRA2.2.4 και PRA8.2.8. Απουσία κάποιου αναστολέα η RANKL πρωτεΐνη σχηματίζει κανονικά τριμερή, διμερή και μονομερή (1:0). Αντίθετα, παρατηρήσαμε ότι παρουσία του SPD-304 έχουμε σταδιακά αύξηση των διμερών και μονομερών, στοιχείο που υποδηλώνει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης με το τριμερές του RANKL. Επίσης, όταν προσθέσαμε τον αναστολέα PRA2.2.1 παρατηρήσαμε σταδιακή μείωση της έντασης του τριμερούς με ταυτόχρονη αύξηση των μονομερών, όσο αυξάνεται η αναλογία του αναστολέα στην αντίδραση με την RANKL πρωτεΐνη (Εικ. 4.15B). Παρόμοια εικόνα παρατηρήσαμε όταν προσθέσαμε τον αναστολέα PRA2.2.4 όπου είναι εμφανής η αποδέσμευση των μονομερών σε αναλογία (1:3) και (1:10) (Εικ. 4.15C). Τέλος, ο αναστολέας PRA8.2.8 φαίνεται να αποσταθεροποιεί σημαντικά το RANKL τριμερές καθώς σε αναλογία (1:3) και (1:10) παρατηρούμε σημαντική μείωση της έντασης του τριμερούς και αύξηση των μονομερών (Εικ. 4.15D). Συμπερασματικά, παρατηρούμε ότι οι τρεις αναστολείς PRA2.2.1, PRA2.2.4 και PRA8.2.8 εμπλέκονται δραστικά σε έναν παρόμοιο μηχανισμό αποσταθεροποίησης του RANKL τριμερούς όπως το SPD-304 (Εικ. 4.15A), ενώ παράλληλα δίνει μία ερμηνεία της αδυναμίας σχηματισμού οστεοκλαστών παρουσία των αναστολέων.



Εικόνα 4.15. Επίδραση του SPD-304 και των SPD-αναλόγων PRA2.2.1, PRA2.2.4 και PRA8.2.8 στην απελευθέρωση μονομερών. Πειράματα cross-linking και ανοσοαποτύπωση μεταξύ RANKL και (A) SPD-304, (B) PRA2.2.1, (C) PRA2.2.4 και (D) PRA8.2.8 . Οι αναλογίες αναφέρονται στα μόρια πρωτεΐνης ανά τριμερές προς τα μόρια αναστολέα. Η ανοσοαποτύπωση κατά western έγινε χρησιμοποιώντας ένα πολυκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τον ανθρώπινο RANKL. Στην αριστερή πλευρά κάθε ανοσοαποτύπωσης σημειώνονται γνωστά μοριακά βάρη και στη δεξιά οι θέσεις των τριμερών (trimers), διμερών (dimers) και μονομερών (monomers).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

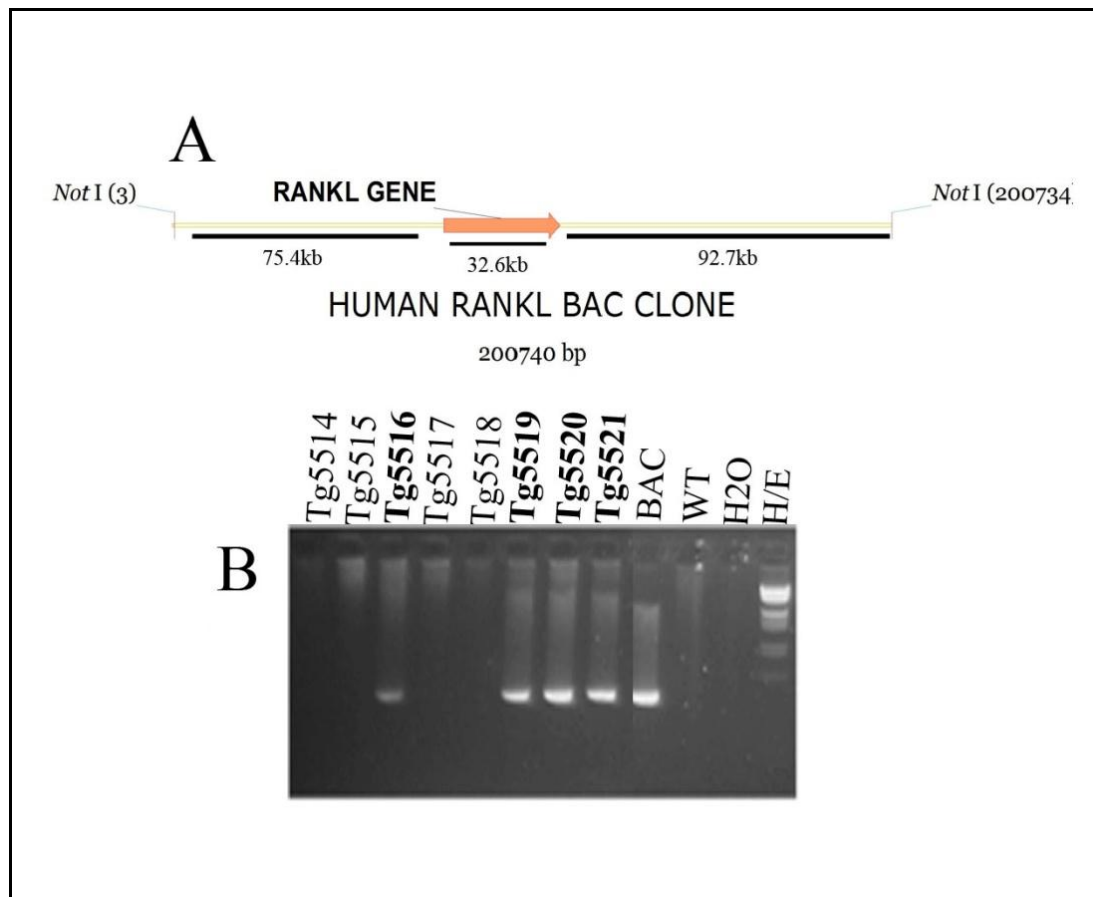
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ 3^ο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΡΟΣ 3^ο: Νέα μοντέλα οστεοπόρωσης που υπερεκφράζουν το huRANKL

5.1 Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών για το γονίδιο RANKL του ανθρώπου

Η δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που υπερεκφράζουν τον RANKL του ανθρώπου αποτέλεσε στόχο στην ερευνητική ομάδα της Δρ Ελένης Ντούνη καθώς ήταν έκδηλη η απουσία ενός αντίστοιχου διαγονιδιακού μοντέλου στην βασική και εφαρμοσμένη έρευνα. Η δημιουργία ενός RANKL διαγονιδιακού μοντέλου σκοπεύει να βοηθήσει στην κατανόηση παθολογικών μηχανισμών που διέπει η υπερέκφραση του RANKL και επιπλέον πιθανόν να αποτελέσει ένα κατάλληλο πρότυπο πειραματικό μοντέλο για την αξιολόγηση νέων αναστολέων του RANKL.

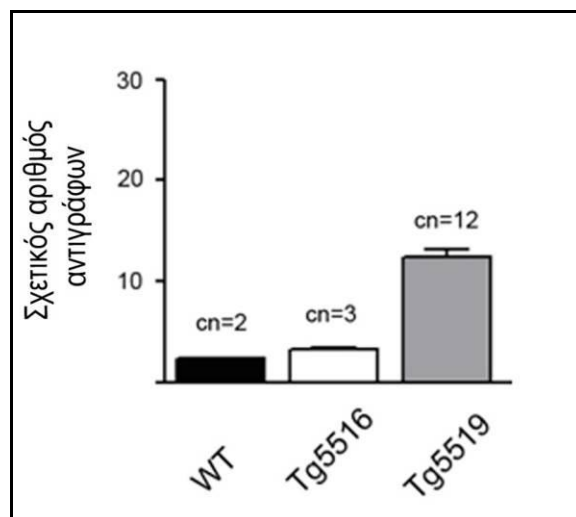
Για να επιτύχουμε φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης του RANKL γονιδίου του ανθρώπου (huRANKL) σε διαγονιδιακά ποντίκια (TghuRANKL), επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε ένα γενωμικό τμήμα 200kb που περιελάμβανε το huRANKL γονίδιο το οποίο απομονώθηκε από ένα κλώνο βακτηριακού τεχνητού χρωμοσώματος (Bacterial Artificial Chromosome, BAC). Τα διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν τόσο μεγάλες γονιδιωματικές κατασκευές, όπως οι BAC κλώνοι, φαίνεται ότι ακολουθούν ένα φυσιολογικό πρότυπο υπερέκφρασης του διαγονιδίου και η έκφραση είναι ανάλογη του αριθμού των αντιγράφων του διαγονιδίου και ανεξάρτητη από φαινόμενα επίδραση θέσης (van Keuren et al. 2009). Από έναν BAC κλώνο (RP11 - 86N24, ImaGenes GmbH, Berlin, Germany) έγινε απομόνωση μιας 200kb γενωμικής περιοχής ύστερα από πέψη με NotI, η οποία περιέχει τις κωδικές περιοχές του huRANKL γονιδίου καθώς και όλες τις ρυθμιστικές περιοχές τόσο στην 5' όσο και στην 3' περιοχή (Εικ. 5.1A). Ακολούθως, έγιναν μικροενέσεις σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων (Douni et al., 2004), όπου τελικώς παραλάβαμε 4 διαγονιδιακούς ιδρυτές (founders): Tg5516, Tg5519, Tg5520 και Tg5521 οι οποίοι έφεραν το διαγονίδιο. Ο διαγονιδιακός ιδρυτής Tg5521 ήταν μωσαϊκός και δεν μελετήθηκε περαιτέρω, ενώ ο Tg5520 δεν έδωσε ποτέ απογόνους. Έτσι, επικεντρωθήκαμε στην μελέτη των δύο διαγονιδιακών ιδρυτών Tg5516 και Tg5519 καθώς ήταν γόνιμοι και έδιναν απογόνους (Εικ. 5.1B).



Εικόνα 5.1. Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών που φέρουν το γονίδιο *huRANKL*. (A) Το γενωμικό τμήμα που χρησιμοποιήθηκε για τις μικροενέσεις σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων. Με πορτοκαλί παριστάνεται η κωδική περιοχή, και με κίτρινο οι περιοχές εκατέρωθεν. Αναγράφονται επίσης τα μεγέθη των τμημάτων σε kb. (B) Αντίδραση PCR ανίχνευσης του διαγονιδίου στους διαγονιδιακούς ιδρυτές, με χρήση ενός ζεύγους εκκινητών που υβριδίζει στο 5' του *huRANKL* αλλά όχι σε εκείνο του ποντικού. DNA από το BAC κλώνο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας ενώ DNA από ένα άγριου τύπου C57BL/6 ποντίκι χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

Σε διασταυρώσεις εδραίωσης των σειρών οι διαγονιδιακοί ιδρυτές Tg5516 και Tg5519 μεταβίβασαν το διαγονίδιο σε αναλογία 50% και στα δύο φύλα σύμφωνα με τις αναμενόμενες μεντελιανές αναλογίες. Ο πρώτος χαρακτηρισμός των διαγονιδιακών σειρών επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό του αριθμού των αντιγράφων του διαγονιδίου που φέρουν. Με ποσοτική ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) χρησιμοποιώντας ένα ζευγάρι εκκινητών που υβριδίζει τόσο στο *huRANKL* όσο και στο *RANKL* του ποντικού (*muRANKL*), έγινε προσδιορισμός του αριθμού των αντιγράφων για τις διαγονιδιακές σειρές Tg5516 και Tg5519. Καταρχήν, σε όλα τα ποντίκια (WT, Tg5516, Tg5519) εντοπίζονται τα 2 αντίγραφα του ενδογενούς *muRANKL* γονιδίου. Η διαγονιδιακή σειρά Tg5516 φέρει επιπλέον ένα αντίγραφο του *huRANKL* ενώ η Tg5519 δέκα επιπλέον αντίγραφα (Εικ. 5.2).

Συμπερασματικά, κατατάσσουμε τις διαγονιδιακές σειρές σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό αντιγράφων: η διαγονιδιακή σειρά την Tg5516 χαρακτηρίζεται ως χαμηλού αριθμού αντιγράφων (low copy) ενώ η Tg5519 ως υψηλού αριθμού αντιγράφων (high copy).

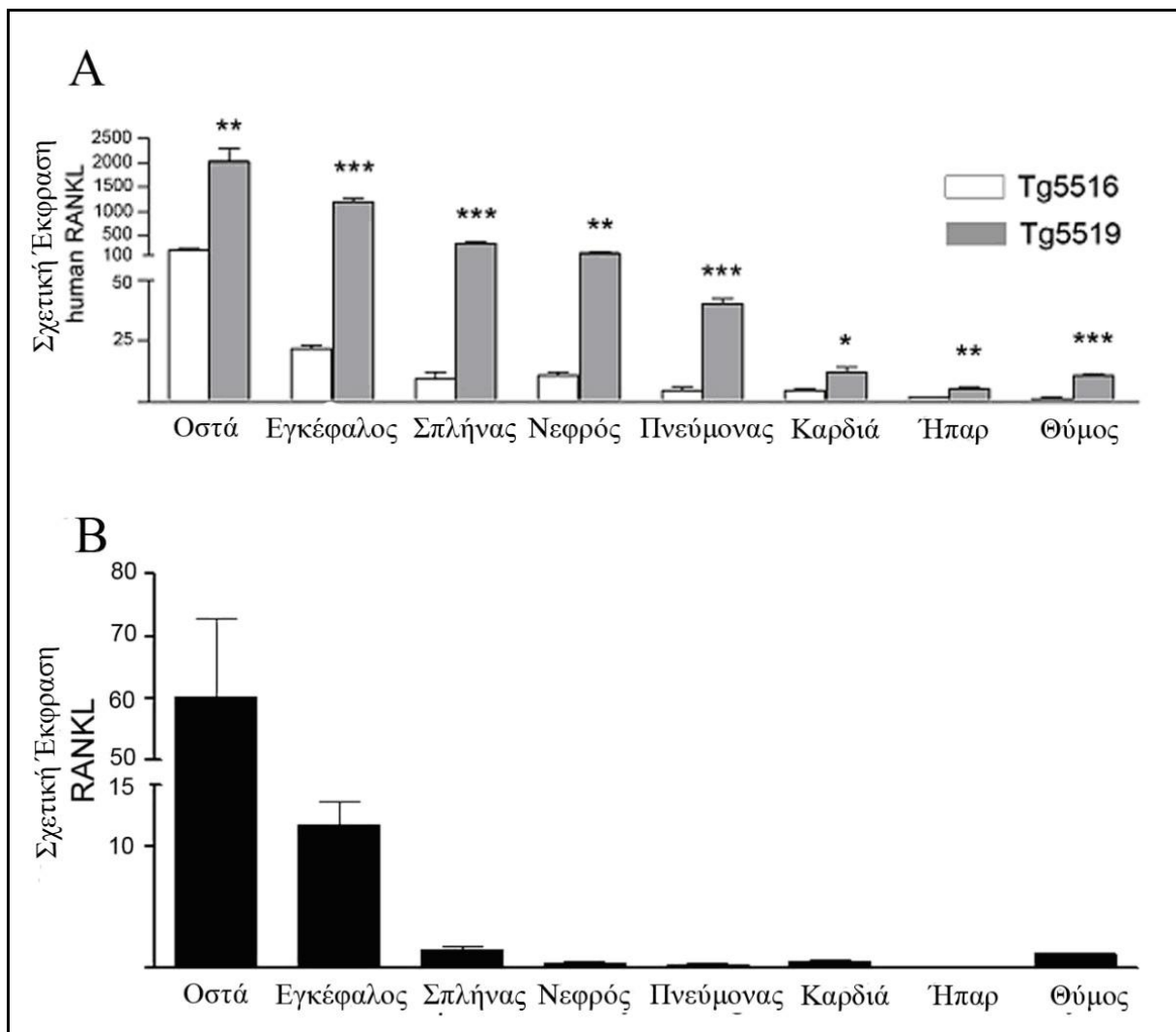


Εικόνα 5.2. Αριθμός αντιγράφων του διαγονιδίου στις διαγονιδιακές σειρές Tg5516 και Tg5519. Με χρήση qPCR, έγινε προσδιορισμός του συνολικού αριθμού των αντιγράφων (cn=cory number) του RANKL τόσο του διαγονιδίου (huRANKL) στις διαγονιδιακές σειρές Tg5516 και Tg5519 (n=8-9 ανά ομάδα) όσο και του ενδογενούς muRANKL.

5.2 Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου RANKL του ανθρώπου και του ποντικού στα Tg5516 και Tg5519 ποντίκια

Με βάση τον αριθμό των αντιγράφων που φέρουν οι δύο διαγονιδιακές σειρές Tg5516 και Tg5519 αναμένουμε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL συγκριτικά μεταξύ τους. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου huRANKL σε διάφορους ιστούς όπως οστά, εγκέφαλο, θύμο, σπλήνα, ήπαρ, νεφρό, πνεύμονα και καρδιά ανάμεσα στις δύο διαγονιδιακές σειρές χρησιμοποιώντας ένα ζευγάρι εκκινητών που υβριδίζει μόνο με το γονίδιο huRANKL. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η Tg5519 διαγονιδιακή σειρά (high copy) εμφανίζει τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του ανθρώπινου RANKL σε όλους τους προς εξέταση ιστούς-όργανα σε σχέση με την Tg5516 διαγονιδιακή σειρά (low copy). Ειδικότερα, παρατηρούμε τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε οστά, εγκέφαλο, σπλήνα και νεφρά (Εικ. 5.3A).

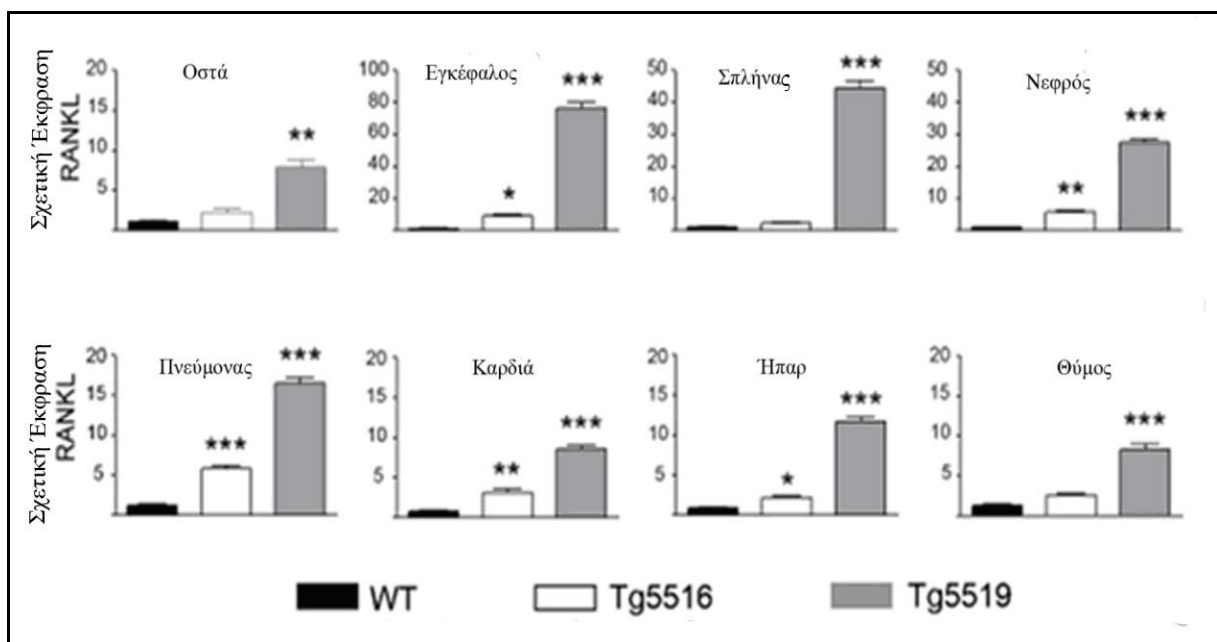
Επιπλέον, προσδιορίσαμε το πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου muRANKL στους ίδιους προς εξέταση ιστούς σε άγριου τύπου ποντίκια ηλικίας 2 μηνών χρησιμοποιώντας ένα ζευγάρι εκκινητών που υβριδίζει τόσο στο huRANKL όσο και στο muRANKL. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το γονίδιο muRANKL εμφανίζει το ίδιο πρότυπο έκφρασης με το διαγονίδιο σε όλους τους ιστούς με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε οστά, εγκέφαλο και σπλήνα (Εικ. 5.3B). Συμπερασματικά, λοιπόν βλέπουμε ότι το πρότυπο έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL σε όλους τους ιστούς στις διαγονιδιακές σειρές Tg5516 και Tg5519 ακολουθεί το ίδιο φυσιολογικό πρότυπο έκφρασης του ενδογενούς muRANKL.



Εικόνα 5.3. Συγκριτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του huRANKL σε διάφορους ιστούς μεταξύ των Tg5516 και Tg5519 ποντικών και πρότυπο έκφρασης του muRANKL. (A) Ποσοτική ανάλυση με qPCR των επιπέδων έκφρασης του huRANKL γονιδίου μεταξύ ποντικών των Tg5516 και Tg5519 διαγονιδιακών σειρών ηλικίας 2 μηνών (n=3, ανά ομάδα) σε διάφορους ιστούς όπως οστά, εγκέφαλο, σπλήνα, νεφρό, πνεύμονα, καρδιά, ήπαρ και θύμο. **(B)** Ποσοτική ανάλυση με qPCR των επιπέδων έκφρασης του ενδογενούς muRANKL

γονιδίου σε άγριου τύπου ποντίκια ηλικίας 2 μηνών σε διάφορους ιστούς όπως οστά, εγκέφαλο, σπλήνα, νεφρό, πνεύμονα, καρδιά, ήπαρ και θύμο ($n=3$, ανά ομάδα). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($*p<0.05$, $**p\leq 0.01$, $***p\leq 0.001$).

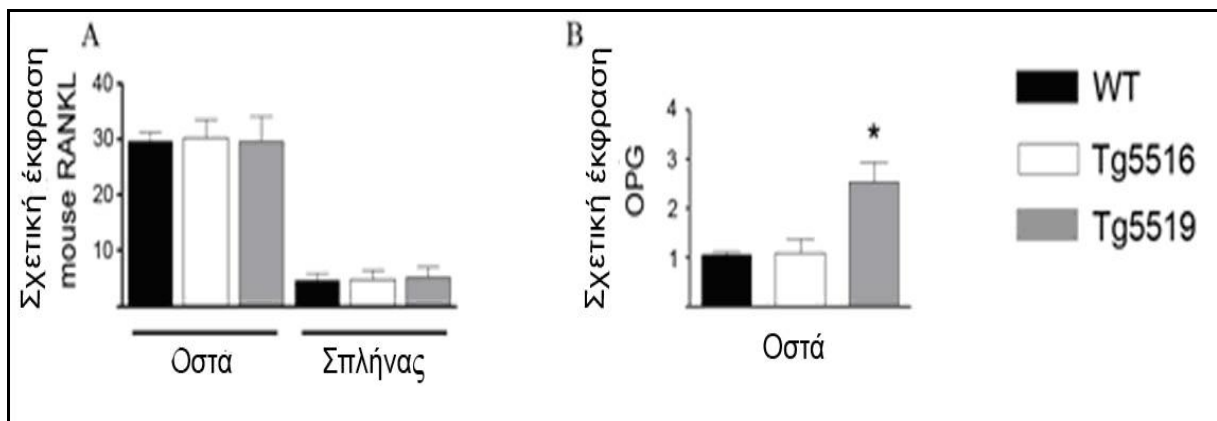
Για να επιτευχθεί μία συγκριτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του huRANKL διαγονιδίου και του ενδογενούς muRANKL γονιδίου σε διάφορους ιστούς των Tg5516, Tg5519 και WT ποντικών χρησιμοποιήσαμε ένα ζευγάρι εκκινητών που υβριδίζει τόσο με το huRANKL όσο και το muRANKL. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των διαγονιδιακών σειρών Tg5516, Tg5519 και άγριου τύπου WT ποντίκια ηλικίας 2 μηνών στους ιστούς που προαναφέρθηκαν. Παρατηρήσαμε ότι τα Tg5516 ποντίκια εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του RANKL σε σχέση με τα άγριου τύπου ποντίκια σε αρκετούς ιστούς όπως εγκέφαλο, νεφρό, πνεύμονα, καρδιά και ήπαρ. Επίσης, τα Tg5519 ποντίκια υπερεκφράζουν τον RANKL σε όλους τους ιστούς συγκριτικά με τα Tg5516 και τα WT ποντίκια (Εικ. 5.4).



Εικόνα 5.4. Συγκριτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του RANKL σε διάφορους ιστούς μεταξύ Tg5516, Tg5519 και WT ποντικών. Ποσοτική ανάλυση με qPCR των επιπέδων έκφρασης του RANKL γονιδίου (ανθρώπου και ποντικού) μεταξύ των Tg5516, Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 2 μηνών ($n=3$, ανά ομάδα) σε διάφορους ιστούς όπως οστά, εγκέφαλο, σπλήνα, νεφρό, πνεύμονα, καρδιά, ήπαρ και θύμο. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα ($*p<0.05$, $**p\leq 0.01$, $***p\leq 0.001$).

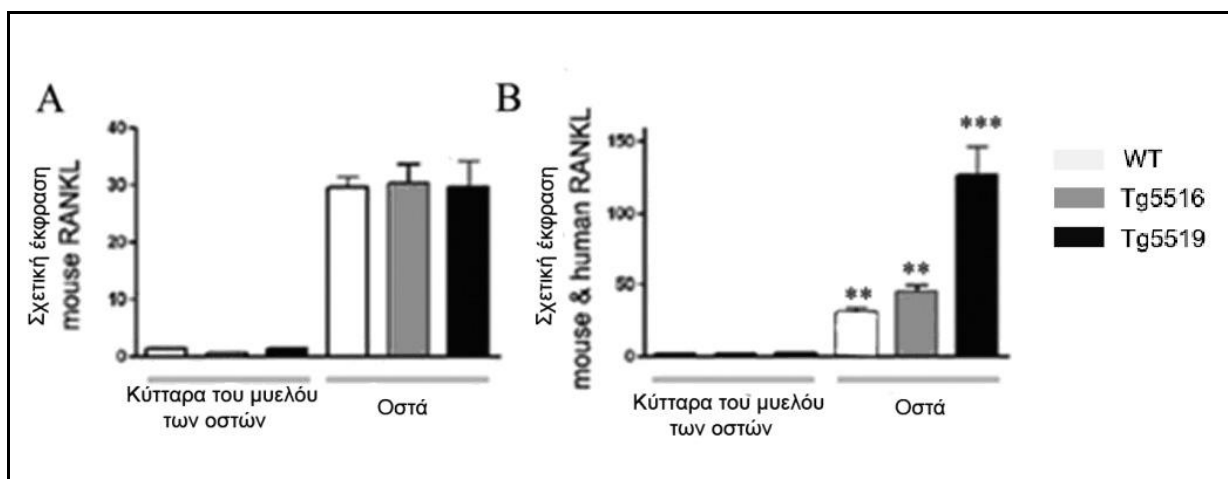
Ωστόσο, η υπερέκφραση του huRANKL στις διαγονιδιακές σειρές δεν γνωρίζουμε αν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς muRANKL. Έτσι χρησιμοποιώντας ένα ζευγάρι εκκινητών που υβριδίζει μόνο με το muRANKL θελήσαμε να διερευνήσουμε αν διαφοροποιούνται τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς RANKL στα διαγονιδιακά ποντίκια σε σχέση με του άγριου τύπου ποντίκια. Ειδικότερα στους ιστούς που παρατηρούμε τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου όπως τα οστά και τον σπλήνα, παρατηρούμε ότι δεν μεταβάλλονται τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς muRANKL γονιδίου μεταξύ διαγονιδιακών ποντικών και άγριου τύπου ποντικών τόσο στα οστά όσο και στην σπλήνα (Εικ. 5.5A).

Επίσης, θελήσαμε να διερευνήσουμε πιθανή αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του φυσικού αναστολέα της RANKL του OPG λόγω της υπερέκφρασης του διαγονιδίου μεταξύ των Tg5516, Tg5519 και των άγριου τύπου ποντικών. Έτσι, μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης του OPG γονιδίου του ποντικού στα οστά καθώς εκεί εντοπίζουμε την μεγαλύτερη έκφραση του huRANKL διαγονιδίου. Παρατηρήσαμε ότι δεν υπάρχει κάποια διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του OPG γονιδίου μεταξύ Tg5516 και WT ποντικών, ενώ εντοπίζεται αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του OPG στα Tg5519 ποντίκια περίπου 3 φορές σε σχέση με τα WT ποντίκια (Εικ. 5.5B). Η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του OPG γονιδίου ίσως αποτελεί έναν μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης έναντι της υπερέκφρασης του huRANKL διαγονιδίου με σκοπό την εξισορρόπηση της οστικής απώλειας.



Εικόνα 5.5. Συγκριτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του ενδογενούς RANKL και OPG γονιδίου. (A) Ποσοτική ανάλυση με qPCR των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου muRANKL στα οστά και τον σπλήνα μεταξύ Tg5516, Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 2 μηνών (n=3, ανά ομάδα). **(B)** Ποσοτική ανάλυση με qPCR των επιπέδων έκφρασης του OPG γονιδίου στα οστά μεταξύ Tg5516, Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 2 μηνών (n=3, ανά ομάδα). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέσοι όροι ± τυπικό σφάλμα (* $p < 0.05$).

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι τα οστεοκύτταρα, δηλαδή οι ώριμοι οστεοβλάστες που βρίσκονται «παγιδευμένοι» μέσα στα οστά, αποτελούν την κύρια πηγή έκφρασης του RANKL (Nakashima et al. 2011), κάτι το οποίο θελήσαμε να ελέγξουμε στα TgRANKL διαγονιδιακά ποντίκια. Ο πειραματικός σχεδιασμός που ακολουθήσαμε περιλαμβάνει την συγκριτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL στα κύτταρα του μυελού των οστών και στα οστά όπου έχει γίνει εξώθηση των κυττάρων του μυελού των οστών οπότε ο κύριος κυτταρικός τύπος είναι τα οστεοκύτταρα. Χρησιμοποιώντας ένα ζευγάρι εκκινητών που υβριδίζει μόνο με το ενδογενές muRANKL παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του RANKL στα οστά είναι σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τα κύτταρα του μυελού των οστών, ενώ αναλύοντας στους ίδιους ιστούς τα επίπεδα του RANKL τόσο του ποντικού όσο και του ανθρώπου ανάμεσα σε άγριου τύπου ποντίκια, Tg5516 και Tg5519 διαπιστώσαμε ότι τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης εντοπίζονται στη σειρά Tg5519.

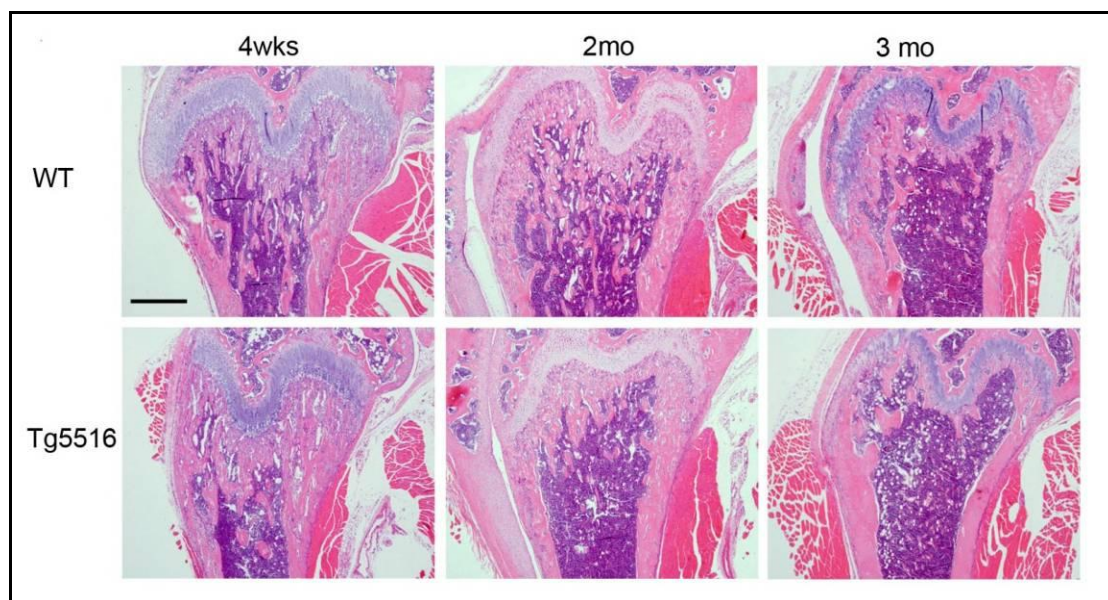


Εικόνα 5.6. Ο RANKL εκφράζεται κυρίως στα οστά των μακρών οστών τόσο στα διαγονιδιακά Tg5516 και Tg5519 ποντίκια όσο και στα άγριου τύπου ποντίκια. Ποσοτική ανάλυση με qPCR των επιπέδων έκφρασης του (A) muRANKL και (B) RANKL (ανθρώπου και ποντικού) στα κύτταρα του μυελού των οστών και τα μακρά οστά μεταξύ των Tg5516, Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 2 μηνών (n=3, ανά ομάδα). Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

5.3 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των Tg5516 ποντικών

Τα Tg5516 ποντίκια δεν παρουσιάζουν κάποια φαινοτυπική ή σωματική διαφορά σε σχέση με τα άγριου τύπου αδέρφια τους, είναι γόνιμα και μεταβιβάζουν το διαγονίδιο κανονικά στην επόμενη γενεά σε αναλογία 50% και στα δύο φύλα. Τα Tg5516 ποντίκια εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου *huRANKL* στα οστά, γεγονός που μας οδήγησε στην ιστολογική ανάλυση των μακρών οστών και ειδικότερα του άνω μηριαίου. Η ιστολογική μελέτη στα οστά των Tg5516 ποντικών περιελάμβανε την απομόνωση και προετοιμασία λεπτών τομών του ισχίου πάχους 5μm από τρεις διαφορετικές ηλικίες των Tg5516 ποντικών, 4 εβδομάδων, 2 μηνών και 3 μηνών, και χρώση με αιματοξυλίνη/ηωσίνη για ιστολογική παρατήρηση του σπογγώδους και φλοιώδους οστού. Η ιστολογική ανάλυση έδειξε ότι τα Tg5516 ποντίκια, αρσενικά και θηλυκά, από την ηλικία των 2 μηνών εμφανίζουν σημαντική μείωση του σπογγώδους οστού στην περιοχή της μετάφυσης η οποία γίνεται ακόμη πιο εμφανής σε ηλικία 3 μηνών (Εικ. 5.7). Αντίθετα, τα Tg5516 ποντίκια δεν εμφανίζουν κάποια αλλοίωση στην δομή του φλοιώδους οστού στην περιοχή της μέσο-μετάφυσης και διάφυσης του μηριαίου σε σχέση με τα WT αδέρφια τους.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι τα Tg5516 διαγονιδιακά ποντίκια παρουσιάζουν στοιχεία ήπιας οστεοπόρωσης που χαρακτηρίζεται από αυξημένη οστική απώλεια του σπογγώδους οστού στην περιοχή της μετάφυσης.

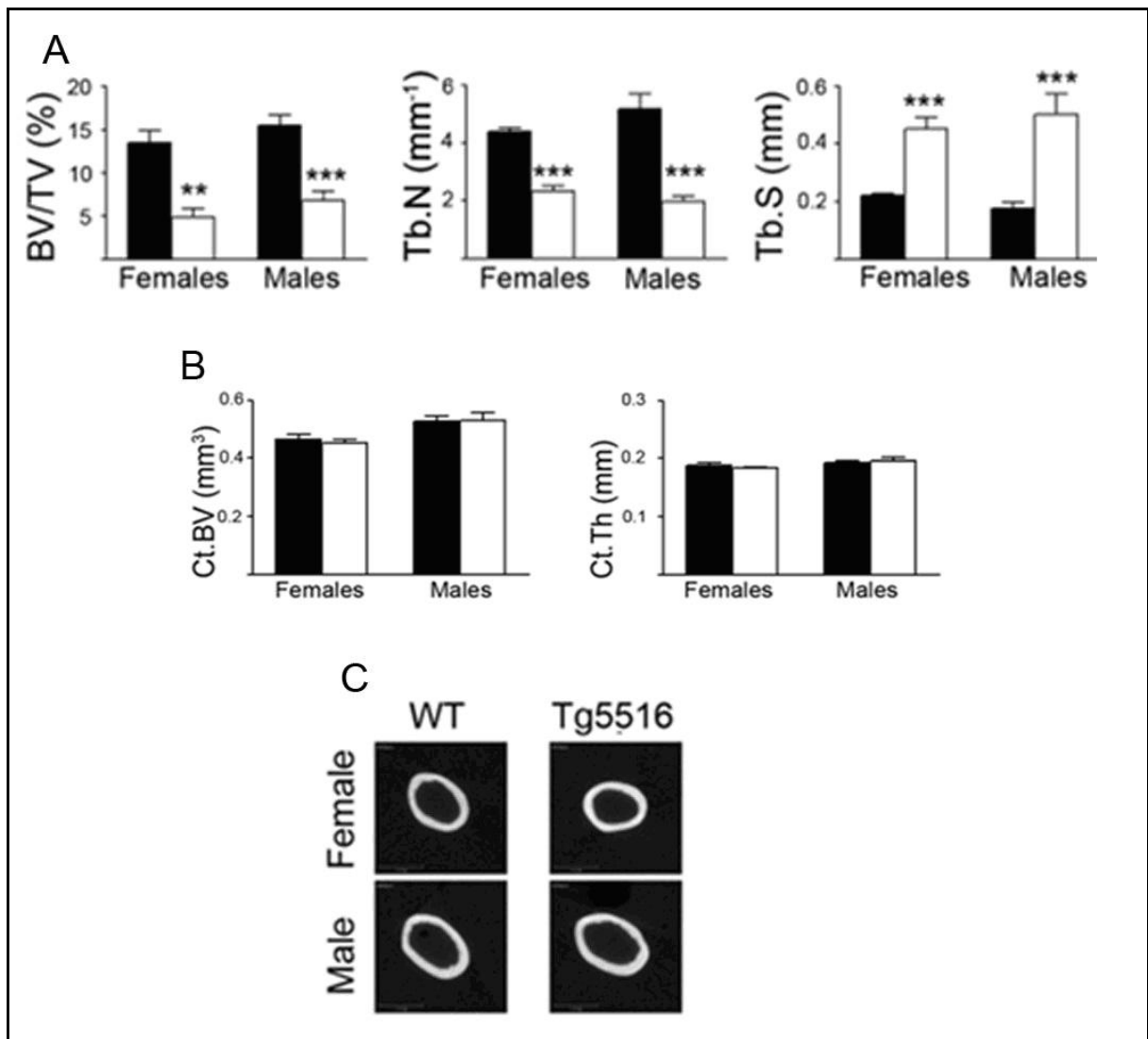


Εικόνα 5.7. Μείωση του σπογγώδους οστού στα Tg5516 ποντίκια ηλικίας 2 και 3 μηνών. Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες στην περιοχή της μετάφυσης της κεφαλής του μηριαίου όπου διακρίνεται η απώλεια του σπογγώδους οστού στα Tg5516 σε σχέση με τα WT ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων, 2 μηνών και 3 μηνών. Χρώση αιματοξυλίνη/ηωσίνη, κλίμακα στις φωτογραφίες 500μm.

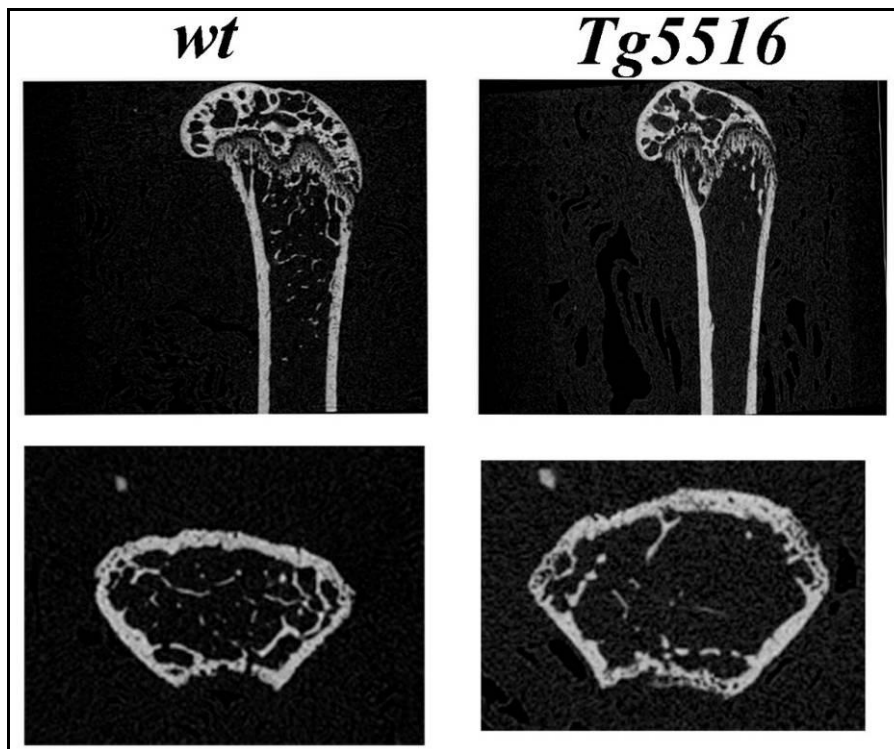
5.4 Ποσοτική ανάλυση του σπογγώδους οστού στα Tg5516 ποντίκια με μικροτομογραφία

Τα παραπάνω ιστολογικά ευρήματα επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με μικροτομογραφία υψηλής διακριτικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τον καθηγητή Pierre Jurdic από το Πανεπιστήμιο της Λυών, αναλύοντας διάφορες παραμέτρους που προσδιορίζουν ποιοτικά και ποσοτικά τη σπογγώδη και φλοιώδη μοίρα των οστών. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά σε Tg5516 ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων και 3 μηνών (αρσενικά και θηλυκά) έγινε ανάλυση των οστικών παραμέτρων στην περιοχή της κεφαλής του μηριαίου όπου προσδιορίστηκε η ποσοστιαία αναλογία του σπογγώδους οστού (BV/TV %) η οποία εμφανίζει μείωση περίπου 2.5 φορές. Επίσης, σημαντικά μειωμένος εμφανίζεται ο αριθμός των μικροδοκίδων του σπογγώδους οστού (Trabecular number, Tb. N) περίπου 50% ενώ το δίκτυο των μικροδοκίδων του σπογγώδους οστού παρουσιάζει πιο εκτενή διασπορά (Trabecular separation, Tb. S) περίπου 150% σε σχέση με τις αντίστοιχες παραμέτρους των WT ποντικών (Εικ. 5.8A). Η μικροτομογραφία αποκαλύπτει επίσης οστική απώλεια του σπογγώδους στα Tg5516 ποντίκια σε ηλικία 2 μηνών (Εικ. 5.9).

Ανάλυση του φλοιώδους οστού στην περιοχή της διάφυσης του μηριαίου δεν αποκάλυψε κάποια διαφορά μεταξύ των Tg5516 και WT ποντικών αναλύοντας τόσο το πάχος (Ct. th.) όσο και την οστική μάζα του φλοιώδους οστού (Ct. Bv) (Εικ. 5.8B-C).

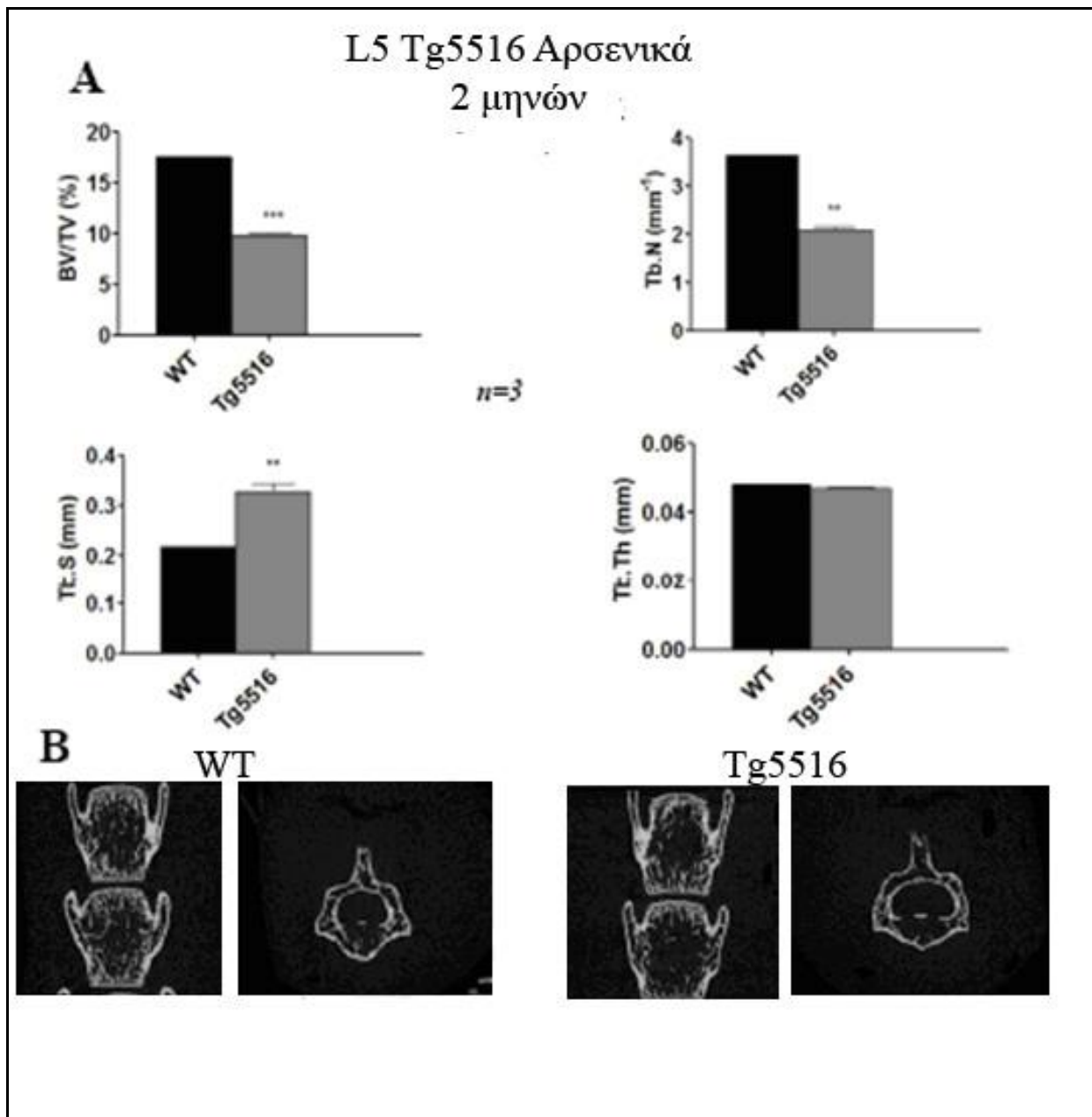


Εικόνα 5.8. Οστική απώλεια στο σπογγώδες οστό των Tg5516 ποντικών. (A) Ποσοτική ανάλυση με μικροτομογραφία του σπογγώδους οστού στην περιοχή της μετάφυσης του μηριαίου μεταξύ Tg5516 και WT ποντικών ηλικίας 3 μηνών (n=7, ανά ομάδα και φύλο). BV/TV (όγκος σπογγώδους/συνολικός όγκος του οστού, %), Tb.N (αριθμός μικροδοκίδων του σπογγώδους ανά mm), Tb.S (διασπορά του σπογγώδους, mm). **(B)** Ποσοτική ανάλυση με μικροτομογραφία του φλοιώδους οστού στην περιοχή της διάφυσης του μηριαίου μεταξύ Tg5516 και WT ποντικών ηλικίας 3 μηνών (n=5, ανά φύλο). Ct.BV (όγκος του φλοιώδους οστού, mm³), Ct.Th (πάχος του φλοιώδους, mm). **(C)** Αντιπροσωπευτικές εγκάρσιες τομές του φλοιώδους οστού στην περιοχή της διάφυσης από Tg5516 και WT ποντίκια με μικροτομογράφο. Τα γραφήματα δείχνουν τους μέσους όρους ± τυπικό σφάλμα; **p<0.01, *** p<0.001.



Εικόνα 5.9. Επιμήκειες και εγκάρσιες εικόνες της περιοχής του μηριαίου από Tg5516 και WT ποντίκια ηλικίας 2 μηνών με μικροτομογράφο υψηλής ανάλυσης τύπου Skyscan1172. Σάρωση με ανάλυση 6μm και απεικόνιση της περιοχής της κεφαλής του μηριαίου από Tg5516 και WT ποντίκια ηλικίας 2 μηνών όπου διακρίνεται σημαντική μείωση του πλέγματος του σπογγώδους οστού στην περιοχή της μετάφυσης (επιμήκης και εγκάρσια απεικόνιση της περιοχής της μετάφυσης του ισχίου). Οι εικόνες επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού Dataviewer της Brucker.

Πέρα από τα μακρά οστά του μηριαίου πραγματοποιήσαμε ανάλυση και στον 5^ο σπόνδυλο της οσφυϊκής μοίρας μετρώντας το σπογγώδες οστό που κυρίως εντοπίζεται στο σώμα του σπόνδυλου (Εικ. 5.10) χρησιμοποιώντας τον μικροτομογράφο τύπου Skyscan1172 που βρίσκεται στις εγκαταστάσεις του Ε.ΚΕ.Β.Ε. Αλ.Φλέμιγκ. Η ανάλυση έδειξε ότι τα Tg5516 ποντίκια ηλικίας 2 μηνών εμφανίζουν μείωση του σπογγώδους οστού στο σώμα του 5^{ου} και 6^{ου} σπόνδυλου σε σχέση με τα WT και ειδικότερα παρατηρήθηκε μείωση της αναλογίας BV/TV του σπογγώδους οστού περίπου 50%, μείωση του αριθμού των μικροδοκίδων του σπογγώδους περίπου 47% και αύξηση της διασποράς του πλέγματος μικροδοκίδων στο σπογγώδες οστό περίπου 60% (Εικ. 5.10Α-Β).

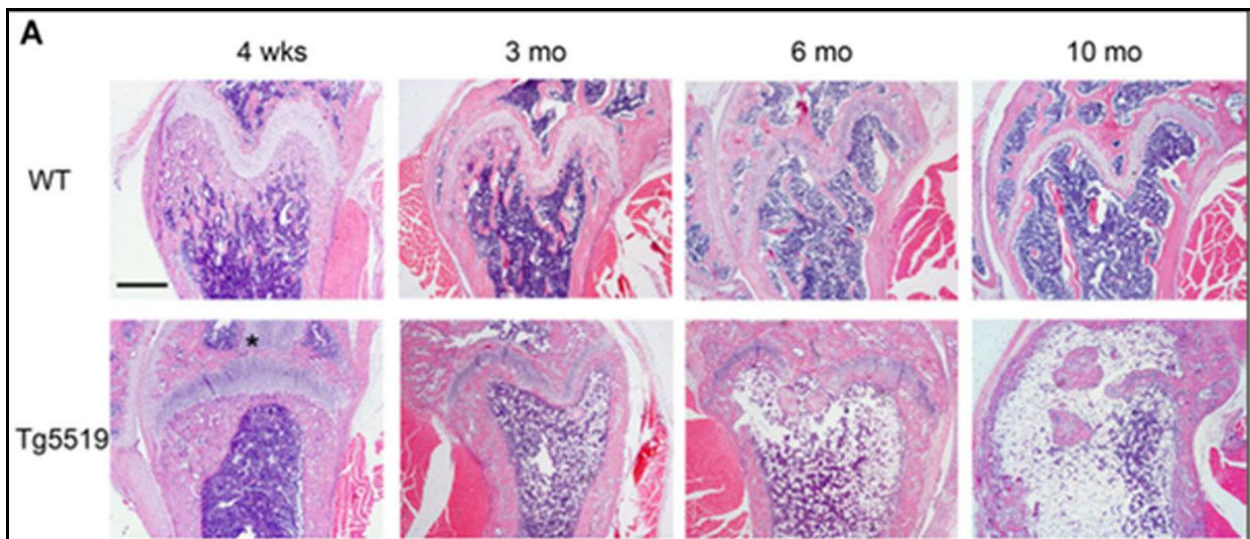


Εικόνα 5.10. Ποσοτικοποίηση με μικροτομογραφία της οστικής απώλειας των σπονδύλων της οσφυϊκής μοίρας των Tg5516 ποντικών. (Α) Ποσοτική ανάλυση του σπογγώδους οστού στο κεντρικό σώμα του 5^{ου} σπόνδυλου της οσφυϊκής μοίρας μεταξύ αρσενικών Tg5516 και WT ποντικών ηλικίας 2 μηνών (*n*=5, ανά ομάδα). BV/TV (όγκος σπογγώδους/συνολικός όγκος, %), Tb.N (αριθμός μικροδοκίδων του σπογγώδους ανά mm), Tb.S (διασπορά του σπογγώδους, mm), Tb.Th. (πάχος του σπογγώδους, mm). **(Β)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες του 5^{ου} και 6^{ου} σπόνδυλου της οσφυϊκής μοίρας με μικροτομογράφο υψηλής ανάλυσης Skyscan1172 της Brucker. Σάρωση με ανάλυση 6μm και απεικόνιση στη σειρά του 5^{ου} και 6^{ου} σπόνδυλου της οσφυϊκής μοίρας όπου διακρίνεται η μείωση του σπογγώδους οστού στο σώμα των σπονδύλων μεταξύ των Tg5516 και WT ποντικών ηλικίας 2 μηνών (επιμήκης και εγκάρσια απεικόνιση των σπονδύλων της οσφυϊκής μοίρας). Οι εικόνες επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού Dataviewer της Brucker. Τα γραφήματα δείχνουν τους μέσους όρους ± τυπικό σφάλμα; ***p*<0.01, *** *p*<0.001.

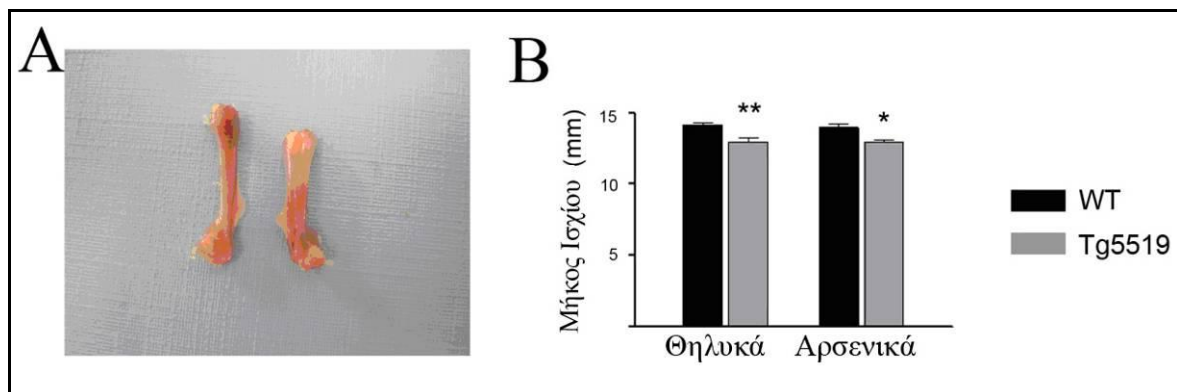
5.5 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των Tg5519 ποντικών

Ενώ τα Tg5519 ποντίκια δεν εμφανίζουν κάποιο ορατή φαινοτυπική παρέκκλιση, ωστόσο προχωρήσαμε σε ιστολογική παρατήρηση της μικροδομής και συνεκτικότητας του σπογγώδους και φλοιώδους οστού του μηριαίου καθώς η συγκριτική ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του διαγονιδίου huRANKL στα οστά έδειξε σημαντική αύξηση. Ιστολογική ανάλυση των μακρών οστών και ειδικότερα της περιοχής της μετάφυσης του μηριαίου στα Tg5519 ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων κατέδειξε ήδη σημαντική απώλεια του σπογγώδους οστού. Αντίθετα, τα WT ποντίκια διακρίνονται για την ύπαρξη ισχυρής συνεκτικότητας μεταξύ των οστικών δοκίδων του σπογγώδους, οι οποίες σχηματίζουν ένα καλά οργανωμένο και συμπαγές πλέγμα. Επίσης, στα Tg5519 ποντίκια ηλικίας 4 εβδομάδων παρατηρήθηκαν δυσμορφίες του χόνδρου στην επιφυσιακή περιοχή του ισχίου όπου εντοπίζονται υπολείματα του χόνδρου, ενώ σε ηλικία 3 μηνών συναντάται εκτοπική συσσώρευση χόνδρου στην περιοχή της μετάφυσης (Εικ. 5.11A). Παράλληλα με τις μη φυσιολογικές εναποθέσεις του χόνδρου διακρίνουμε και αποδιοργάνωση της δομής της αναπτυξιακής πλάκας η οποία είναι εμφανής από την ηλικία των 3 μηνών ενώ σταδιακά παρατηρούμε πλήρη αποδιοργάνωση και καταστροφή της αναπτυξιακής πλάκας σε ηλικία 10 μηνών (Εικ. 5.11A).

Αν και στα Tg5519 ποντίκια ηλικίας 1 με 2 μηνών δεν εμφανίζεται κάποια αλλοίωση στην κυτταρική δομή και οργάνωση της αναπτυξιακής πλάκας, ωστόσο ο αριθμός των κυττάρων στις κυτταρικές στοιβάδες ηρεμίας/πολλαπλασιασμού στην αναπτυξιακή πλάκα είναι αυξημένος υποδηλώνοντας υψηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων που δικαιολογεί και τις μη φυσιολογικές εναποθέσεις χόνδρου πολύ κοντά στην αναπτυξιακή πλάκα. Παρ'όλα αυτά, τα Tg5519 δεν εμφανίζουν κάποια σημαντική αναπτυξιακή υστέρηση ωστόσο το μήκος του μηριαίου οστού των Tg5519 ποντικών παρουσιάζει μία μείωση της τάξης του 14% σε σχέση με τα φυσιολογικού τύπου ποντίκια ηλικίας 3 μηνών (Εικ. 5.12A-B).

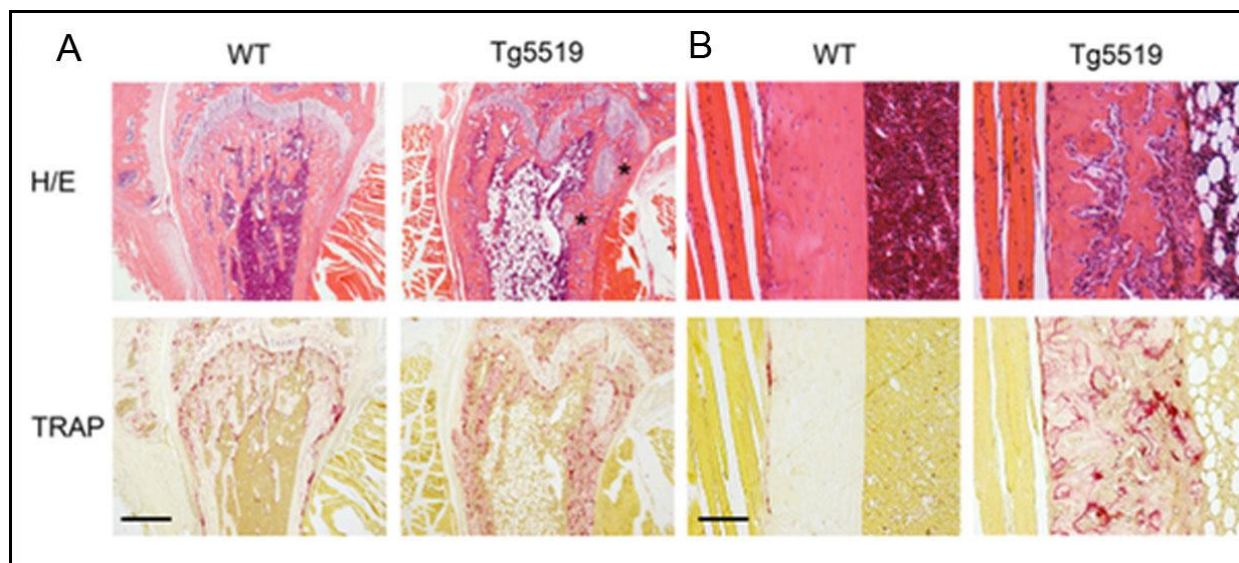


Εικόνα 5.11. Τα Tg5519 ποντίκια εμφανίζουν έντονα οστεοπορωτικά στοιχεία όπως απώλεια του σπογγώδους οστού, σταδιακή καταστροφή της αυξητικής πλάκας και αυξημένη λιπογέννηση στο μυελό των οστών. Αντιπροσωπευτικές εικόνες στην περιοχή της μετάφυσης του μηριαίου Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 1, 3, 6 και 10 μηνών (n=6, ανά ομάδα). Χρώση των οστών με αιματοξυλίνη/ηωσίνη όπου διακρίνεται η απώλεια του σπογγώδους στην περιοχή της μετάφυσης. Με αστερίσκο υποδηλώνονται οι έκτοπες θέσεις εναπόθεσης χόνδρου ενώ από την ηλικία των 6 μηνών διακρίνεται προοδευτική καταστροφή της αυξητικής πλάκας και κάλυψη της κοιλότητας του μυελού των οστών από μεγάλα λιποκύτταρα (λευκές κυκλικές δομές κυττάρων). Κλίμακα των φωτογραφιών τα 500μm.



Εικ. 5.12. Τα Tg5519 ποντίκια εμφανίζουν μειωμένο μήκος στο μηριαίο οστό. (A) Μακροσκοπική άποψη του μηριαίου οστού σε WT και Tg5519 ποντίκια ηλικίας 3 μηνών. (B) Προσδιορισμός του μήκους του μηριαίου οστού των Tg5519 και WT ηλικίας 3 μηνών (n=5 θηλυκά, n=4 αρσενικά, ανά γονότυπο). Το γράφημα δείχνει τους μέσους όρους ± τυπικό σφάλμα; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

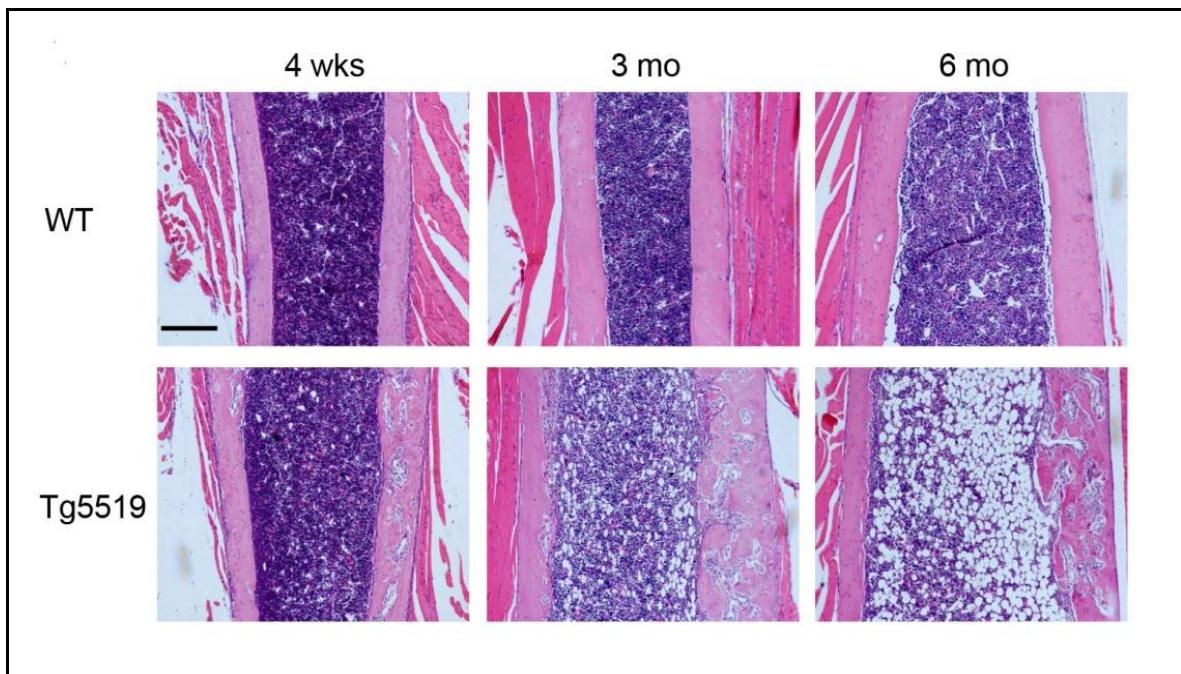
Ένα ακόμη πολύ σημαντικό παθολογικό εύρημα που ουσιαστικά χαρακτηρίζει την διαγονιδιακή σειρά Tg5519 είναι η αυξημένη οστική απώλεια του φλοιώδους οστού που χαρακτηρίζεται από αυξημένη πορώδη δομή στην περιοχή της μετάφυσης και της μέσο-διάφυσης, ήδη από την ηλικία των 4 εβδομάδων. Η έντονη οστική απώλεια που παρατηρείται τόσο στο σπογγώδες όσο και στο φλοιώδες οστό οφείλεται στην αυξημένη ενεργότητα των οστεοκλαστών όπως φάνηκε με TRAP χρώση που αποτελεί δείκτη οστεοκλαστικής δράσης. TRAP χρώση σε λεπτές τομές του μηριαίου οστού των Tg5519 ποντικών ηλικίας 3 μηνών αποκαλύπτει πολυάριθμους μεγάλου μεγέθους οστεοκλάστες τόσο στην περιοχή της επίφυσης και μετάφυσης όσο και στο φλοιώδες οστό στην περιοχή της μέσο-διάφυσης. Ενώ στα WT ποντίκια οι οστεοκλάστες εντοπίζονται στην επιφάνεια του οστού, στα οστά των Tg5519 διαγονιδιακών ποντικών οι οστεοκλάστες εντοπίζονται στο εσωτερικό του φλοιώδους. Η αύξηση της οστεοκλαστογένεσης στο εσωτερικό του φλοιώδους οστού υποδηλώνει έντονο ρυθμό οστικής ανακατασκευής με συνέπεια αυξημένη οστική απορρόφηση και απώλεια που οδηγεί σταδιακά σε λύση της οστικής συνέχειας του φλοιώδους και εμφάνισης πορώδους δομής (cortical porosity) (Εικ. 5.13A-B).



Εικόνα 5.13. Τα Tg5519 ποντίκια εμφανίζουν έντονα οστεοπορωτικά στοιχεία όπως αυξημένο πορώδες στο φλοιώδες οστό και αυξημένη οστεοκλαστογένεση σε σπογγώδες και φλοιώδες. (A) Αντιπροσωπευτικές σειριακές εικόνες στην περιοχή της μετάφυσης και (B) διάφυσης του μηριαίου Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 3 μηνών (n=6, ανά ομάδα) με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης και TRAP. Παρατηρείται αυξημένη παρουσία οστεοκλαστών στην περιοχή της μετάφυσης και διάφυσης. Κλίμακα στις φωτογραφίες (A) 500μm και (B) 100 μm αντίστοιχα. Με αστερίσκο υποδηλώνονται οι έκτοπες θέσεις εναπόθεσης χόνδρου

Επιπλέον, παρατηρούμε ότι τα Tg5519 χαρακτηρίζονται από έντονη λιπογένεση στο μυελό των οστών. Η δημιουργία λιποκυττάρων είναι ήδη προφανής από την ηλικία των 3 μηνών και σταδιακά επεκτείνεται καλύπτοντας μεγάλο μέρος της κοιλότητας του μυελού των οστών (Εικ. 5.11, 5.14). Η παρουσία λιποκυττάρων στο μυελό των οστών αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα σε οστεοπορωτικές καταστάσεις ενώ υπάρχουν αναφορές για αυξημένη λιπογένεση στο μυελό των οστών μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με οστεοπόρωση (Foo et al. 2007; Sharma et al. 2014).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι τα Tg5519 διαγονιδιακά ποντίκια παρουσιάζουν στοιχεία έντονης οστεοπόρωσης που χαρακτηρίζεται από πλήρη οστική απώλεια του σπογγώδους και αυξημένο πορώδες στο φλοιώδες οστό, σταδιακή καταστροφή της αναπτυξιακής πλάκας, αυξημένη λιπογένεση στο μυελό των οστών και αυξημένη οστεοκλαστογένεση.

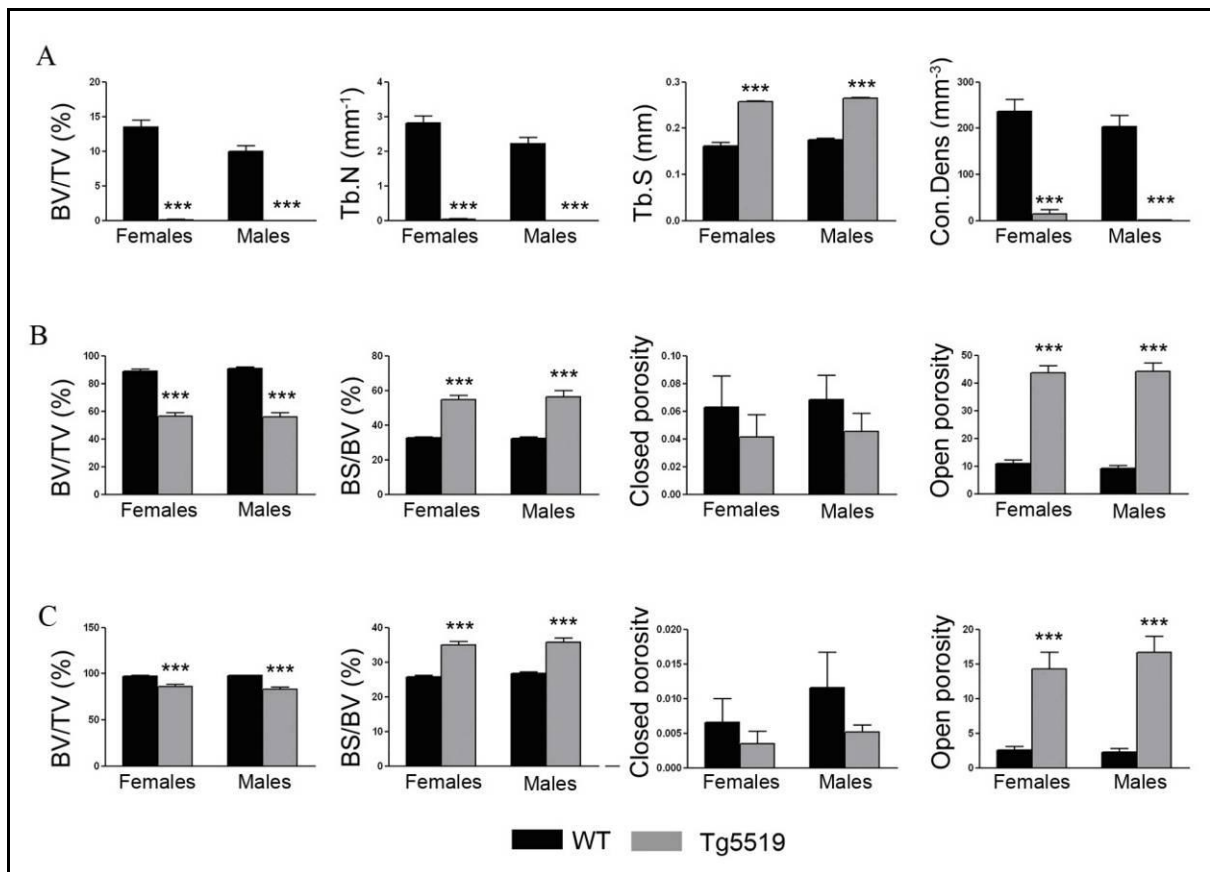


Εικόνα 5.14. Προοδευτική αύξηση του πορώδους στο φλοιώδες οστό (περιοχή της διάφυσης) και του αριθμού των λιποκυττάρων στα Tg5519 ποντίκια. Αντιπροσωπευτικές εικόνες χρώσης αιματοξυλίνης/ηωσίνης στην περιοχή της μέσο-διάφυσης του μηριαίου οστού μεταξύ Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 1, 3 και 6 μηνών (n=6, ανά ομάδα). Κλίμακα στις φωτογραφίες 250μm.

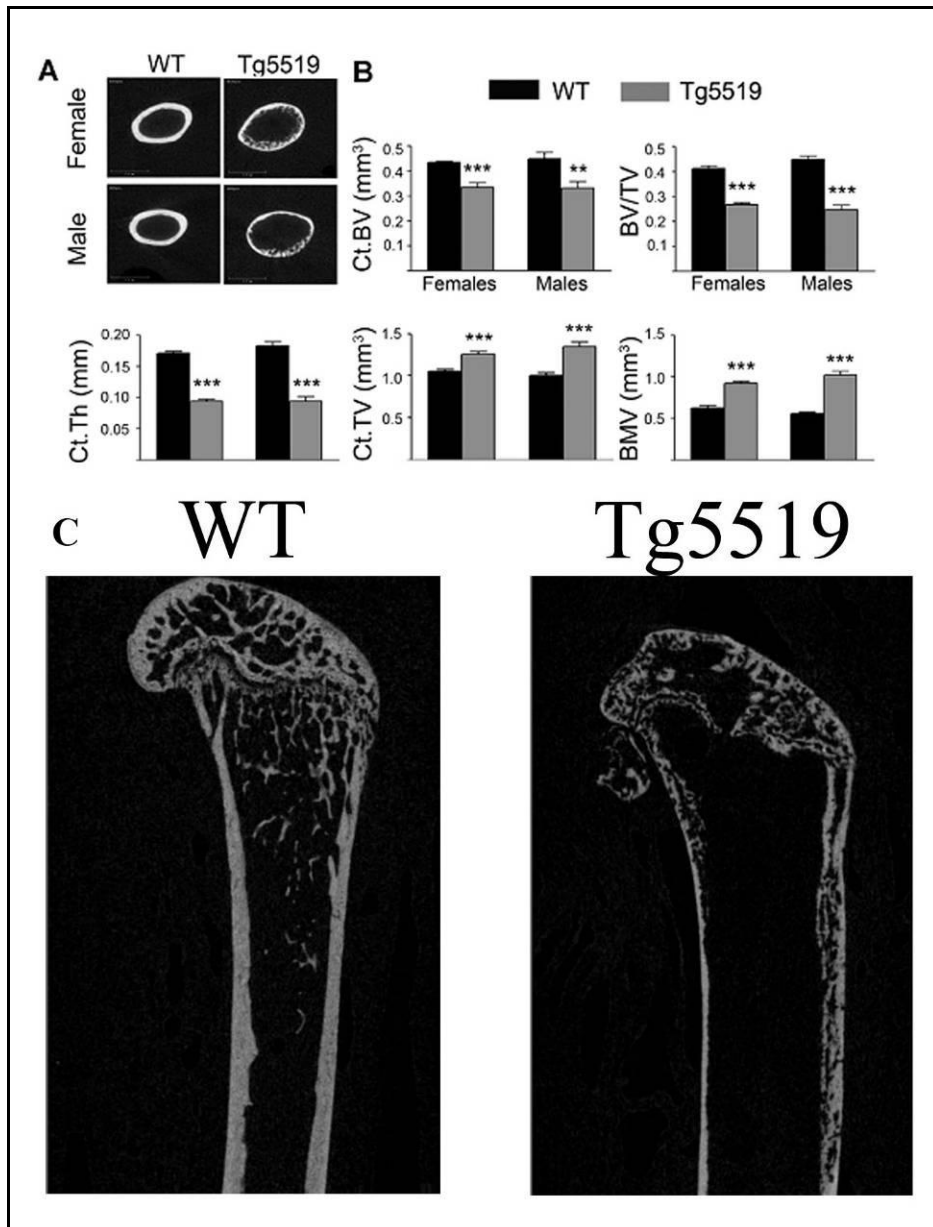
5.6 Ποσοτική ανάλυση του σπογγώδους και φλοιώδους οστού στα Tg5519 ποντίκια με μικροτομογραφία

Η απώλεια του σπογγώδους οστού και η εμφάνιση πορώδους δομής στο φλοιώδες οστό στα Tg5519 ποντίκια εκτιμήθηκε και επαληθεύτηκε επιπλέον με μικροτομογραφία υψηλής ανάλυσης. Στα Tg5519 ποντίκια από την ηλικία των 4 εβδομάδων η ποσοστιαία αναλογία του σπογγώδους οστού στην περιοχή της μετάφυσης (BV/TV %) είναι σχεδόν μηδενική, επίσης μηδενικός είναι ο αριθμός των μικροδοκίδων του σπογγώδους (Tb, N) ενώ η διασπορά του πλέγματος (Tb, S) είναι πιο εκτενής περίπου 50% (Εικ. 5.15A-5.15C). Η ποσοστιαία αναλογία του φλοιώδους οστού (BV/TV %) στην περιοχή της μετάφυσης (κοντά στην αναπτυξιακή πλάκα) είναι μειωμένη κατά 40% ενώ σημαντικά αυξημένη κατά 350% είναι η πορώδης δομή ανοικτού τύπου (open porosity), δηλαδή αυτή που έρχεται σε επαφή με την κοιλότητα του μυελού των οστών (Εικ. 5.15B). Ωστόσο, η απώλεια του φλοιώδους οστού στην περιοχή της διάφυσης είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με την περιοχή της μετάφυσης όπου παρουσιάζει μία μείωση του (BV/TV %) της τάξης του 12.5%, αλλά διατηρεί αυξημένη πορώδη δομή ανοικτού τύπου περίπου 250% (Εικ. 5.15C).

Επιπλέον, τα Tg5519 ποντίκια ηλικίας 3 μηνών εμφανίζουν σημαντική απώλεια στον όγκο του φλοιώδους οστού (Ct.BV, -26%), στην αναλογία του όγκου του φλοιώδους οστού (BV/TV, -38%) και του πάχους του φλοιώδους (Ct.Th, -48%). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι υπάρχει σημαντική αύξηση του όγκου της κοιλότητας του μυελού των οστών (BMV, +57%) και του όγκου του φλοιώδους (Ct. TV, +26%) που μεταφράζεται σε αύξηση της διαμέτρου του οστού της διάφυσης σε σχέση με τα άγριου τύπου WT ποντίκια (Εικ.5.16).



Εικόνα 5.15. Τα Tg5519 ποντίκια εμφανίζουν έντονη οστεοπόρωση στην περιοχή του μηριαίου με σημαντικά μειωμένες τις οστικές παραμέτρους του σπογγώδους και φλοιώδους. (A) Ποσοτική ανάλυση με μικροτομογραφία του σπογγώδους οστού στην περιοχή της μετάφυσης του μηριαίου μεταξύ Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 4 εβδομάδων (n=6, ανά ομάδα και φύλο). BV/TV % (όγκος σπογγώδους/συνολικός όγκος του ιστού, %), Tb.N (αριθμός μικροδοκίδων του σπογγώδους ανά mm), Tb.S (διασπορά του σπογγώδους, mm), Con. Dens (πυκνότητα σύνδεσης, mm³). Ποσοτική ανάλυση με μικροτομογραφία του φλοιώδους οστού στην περιοχή της (B) μετάφυσης και (C) διάφυσης του μηριαίου μεταξύ Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 4 εβδομάδων (n=6, ανά ομάδα και φύλο). BV/TV % (όγκος φλοιώδους οστού/συνολικό όγκος του ιστού, %), BS/BV (οστική επιφάνεια του φλοιώδους/συνολικό όγκο), Closed Porosity (πορώδες κλειστού τύπου, mm), Open Porosity (πορώδες ανοκτού τύπου, mm). Τα γραφήματα δείχνουν τους μέσους όρους ± τυπικό σφάλμα; *** $p < 0.001$.

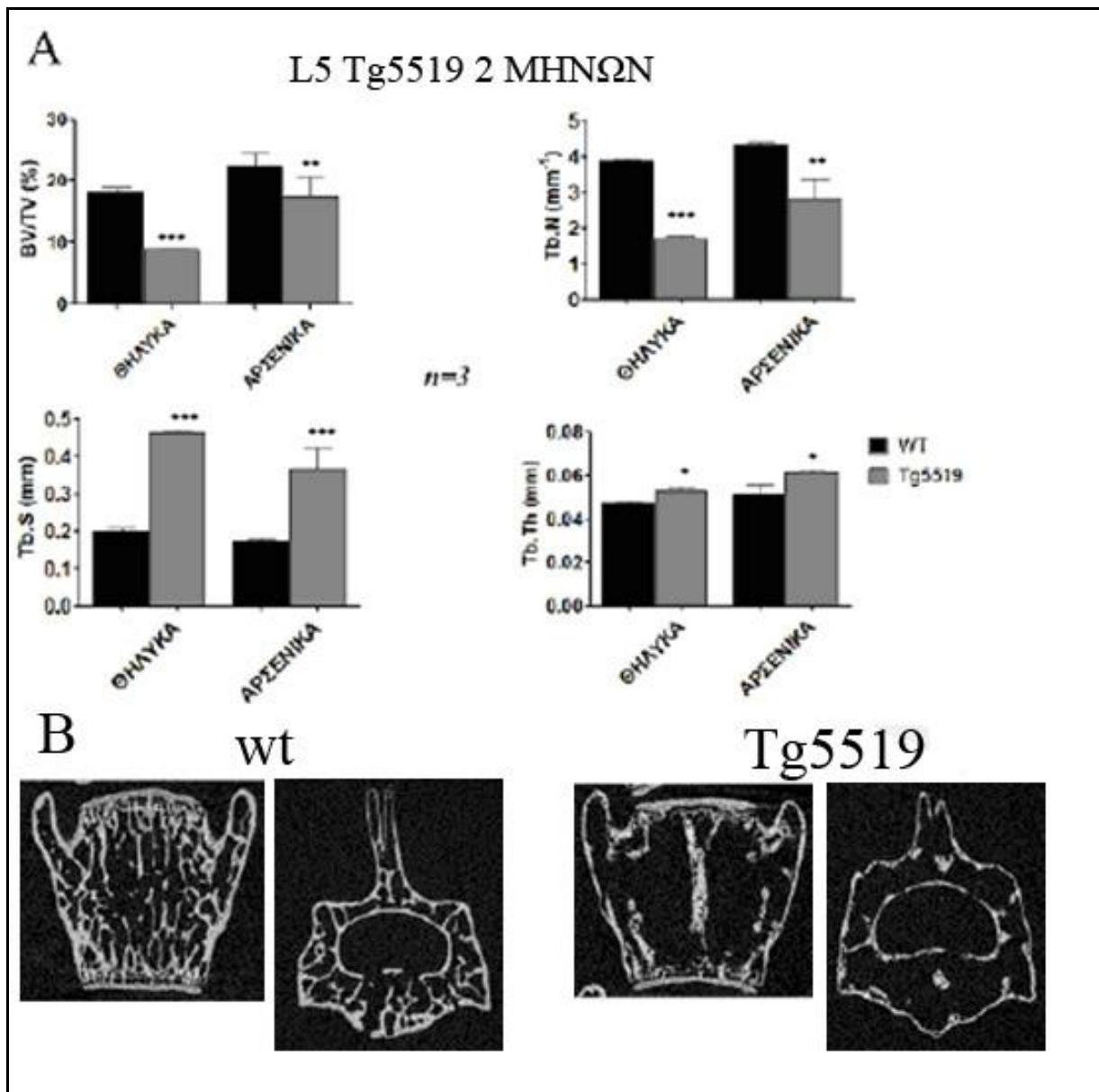


Εικόνα 5.16. Τα Tg5519 ποντίκια παρουσιάζουν έντονη πορώδη δομή του φλοιώδους οστού στο μηριαίο (corical porosity). (A) Αντιπροσωπευτικές εγκάρσιες εικόνες μικροτομογράφου του φλοιώδους οστού στην περιοχή της διάφυσης Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 3 μηνών. (B) Ποσοτική ανάλυση με μικροτομογραφία του φλοιώδους οστού στην περιοχή της διάφυσης του μηριαίου μεταξύ Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 3 μηνών (n=6, ανά φύλο). Ct.BV (όγκος του φλοιώδους οστού, mm³), BV/TV % (όγκος φλοιώδους οστού/συνολικό όγκος του ιστού, Ct.Th (πάχος του φλοιώδους, mm), Ct.TV (συνολικός όγκος του φλοιώδους οστού και της κοιλότητας του μυελού των οστών, mm³), BMV (όγκος της κοιλότητας του μυελού των οστών, mm³). (C) Αντιπροσωπευτικές επιμήκειες εικόνες μικροτομογράφου του μηριαίου Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 3 μηνών. Τα γραφήματα δείχνουν τους μέσους όρους ± τυπικό σφάλμα; **p<0.01, *** p<0.001.

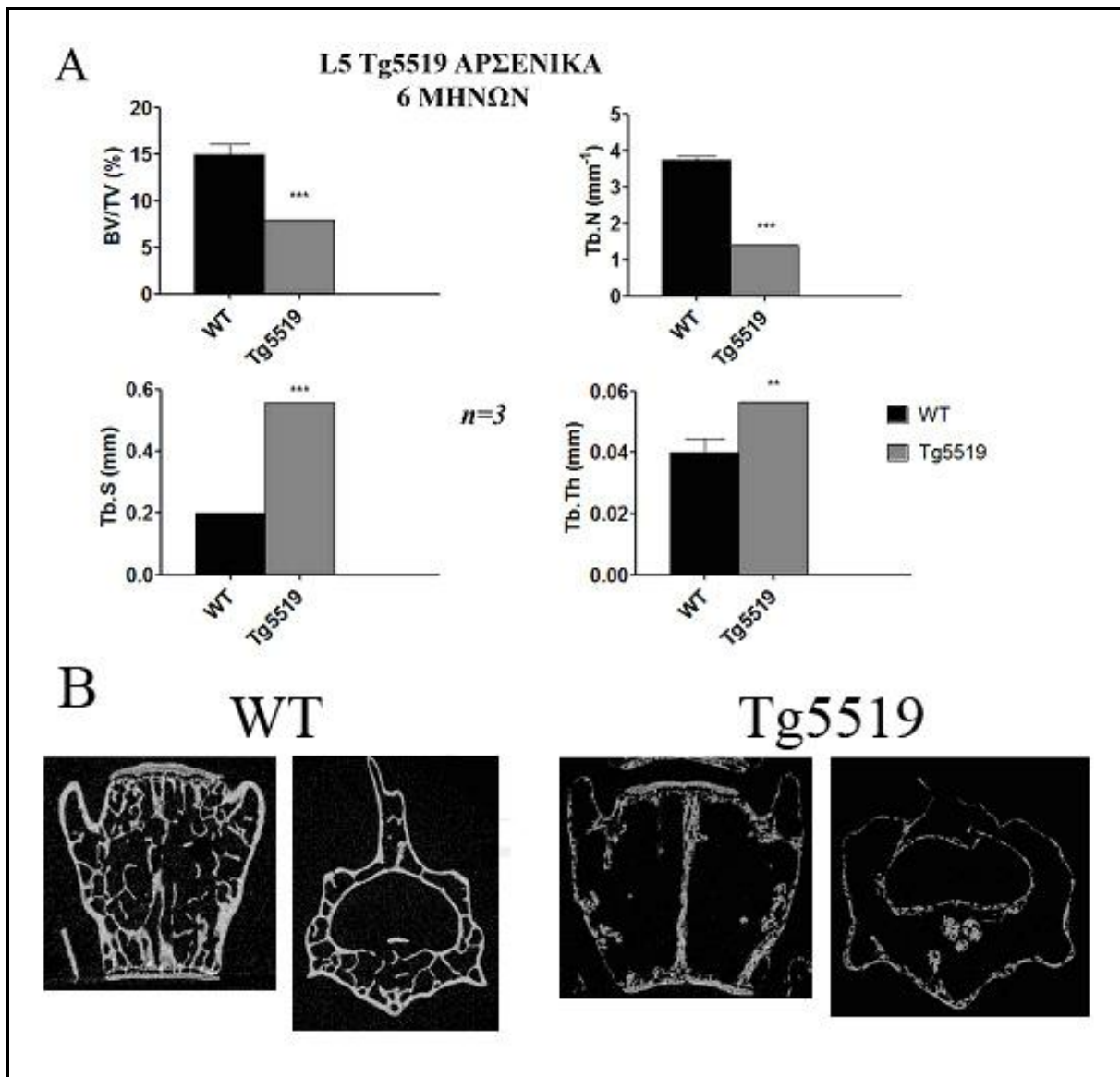
5.7 Ποσοτική ανάλυση του σπογγώδους οστού στους σπονδύλους της οσφυϊκής μοίρας των Tg5519 ποντικών με μικροτομογραφία

Η αυξημένη οστική απορρόφηση που παρατηρείται στα Tg5519 ποντίκια δεν περιορίζεται μόνο στα μακρά οστά, αλλά επεκτείνεται και στην σπονδυλική στήλη, με σημαντική οστική απώλεια στην περιοχή των σπονδύλων της οσφυϊκής μοίρας. Αναλύοντας τον 5^ο σπόνδυλο της οσφυϊκής μοίρας μεταξύ Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 2 μηνών παρατηρήθηκε πλήρης απουσία και συνοχή του σπογγώδους οστού στο κεντρικό σώμα του σπόνδυλου ενώ εντοπίστηκαν οστικά υπολείμματα σαν στηρικτές δοκίδες που διασχίζουν κατά μήκος το κεντρικό σώμα των σπονδύλων. Η ποσοστιαία αναλογία του σπογγώδους οστού στο κεντρικό σώμα του 5^{ου} σπονδύλου (BV/TV %) των θηλυκών είναι μειωμένη κατά 47%, ενώ στα αρσενικά Tg5519 ποντίκια κατά 18%. Σημαντικά μειωμένος είναι ο αριθμός των μικροδοκίδων του σπογγώδους (Tb.N, -55%) ενώ η διασπορά του πλέγματος (Tb, S) είναι πιο εκτενής κατά 150% (Εικ. 5.17A-B).

Επιβαρυμένη εικόνα εμφανίζουν τα αρσενικά Tg5519 και στην ηλικία των 6 μηνών, με πλήρη απουσία και συνοχή του σπογγώδους οστού στο κεντρικό σώμα του 5^{ου} σπονδύλου της οσφυϊκής μοίρας ενώ εντοπίζονται και πάλι οστικά υπολείμματα σαν στηρικτές δοκίδες που διασχίζουν κατά μήκος το κεντρικό σώμα. Πιο συγκεκριμένα η ποσοστιαία αναλογία του σπογγώδους οστού στο κεντρικό σώμα του 5^{ου} σπονδύλου (BV/TV %) είναι μειωμένη κατά 46%, ο αριθμός των μικροδοκίδων του σπογγώδους (Tb, N) είναι μειωμένος κατά 62,5%, ενώ η διασπορά του πλέγματος (Tb, S) είναι πιο εκτενής κατά 190% (Εικ.5.18A-B).



Εικόνα 5.17. Τα Tg5519 ποντίκια ηλικίας 2 μηνών εμφανίζουν έντονη οστεοπόρωση στους σπονδύλους της οσφυϊκής μοίρας με απώλεια του σπογγώδους οστού. **(A)** Ποσοτική ανάλυση του σπογγώδους οστού στο κεντρικό σώμα του 5^{ου} σπόνδυλου της οσφυϊκής μοίρας μεταξύ Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 2 μηνών (n=3, ανά ομάδα). BV/TV (όγκος σπογγώδους/συνολικός όγκος, %), Tb.N (αριθμός μικροδοκίδων του σπογγώδους ανά mm), Tb.S (διασπορά του σπογγώδους, mm), Tb.Th. (πάχος του σπογγώδους, mm). **(B)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες σπονδύλων της οσφυϊκής μοίρας με μικροτομογράφο υψηλής ανάλυσης Skyscan1172 της Brucker. Σάρωση με ανάλυση 6μm και απεικόνιση του 5^{ου} σπόνδυλου της οσφυϊκής μοίρας όπου διακρίνεται η απώλεια του σπογγώδους οστού, με σχηματισμό στηρικτικών οστικών δοκίδων στα Tg5519 ηλικίας 2 μηνών (επιμήκης και εγκάρσια απεικόνιση των σπονδύλων της οσφυϊκής μοίρας). Οι εικόνες επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού Dataviewer της Brucker. Τα γραφήματα δείχνουν τους μέσους όρους ± τυπικό σφάλμα; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

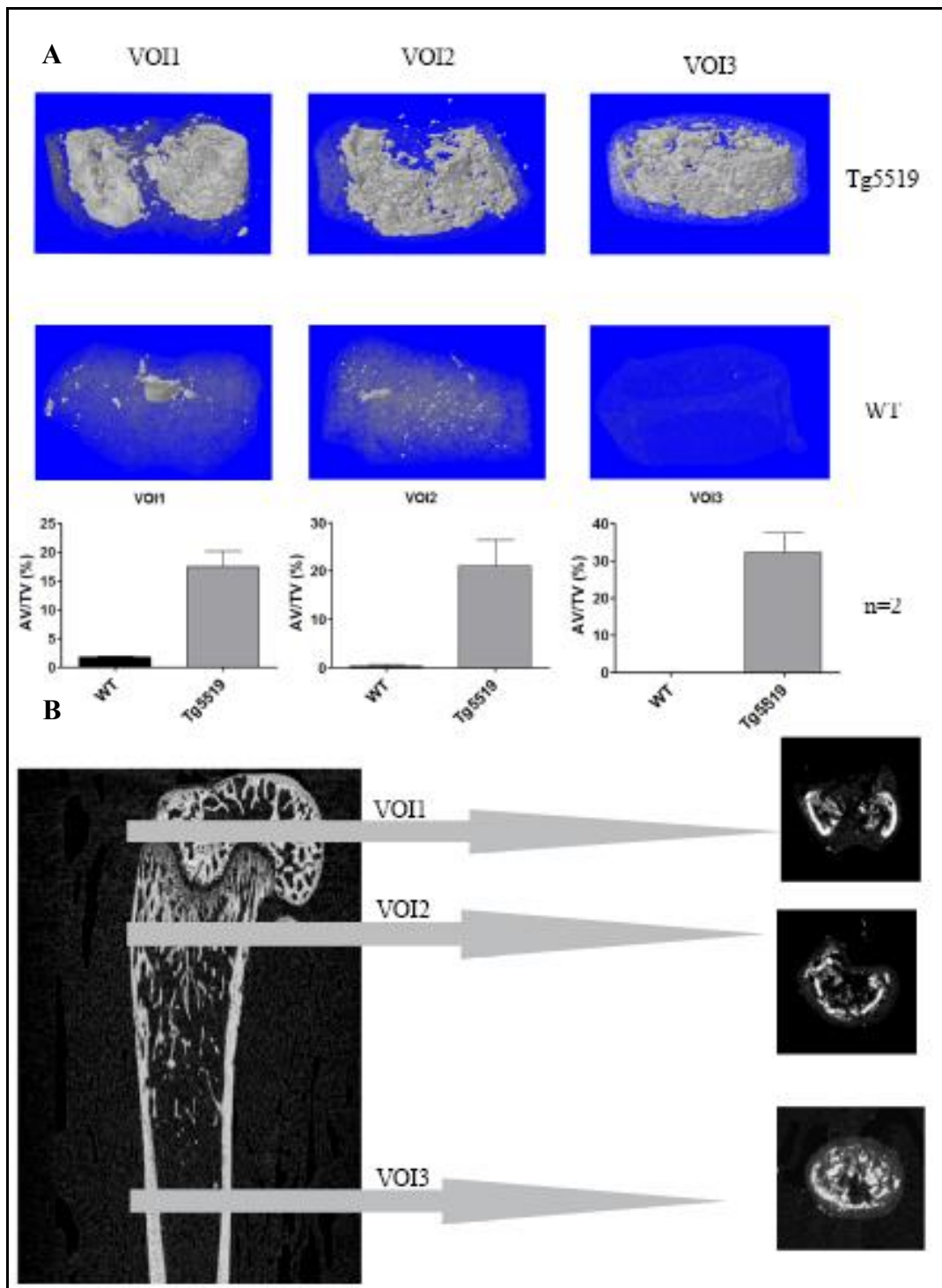


Εικόνα 5.18. Τα Tg5519 ποντίκια ηλικίας 6 μηνών εμφανίζουν έντονη οστεοπόρωση στους σπονδύλους της οσφυϊκής μοίρας με απώλεια του σπογγώδους οστού. (A) Ποσοτική ανάλυση του σπογγώδους οστού στο κεντρικό σώμα του 5^{ου} σπόνδυλου της οσφυϊκής μοίρας μεταξύ αρσενικών Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 6 μηνών (n=3, ανά ομάδα). BV/TV (όγκος σπογγώδους/συνολικό όγκο, %), Tb.N (αριθμός μικροδοκίδων του σπογγώδους ανά mm), Tb.S (διασπορά του σπογγώδους, mm), Tb.Th. (πάχος του σπογγώδους, mm). (B) Αντιπροσωπευτικές τρισδιάστατες εικόνες σπονδύλων της οσφυϊκής μοίρας με μικροτομογράφο υψηλής ανάλυσης Skyscan1172 της Brucker. Σάρωση με ανάλυση 6μm και απεικόνιση του 5^{ου} σπόνδυλου της οσφυϊκής μοίρας όπου διακρίνεται η απώλεια του σπογγώδους οστού, με σχηματισμό στηρικτικών οστικών δοκίδων Tg5519 ηλικίας 6 μηνών (επιμήκης και εγκάρσια απεικόνιση των σπονδύλων της οσφυϊκής μοίρας). Οι εικόνες επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού Dataviewer της Brucker. Τα γραφήματα δείχνουν τους μέσους όρους ± τυπικό σφάλμα; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.8 Ποσοτική ανάλυση του λιπώδους ιστού στο μηριαίο οστό των Tg5519 ποντικών με μικροτομογραφία

Τα Tg5519 οστεοπορωτικά ποντίκια παρουσιάζουν επίσης αυξημένη λιπογένεση στο μυελό των οστών από την ηλικία των 3 μηνών όπως φάνηκε από την ιστολογική ανάλυση (Εικ. 5.11, 5.14). Επιβεβαιώσαμε τα παραπάνω ιστολογικά ευρήματα χρησιμοποιώντας μια μεθοδολογία βάση της οποίας το όσμιο αντιδρά αποκλειστικά με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα του λιπώδους ιστού επιτρέποντας έτσι την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του λιπώδους ιστού με μικροτομογραφία υψηλής ανάλυσης (Scheller et al. 2014). Το τετροξείδιο του οσμίου αντιδρά με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα των λιποκυττάρων παράγοντας ένα μαύρο προϊόν το οποίο αποτελεί ιδανικό σκιαγραφικό παράγοντα στην μικροτομογραφία. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάλυση του λιπώδους ιστού στα οστά είναι η απασβέστωση πρώτα των οστών ώστε να επιτευχθεί εντοπισμός μόνο του λιπώδους ιστού κατά την διαδικασία της μικροτομογραφίας.

Ποσοτική ανάλυση του λιπώδους ιστού με μικροτομογραφία πραγματοποιήθηκε σε τρεις περιοχές του μηριαίου: 1) Στην επίφυση (VOI1) λίγο πάνω από την αναπτυξιακή πλάκα, 2) την μετάφυση (VOI2) λίγο κάτω από την αναπτυξιακή πλάκα και 3) την περιοχή της διάφυσης (VOI3). Τα αποτελέσματα της μικροτομογραφία έδειξαν ότι τα Tg5519 ποντίκια ηλικίας 6 μηνών εμφανίζουν σημαντική αύξηση του λιπώδους ιστού και στις τρεις προς εξέταση περιοχές του μηριαίου (Εικ. 5.19A) σε σχέση με τα άγριου τύπου ποντίκια. Η αύξηση αυτή αντιστοιχεί κατά μέσο όρο σε ποσοστό 1400% στην περιοχή της διάφυσης (Εικ. 5.19B).



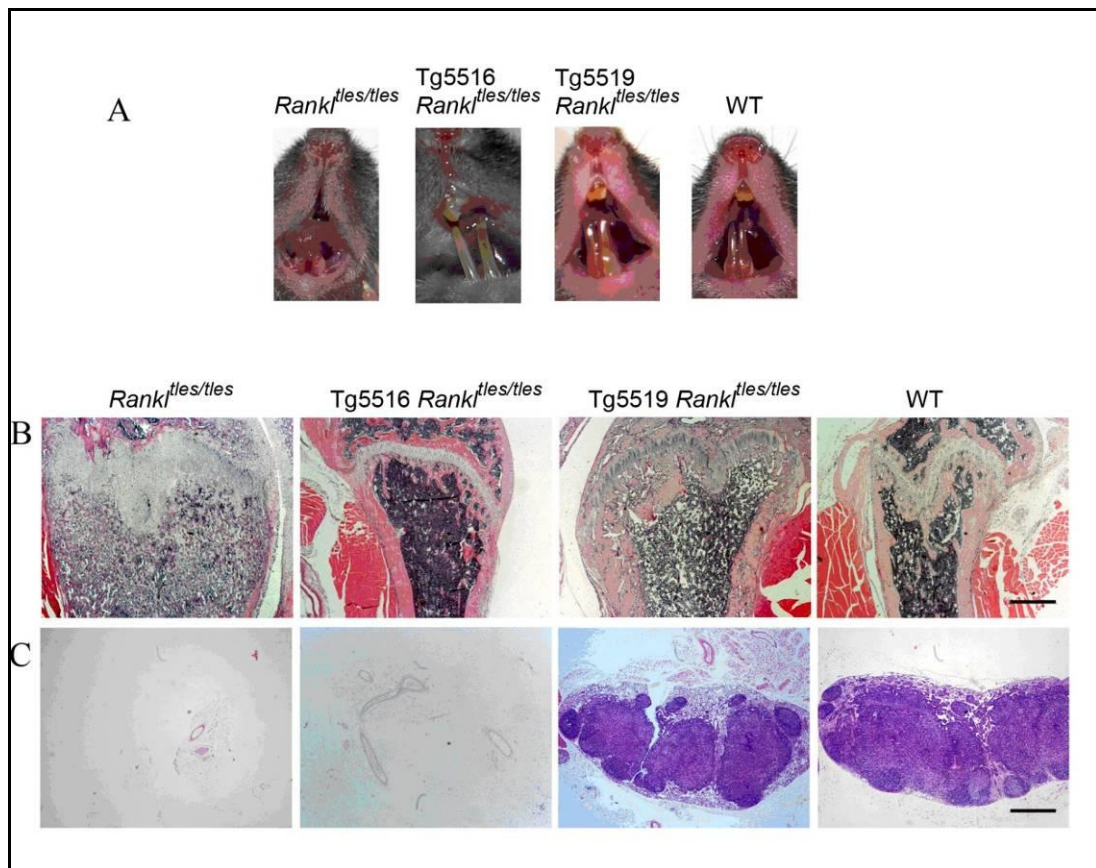
Εικόνα 5.19. Τα Tg5519 οστεοπορωτικά ποντίκια παρουσιάζουν σημαντική αύξηση του λιπώδους ιστού στην κοιλότητα του μυελού των οστών του μηριαίου. **(Α)** Τρισδιάστατη απεικόνιση της κατανομής των λιποκυττάρων στην περιοχή της επίφυσης, μετάφυσης και διάφυσης μεταξύ Tg5519 και WT ποντικών ηλικίας 6 μηνών. **(Β)** Ποσοστιαία αναλογία κατανομής των λιποκυττάρων στην προς εξέταση περιοχή (AV/TV %) της επίφυσης, μετάφυσης και διάφυσης μεταξύ Tg5519 και WT ηλικίας 6 μηνών. Η τρισδιάστατη μοντελοποίηση έγινε με χρήση του λογισμικού CtVol της Brucker και οι εγκάρσιες τρισδιάστατες απεικονίσεις του ισχίου με την χρήση του λογισμικού Dataviewer της Brucker.

5.9 Διάσωση του *RANKL*^{tlcs/tlcs} οστεοπετρωτικού φαινοτύπου με υπερέκφραση της *huRANKL* πρωτεΐνης

Στην συνέχεια εξετάστηκε εάν η παρουσία του διαγονιδίου huRANKL δύναται να διασώσει τον οστεοπετρωτικό φαινότυπο των *RANKL*^{tlcs/tlcs} ποντικών έπειτα από διασταυρώσεις των διαγονιδιακών σειρών Tg5516 και Tg5519 με τα *RANKL*^{tlcs/tlcs} ποντίκια. Καταρχήν, η διασταύρωση των δύο διαγονιδιακών σειρών Tg5516 και Tg5519 με το *RANKL*^{tlcs/tlcs} γενετικό υπόστρωμα διέσωσε πλήρως την πρόωρη θνησιμότητα και την καθυστερημένη ανάπτυξη που παρουσιάζουν τα *RANKL*^{tlcs/tlcs} ποντίκια. Διασταύρωση της διαγονιδιακής σειράς Tg5516 που φέρει ένα αντίγραφο του διαγονιδίου (low copy) με τα οστεοπετρωτικά *RANKL*^{tlcs/tlcs} ποντίκια (Tg5516Rankl^{tlcs/tlcs}) διέσωσε μερικώς την έκφυση των άνω δοντιών (Εικ. 5.20A), πλήρως τον οστεοπετρωτικό φαινότυπο με κανονικό σχηματισμό της κοιλότητας του μυελού των οστών στα μακρά οστά (Εικ. 5.20B) αλλά οι μεσεντέριοι λεμφαδένες δεν επανεμφανίστηκαν (Εικ. 5.20C). Τα παραπάνω ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η διαγονιδιακή σειρά Tg5516 που φέρει ένα αντίγραφο του διαγονιδίου διέσωσε μερικώς τον φαινότυπο των *RANKL*^{tlcs/tlcs} ποντικών.

Διασταύρωση της διαγονιδιακής σειράς Tg5519 που φέρει 10 αντίγραφα του διαγονιδίου (high copy) με τα οστεοπετρωτικά *RANKL*^{tlcs/tlcs} ποντίκια (Tg5519Rankl^{tlcs/tlcs}) διέσωσε πλήρως τον φαινότυπο των *RANKL*^{tlcs/tlcs} ποντικών με έκφυση όλων των δοντιών (Εικ. 5.20A), πλήρη διάσωση του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου με πλήρη σχηματισμό της κοιλότητας του μυελού των οστών στα μακρά οστά (Εικ. 5.20B) και σχηματισμό των μεσεντέριων λεμφαδένων (Εικ. 5.20C).

Τα παραπάνω ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η διαγονιδιακή σειρά Tg5519 που φέρει δέκα αντίγραφα του διαγονιδίου διέσωσε πλήρως τον φαινότυπο των οστεοπετρωτικών *RANKL*^{tlcs/tlcs} ποντικών. Επιπλέον, διαφαίνεται ότι η υπερέκφραση του διαγονιδίου είναι ικανή για την πλήρη διάσωση του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου, κάτι που υποδηλώνει ότι υπάρχει πλήρης συμβατότητα στην πρόσδεση του RANKL του ανθρώπου με τον υποδοχέα RANK του ποντικού.



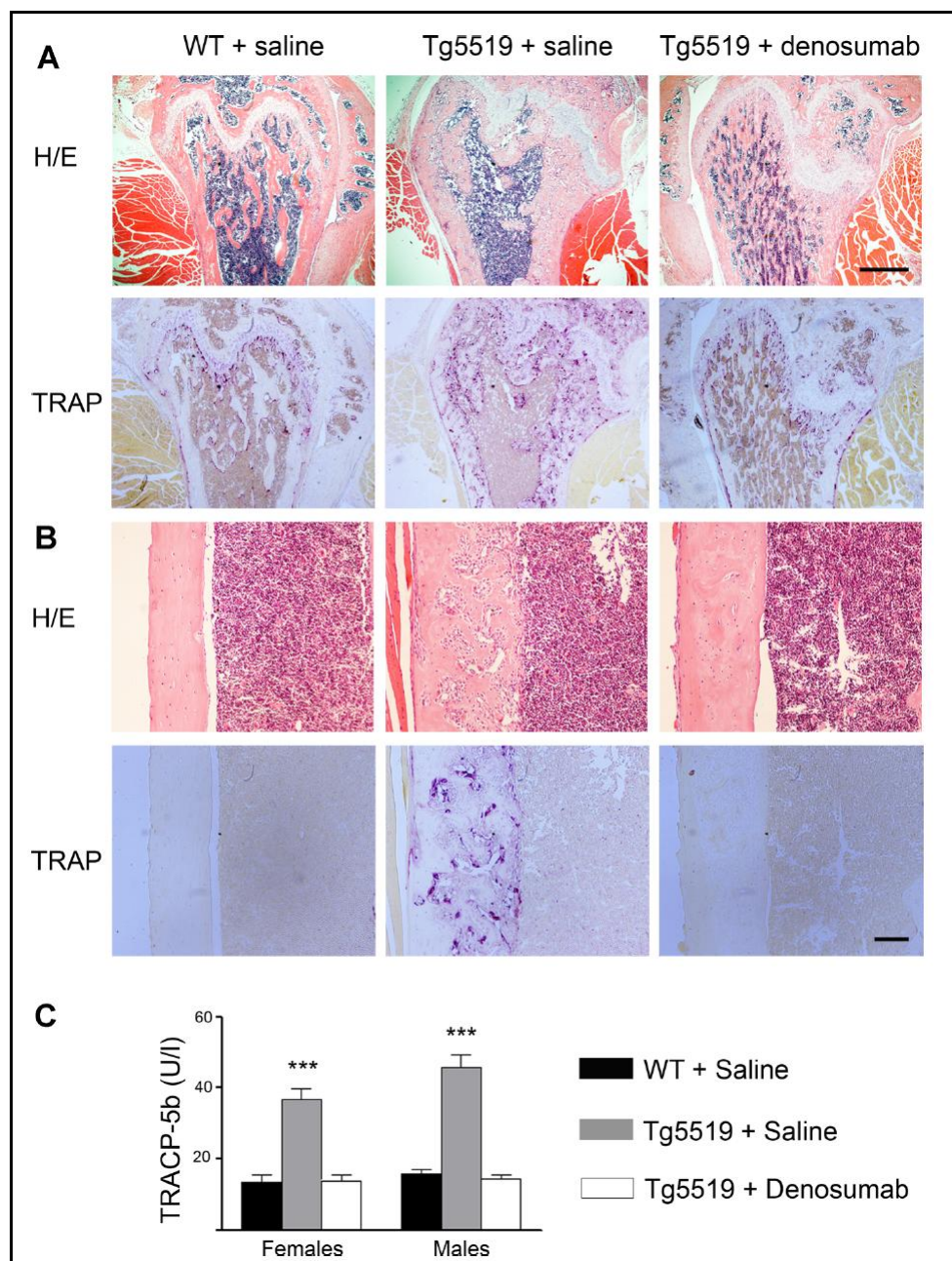
Εικόνα 5.20. Διάσωση του φαινοτύπου των οστεοπετρωτικού *RANKL*^{tsles/tsles} ποντικών με την έκφραση του *huRANKL*. (A) Μερική και πλήρης έκφραση των δοντιών των *Rankl*^{tsles/tsles}, *Tg5516Rankl*^{tsles/tsles}, *Tg5519Rankl*^{tsles/tsles}, και WT ποντικών (n=8-12, ανά ομάδα). (B) Αντιπροσωπευτικές εικόνες του μηριαίου και (C) των μεσεντερικών λεμφαδένων από *Rankl*^{tsles/tsles}, *Tg5516Rankl*^{tsles/tsles}, *Tg5519Rankl*^{tsles/tsles}, και WT ποντικών (n=6, ανά ομάδα). Κλίμακα=500μm.

5.10 Θεραπευτική επίδραση του Denosumab στο Tg5519 οστεοπορωτικό μοντέλο

Η χρήση του ανθρώπινου μονοκλωνικού αντισώματος denosumab το οποίο δεσμεύεται με μεγάλη εξειδίκευση στην πρωτεΐνη RANKL έχει εγκριθεί για την θεραπεία της οστεοπόρωσης σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Silva-Fernández et al. 2013). Στην παρούσα πειραματική διαδικασία εξετάσαμε, με την χορήγηση denosumab στα Tg5519 ποντίκια, εάν τα TgRANKL διαγονιδιακά ποντίκια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλα στην αξιολόγηση αναστολέων του RANKL σε προκλινικό επίπεδο. Ο προκλινικός σχεδιασμός περιελάμβανε 3 πειραματικές ομάδες: 1) Tg5519 ποντίκια στα οποία έγινε υποδόρια χορήγηση 10mg/kg Denosumab, (10 αρσενικά-10 θηλυκά), 2) Tg5519 ποντίκια στα οποία έγινε υποδόρια χορήγηση φυσιολογικού ορού, (10 αρσενικά-10 θηλυκά) και 3) WT ποντίκια στα οποία έγινε υποδόρια χορήγηση φυσιολογικού ορού (7 αρσενικά-7 θηλυκά). Η χορήγηση του denosumab γινόταν δύο φορές την εβδομάδα ξεκινώντας από την ηλικία των 4 εβδομάδων όπου τα Tg5519 ποντίκια εμφανίζουν ήδη έντονα στοιχεία οστεοπόρωσης, για συνολικό διάστημα 6 εβδομάδων. Τα ζώα θυσιάστηκαν σε ηλικία 10 εβδομάδων από τα οποία έγινε ιστολογική ανάλυση του δεξιού μηριαίου οστού με χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης και χρώση TRAP. Επιπλέον, έγινε οπισθοβολβική συλλογή αίματος από τα πειραματικά ποντίκια για τον προσδιορισμό των επιπέδων του δείκτη οστικής απορρόφησης TRACP-5b στον ορό του αίματος.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν σημαντική απώλεια του σπογγώδους οστού στο μηριαίο και πορώδη δομή στο φλοιώδες οστό στην ομάδα (μάρτυρας) των Tg5519 ποντικών που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Αντίθετα, στην ομάδα των Tg5519 ποντικών που έγινε χορήγηση denosumab παρατηρήθηκε επανεμφάνιση του σπογγώδους οστού στην περιοχή της μετάφυσης και επιπλέον πλήρης αναστροφή της πορώδους δομής στο φλοιώδες οστό συνοδευόμενη από εξαφάνιση των TRAP+ οστεοκλαστών από την περιοχή του φλοιώδους (Εικ.5.21A-B). Τα επίπεδα του TRACP-5b (δείκτης εκτίμησης της ενεργότητας των οστεοκλαστών στον οργανισμό συνολικά) στον ορό του αίματος στην ομάδα των Tg5519 ποντικών που έγινε θεραπεία με το denosumab επανήλθαν στα φυσιολογικά επίπεδα όπως των WT ποντικών, ενώ στα Tg5519 ποντίκια που δεν έγινε θεραπεία παρέμειναν σε πολύ υψηλά επίπεδα (Εικ. 5.21C). Συμπερασματικά, η θεραπεία των Tg5519 ποντικών με το Denosumab είχε σαν αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή του huRANKL και πλήρη αντιστροφή του οστεοπορωτικού φαινοτύπου. Συνεπώς, η διαγονιδιακή σειρά Tg5519 αποτελεί ένα νέο

μοντέλο σοβαρής οστεοπόρωσης ιδανικό για την αξιολόγηση νέων φαρμακευτικών ουσιών κατά της οστεοπόρωσης σε προκλινικό επίπεδο.



Εικόνα 5.21. Θεραπευτική επίδραση του denosumab στο *TghuRANKL*-Tg5519 διαγονιδιακό μοντέλο οστεοπόρωσης. Αντιπροσωπευτικές σειριακές τομές μηριαίου στην περιοχή της (A) μετάφυσης όπου διακρίνεται το σπογγώδες οστό και (B) της μέσο-διάφυσης για την παρατήρηση του φλοιώδους οστού των Tg5519 οστεοπορωτικών ποντικών στα οποία έγινε χορήγηση είτε denosumab είτε φυσιολογικού ορού και άγριου τύπου WT ποντικών στα οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός (n=10-14, ανά ομάδα). Έγινε χρώση των τομών τόσο με αιματοξυλίνη/ηωσίνη και με TRAP. Κλίμακα φωτογραφιών A=500μm, B=100 μm. (C) Επίπεδα του TRACP-5b στον ορό του αίματος στα διαγονιδιακά Tg5519 ποντίκια που έγινε χορήγηση είτε denosumab είτε φυσιολογικού ορού και στα WT ποντίκια που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Το γράφημα δείχνει τους μέσους όρους ±τυπικό σφάλμα; *** $p < 0.001$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Βιοχημικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός της μετάλλαξης G278R που προκαλεί αποτριμερισμό της RANKL πρωτεΐνης

Η οστεοπέτρωση στους ανθρώπους αποτελεί μία ετερογενή ομάδα από διαταραχές στην οστική ανακατασκευή που χαρακτηρίζεται από αυξημένη οστική μάζα και πυκνότητα αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής λειτουργίας των οστεοκλαστών και κατ'επέκταση της οστικής απορρόφησης. Πρόσφατα αναγνωρίστηκε μία νέα μορφή οστεοπέτρωσης σε ασθενείς, όπου εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο RANKL. Ειδικότερα, αναγνωρίστηκαν τρεις διαφορετικές μεταλλάξεις: α) αντικατάσταση της μεθειονίνης από λυσίνη στη θέση 199 (M199K) σε μια υψηλά συντηρημένη θέση της πρωτεΐνης, β) απαλειφή στην περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 145-177 μιας περιοχής που συμμετέχει στην πρόσδεση στον υποδοχέα RANK και γ) απαλειφή δύο νουκλεοτιδίων στο τελευταίο εξώνιο (828_829delCG) με αποτέλεσμα μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου έναρξης στην θέση V277 και πρόωρο κωδικόνιο λήξης V277WfX5 όπου είχε σαν αποτέλεσμα απώλεια της βιολογικής δράσης του RANKL σε ασθενείς με αυτοσωμική υπολλειπόμενη οστεοπέτρωση (ARO) (Sobacchi et al. 2007). Η M199K υποκατάσταση εντοπίζεται σε μία υψηλά συντηρημένη περιοχή, η απαλειφή της αμινοξικής περιοχής 145-177 που απομακρύνει την A β-πτυχωτή επιφάνεια καθώς και την μισή περιοχή του AA' βρόγχου που θεωρητικά συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα RANK, ενώ η αλλαγή V277WfX5 προκαλεί μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου με αποτέλεσμα την απώλεια της F β-πτυχωτής επιφάνειας που συμμετέχει στον τριμερισμό του RANKL (Ta et al. 2010). Όλες οι μεταλλάξεις του RANKL εντοπίζονται στην βιοδραστική εξωκυτταρική περιοχή (TNF-like core domain), δηλαδή στην περιοχή που ευθύνεται για τον τριμερισμό και την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα, ωστόσο οι μοριακοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην παθογένεση της ARO παραμένουν άγνωστοι. Συνεπώς, ο λειτουργικός χαρακτηρισμός μεταλλάξεων του RANKL είτε σε ανθρώπους είτε σε ζωικά πειραματικά μοντέλα αποτελεί μία απαραίτητη προσέγγιση για την αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την παθογένεια της οστεοπέτρωσης (ARO) με στόχο την θεραπευτική της αντιμετώπιση αλλά και την ανάπτυξη νέων πιθανών αναστολέων έναντι του RANKL.

Πρόσφατα, η ερευνητική ομάδα της Επικ. Καθηγήτριας Ελένης Ντούνη δημιούργησε ένα νέο ζωικό μοντέλο αυτοσωμικής υπολλειπόμενης οστεοπέτρωσης (ARO) στο ποντίκι ακολουθώντας μία προσέγγιση Πρόσθιας Γενετικής χρησιμοποιώντας την μέθοδο της τυχαίας χημικής μεταλλαξογένεσης με αιθυλνιτροζουρία (ENU). Το νέο μοντέλο οστεοπέτρωσης (tes) χαρακτηρίζεται από απώλεια έκφυσης των δοντιών, πλήρη απουσία των οστεοκλαστών,

αυξημένη οστική μάζα και αδυναμία σχηματισμού λεμφαδένων. Γενετική ανάλυση του νέου μοντέλου οστεοπέτρωσης αποκάλυψε την παρουσία μίας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο *Rankl* με αποτέλεσμα την αμινοξική αντικατάσταση από γλυκίνη σε αργινίνη στην θέση 278 (G278R) που εντοπίζεται στην εξωκυτταρική περιοχή (TNF-like core domain). Το γεγονός ότι τα μεταλλαγμένα RANKL^{tes/tes} ποντίκια εμφανίζουν τον ίδιο οστεοπετρωτικό φαινότυπο με τα RANKL knockout ποντίκια (Marks & Choi, 2000a; Kong et al., 1999) μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μία αμινοξική αλλαγή είναι αρκετή για να προκαλέσει απώλεια της βιολογικής δράσης του RANKL. Ωστόσο, τα RANKL^{tes/tes} ποντίκια διαφέρουν σε μοριακό επίπεδο από τα RANKL knockout ποντίκια. Ενώ στα RANKL knockout ποντίκια δεν υπάρχει έκφραση του RANKL είτε σε μεταγραφικό (mRNA) ή μεταφραστικό επίπεδο, αντίθετα τα RANKL^{tes/tes} ποντίκια παράγουν σε φυσιολογικά επίπεδα την μη λειτουργική RANKL πρωτεΐνη (Douni et al. 2012). Το RANKL^{tes/tes} μοντέλο οστεοπέτρωσης είναι το πρώτο διεθνώς μοντέλο το οποίο φέρει μία λειτουργική μετάλλαξη στο γονίδιο *Rankl* επηρεάζοντας έτσι την βιολογική του δράση ενώ προσομοιάζει σε μεγάλο βαθμό με την αυτοσωμική υπολλειπόμενη οστεοπέτρωση σε ασθενείς (ARO). Και στις δύο περιπτώσεις έχουμε παραγωγή μη λειτουργικής RANKL πρωτεΐνης απόρροια των μεταλλάξεων στην εξωκυτταρική περιοχή όπως ακριβώς σε ασθενείς με ARO. Παρόλο που δεν υπάρχουν αναφορές για αμινοξική υποκατάσταση στην θέση 278 σε ασθενείς με ARO, ωστόσο απαλειφή της θέσης αυτής έχει αναφερθεί στην περίπτωση της αλλαγής V277WfX5 όπου προβλέπεται να επηρεάζει τον τριμερισμό της RANKL. Στην παρούσα διδακτορική μελέτη πραγματοποιήθηκε βιοχημικός χαρακτηρισμός της αμινοξικής υποκατάστασης G278R στα RANKL^{tes/tes} ποντίκια. Θελήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο η G278R αμινοξική υποκατάσταση έχει αντίκτυπο στην διαμόρφωση της πρωτεΐνης και στην ικανότητα τριμερισμού.

Μοντελοποίηση της δομής της μεταλλαγμένης RANKL^{G278R} πρωτεΐνης, βασισμένη σε δεδομένα κρυσταλλογραφίας (Lam et al. 2001; Ito et al. 2002), προτείνει ότι η μετάλλαξη δεν επηρεάζει την φυσική διαμόρφωση και την αναδίπλωση του μονομερούς αλλά ίσως επηρεάζει τον τριμερισμό της RANKL πρωτεΐνης. Ακόμη, το κρίσιμο αμινοξύ G278 εντοπίζεται στην υδρόφοβη F β-πτυχωτή επιφάνεια η οποία είναι 100% συντηρημένη μεταξύ ανθρώπου και ποντικού, και αποτελεί μέρος της εωτερικής A'AHCF β-πτυχωτής επιφάνειας που εμπλέκεται ενεργά στην αλληλεπίδραση των μονομερών. Η εισαγωγή της αργινίνης στην θέση 278 προβλέπεται να εισάγει ένα θετικό φορτίο και μία πλευρική αλυσίδα προκαλώντας διαταραχή της υδρόφοβης επιφάνειας με χωροταξικό εμπόδιο.

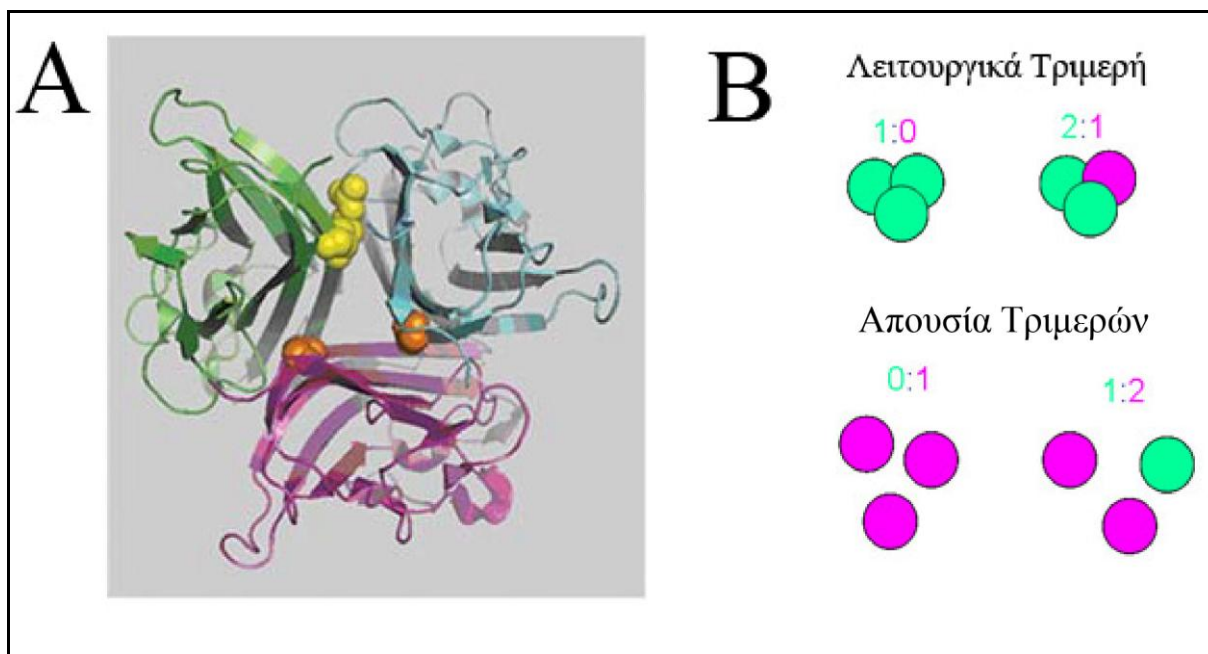
Σε μοριακό επίπεδο δείξαμε ότι η αμινοξική υποκατάσταση (G278R) προκαλεί πλήρη απώλεια της βιολογικής δράσης του RANKL και απώλεια τριμερισμού. Χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη εξωκυτταρική RANKL πρωτεΐνη τόσο άγριου τύπου όσο και μεταλλαγμένη και ακολουθώντας βιοχημικές δοκιμές είδαμε ότι η RANKL^{G278R} δεν σχηματίζει τριμερή ή πολυμερή επιβεβαιώνοντας την *in silico* πρόβλεψη. Αντίθετα, παρατηρήσαμε ότι η RANKL^{G278R} σχηματίζει μόνο μονομερή και πρωτεϊνικά συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους (Εικ. 3.8A). Αυτό εξηγείται αν λάβουμε υπόψιν ότι η αμινοξική υποκατάσταση από γλυκίνη σε αργινίνη εντοπίζεται στην υδρόφοβη F β-πτυχωτή επιφάνεια. Η παρουσία της θετικά φορτισμένης αργινίνης σε μια υδρόφοβη περιοχή πιθανόν οδηγεί σε έκθεση της υδρόφοβης διεπιφάνειας των μονομερών που έχουν την τάση να «κολλάνε» το ένα με το άλλο και τελικώς τον σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων μεγάλου μοριακού βάρους (aggregates). Επίσης, δείξαμε ότι η RANKL^{G278R} δεν δύναται να προσδεθεί στον υποδοχέα RANK (Εικ. 3.8B), επιβεβαιώνοντας ότι ο τριμερισμός του RANKL αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόσδεσή του στον υποδοχέα RANK. Συνεπώς, η απώλεια τριμερισμού έχει αντίκτυπο στην βιολογική δράση του RANKL κάτι που μπορεί να εξηγήσει την αδυναμία οστεοκλαστογένεσης και την επαγωγή οστεοπέτρωσης στα ποντίκια που παράγουν την RANKL^{G278R} πρωτεΐνη.

Επιπλέον, η ανασυνδυασμένη εκκριτική RANKL^{G278R} πρωτεΐνη φαίνεται ότι έχει κυρίαρχη αρνητική επίδραση στην WT RANKL σε δοκιμές οστεοκλαστογένεσης, κάτι που εξαρτάται από την αναλογία μεταξύ WT και RANKL^{G278R} πρωτεϊνών. Με βάση τις λειτουργικές κυτταρικές δοκιμές παρατηρήσαμε ότι η επαγωγή σχηματισμού οστεοκλαστών πραγματοποιείται από λειτουργικά τριμερή RANKL όταν η αναλογία WT και RANKL^{G278R} πρωτεΐνης είναι 3:0 (μόνο WT μονομερή) ή 2:1 (2 WT: 1 RANKL^{G278R}). Αντίθετα, παρατηρείται κυρίαρχη αρνητική επίδραση στον σχηματισμό οστεοκλαστών όταν η αναλογία είναι 0:3 (μόνο RANKL^{G278R} μονομερή) ή 1:2 (1 WT: 2 RANKL^{G278R}). Σύμφωνα με το μοριακό μοντέλο ο σχηματισμός ετεροτριμερών παρουσία ενός RANKL^{G278R} μονομερούς θα μπορούσε να είναι εφικτός, δεδομένου ότι 2 υδρόφοβες διεπιφάνειες από τις τρεις των μονομερών θα μπορούσαν να συγκρατούν το τριμερές και να καθίσταται βιολογικά δραστικό (Εικ. 6.1A).

Αντίθετα, παρουσία 2 ή 3 RANKL^{G278R} μονομερών στο τριμερές προκαλεί εισαγωγή επιπλέον θετικών φορτίων και χωροταξικών τροποποιήσεων στην υδρόφοβη περιοχή με αποτέλεσμα την αδυναμία σχηματισμού λειτουργικών τριμερών. Ωστόσο, στα ετερόζυγα RANKL^{tlcs/+} ποντίκια που εκφράζουν ίσες ποσότητες των WT και RANKL^{G278R} πρωτεϊνών δεν παρατηρείται το φαινόμενο της κυρίαρχης αρνητικής επίδρασης. Φαίνεται ότι σε μια

δυναμική κατάσταση στα ετερόζυγα ποντίκια, ο RANKL σχηματίζει λειτουργικά WT ομοτριμερή καθώς και ετεροτριμερή (2 WT: 1 RANKL^{G278R}). Η επιβεβαίωση του παραπάνω μοντέλου επαληθεύεται τόσο από τις δοκιμές οστεοκλαστογένεσης όπου αναλογία 2:1 (2 WT: 1 RANKL^{G278R}) επάγει τον σχηματισμό οστεοκλαστών όσο και σε πειράματα ανοσοκαθίζησης όπου ευκαρυωτικά κύτταρα HEK 293FT επιμολύνθηκαν ταυτόχρονα με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης χιμαιρικών πρωτεϊνών WT-RANKL-FLAG, WT-RANKL-Myc ή RANKL^{G278R}-Myc. Στα πειράματα αυτά δείχθηκε ότι η WT-RANKL-FLAG συν-ανοσοκαθίζει τόσο με την WT-RANKL-Myc όσο και με την RANKL^{G278R}-Myc πρωτεΐνη (Douni et al. 2012) συνεπώς η WT RANKL αλληλεπιδρά με την RANKL^{G278R} οπότε η αναλογία τους καθορίζει τον σχηματισμό λειτουργικών τριμερών ή εκδήλωση του φαινομένου της κυρίαρχης αρνητικής επίδρασης.

Επιπλέον, θέλοντας να διερευνήσουμε με βιοχημικό τρόπο την αλληλεπίδραση της WT-RANKL με την RANKL^{G278R} πρωτεΐνη προχωρήσαμε σε πειράματα cross-linking. Ειδικότερα, προεπωάζοντας ίσες ποσότητες WT και RANKL^{G278R} πρωτεϊνών παρουσία του παράγοντα διασύνδεσης DSS παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση της έντασης των τριμερών, διμερών και μονομερών, στοιχείο που υποδηλώνει σαφή αλληλεπίδραση μεταξύ των WT και RANKL^{G278R} πρωτεϊνών. Η αύξηση των τριμερών πρέπει να είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού τόσο WT ομοτριμερών όσο και ετεροτριμερών (2 WT μονομερή: 1 RANKL^{G278R} μονομερές). Έτσι, ο προτεινόμενος μηχανισμός αλληλεπίδρασης περιλαμβάνει μια δυναμική κατάσταση ανταλλαγής ενός WT μονομερούς από τα ομοτριμερή με ένα RANKL^{G278R} μονομερές που οδηγεί στο σχηματισμό επιπλέον ετερο-τριμερών (τα οποία μπορεί να είναι λειτουργικά σύμφωνα με την *in silico* ανάλυση. Ακολούθως, περισσότερα ελεύθερα WT μονομερή αλληλεπιδρούν για το σχηματισμό περισσότερων διμερών ή και μονομερών μέσα από μια δυναμική διαδικασία (Εικ. 6.1B).



Εικόνα 6.1. Μοντελοποίηση της δομής της μεταλλαγμένης RANKL^{G278R} πρωτεΐνης. (Α) Γραφική απεικόνιση ενός ετεροτριμερούς (2 WT: 1 RANKL^{G278R}) με μοντελοποίηση τύπου ‘κορδέλα’ όπου στον άξονα συμμετρίας του τριμερούς με πορτοκαλί φαίνεται η γλυκίνη 278 του αγρίου τύπου μονομερούς ενώ με κίτρινο η αργινίνη του μεταλλαγμένου μονομερούς. **(Β)** Σχηματική απεικόνιση του μοντέλου αλληλεπίδρασης μεταξύ WT-RANKL (πράσινο χρώμα) και RANKL^{G278R} μονομερών (μωβ χρώμα) όσον αφορά τον σχηματισμό τριμερών.

Το αμινοξύ γλυκίνη στην θέση 278 της πρωτεΐνης RANKL είναι αρκετά συντηρημένο μεταξύ διαφόρων μελών της υπεροικογένειας του TNF όπως TNF, CD40L, TRAIL, BAFF και APRIL. Σε ασθενείς με σύνδρομο X-εξαρτώμενης υπερπαραγωγής ανοσοφαιρίνης τύπου M (X-linked hyper IgM syndrome), έχει εντοπιστεί μία υποκατάσταση της συντηρημένης γλυκίνης σε βαλίνη στην θέση 227 στον CD40L (Seyama et al. 1998). Ωστόσο δεν έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η υποκατάσταση αυτή προκαλεί αποτριμερισμό της CD40L πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό μας οδήγησε στο να διερευνήσουμε αν η υποκατάσταση της γλυκίνης προκαλεί απώλεια τριμερισμού στις πρωτεΐνες TNF και BAFF.

Ο TNF έχει κεντρικό ρόλο στην παθογένεια σε χρόνιες φλεγμονώδεις παθήσεις και αυτοάνοσες ασθένειες (Douni et al., 2007). Η ανάπτυξη και δοκιμή νέων παρεμποδιστών του TNF αποτέλεσε ένα δυναμικό πεδίο με την κυκλοφορία των πρώτων βιολογικών φαρμάκων για την θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της φλεγμονώδους εντεροπάθειας τύπου Crohn. Αντίστοιχη υποκατάσταση της γλυκίνης από αργινίνη έγινε στην θέση 122 (G122R) του εκκρητικού τύπου του TNF με αποτέλεσμα την αδυναμία τριμερισμού καθώς και απώλεια

της βιολογικής του δράσης, με αδυναμία πρόσδεσης στον υποδοχέα p75TNF. Από την άλλη, η BAFF πρωτεΐνη αποτελεί ζωτικής σημασίας παράγοντα για την ομαλή ανάπτυξη, διαφοροποίηση και λειτουργία των Β-λεμφοκυττάρων και ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο για αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (Davidson 2009; Nashi E, Wang Y 2010; Davidson 2011). Ομοίως, παρατηρήσαμε ότι η αντίστοιχη υποκατάσταση της γλυκίνης από αργινίνη στην θέση 249 (G249R) στην BAFF πρωτεΐνη προκαλεί αποσταθεροποίηση της δομής και αποτριμερισμό καθώς και απώλεια πρόσδεσης στον υποδοχέα BAFF-R. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν την σημαντικότητα του συντηρημένου αμινοξέος της γλυκίνης ανάμεσα στα μέλη της υπερικογένειας του TNF και τον αντίκτυπο που έχει για τον τριμερισμό και την βιολογική τους δραστηριότητα μια πιθανή λειτουργική μετάλλαξη στη θέση αυτή. Η ανάπτυξη και ο σχεδιασμός νέων αναστολέων που στοχεύουν στην εξωκυτταρική περιοχή που περιέχει το αμινοξύ της γλυκίνης με σκοπό την παρεμπόδιση του τριμερισμού θα μπορούσε να αποτελέσει ένα νέο δυνητικά θεραπευτικό στόχο για την θεραπεία παθήσεων που σχετίζονται με την δράση των μελών της υπερικογένειας του TNF, όπως του TNF και του RANKL.

6.2 Έλεγχος νέων αναστολέων του RANKL που στοχεύουν τον τριμερισμό του

Ο RANKL αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο σε παθήσεις με αυξημένη οστική απώλεια όπως οστεοπόρωση, ρευματοειδής αρθρίτιδα και οστικές μεταστάσεις (Yasuda 2013). Η χρήση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών όπως RANK-Fc, OPG-Fc και αντι-RANKL αντισωμάτων για την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ RANKL- RANK έχει επιτυχώς εφαρμοστεί για την θεραπεία οστεολυτικών παθήσεων (Cummings et al. 2009; Feeley et al. 2006; Body et al. 2003). Ωστόσο, η θεραπευτική εφαρμογή τόσο μεγάλων μακρομορίων έχει αναδείξει μια σειρά περιορισμών και μειονεκτημάτων όπως αντιγονικότητα, περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα και υψηλό κόστος παραγωγής. Με σκοπό να υπερκεραστούν τέτοια προβλήματα έχουν αναπτυχθεί μια σειρά νέων θεραπευτικών παραγόντων όπως μικρά πεπτιδία ή πεπτιδίο-μιμητικά μόρια με βάση την δομή του RANKL και του υποδοχέα RANK που δρουν ανταγωνιστικά (Ta et al. 2010; Liu et al. 2010; Aoki et al. 2006). Η ταυτοποίηση και αναγνώριση του κρίσιμου αμινοξέος G278 το οποίο εμπλέκεται στην λειτουργία και τον τριμερισμό του RANKL αποτελεί δυνητικά ένα νέο θεραπευτικό στόχο στην λογική σχεδιασμού πεπτιδίων ή μικρών μορίων που στοχεύουν και αλληλεπιδρούν επιλεκτικά στην θέση G278.

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 (He et al. 2005). Λόγω της υψηλής δομικής ομοιότητας των πρωτεϊνών της TNF υπεροικογένειας, ελέγχθηκε η δράση του SPD-304 στην αναστολή του RANKL. Σε *in vitro* πειράματα δείχθηκε ότι η παρουσία του SPD-304 αναστέλλει την RANKL-εξαρτώμενη οστεοκλαστογένεση. Ο παρεμποδιστικός μηχανισμός δράσης του SPD-304 σε *in vitro* δοκιμές μπορεί να ερμηνευτεί σαν παρεμβολή του SPD-304 ανάμεσα στις υδρόφοβες επιφάνειες των μονομερών του RANKL προκαλώντας αποδιάταξη του τριμερούς. Όντως, *in silico* πρόβλεψη της περιοχής αλληλεπίδρασης του SPD-304 με την δομή του RANKL προβλέπει αλληλεπίδραση πολύ κοντά στο σημείο G278 της μετάλλαξης (<4Å) (Εικ. 4.1A). Έτσι, φαίνεται ότι τόσο η θέση της υποκατάστασης G278R όσο και το SPD-304 δρουν ανασταλτικά ανάμεσα στις υδρόφοβες επιφάνειες των μονομερών διαταράσσοντας έτσι τον τριμερισμό του RANKL. Βιοχημική επιβεβαίωση των παραπάνω, κατέδειξε ότι η παρουσία

του SPD-304 προκαλεί απελευθέρωση διμερών και μονομερών από το RANKL τριμερές, πιθανόν μέσα από έναν παρόμοιο μηχανισμό όπως με τον TNF.

Το μικρό μόριο SPD-304 έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στην πρωτεΐνη RANKL του ανθρώπου ($K_d=14.1$) και να αναστέλλει την διαφοροποίηση των οστεοκλαστών ($IC_{50}=0.99\pm 0.16\mu M$) παρουσιάζοντας όμως υψηλή τοξικότητα ($LC_{50}=3.20\pm 0.11\mu M$). Μεταβολικά πειράματα, υποδεικνύουν πως ο 3-μεθυλ-ινδολικός δακτύλιος του SPD-304 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 & Yost 1996).

Δυστυχώς, το μόριο αυτό δεν μπόρεσε να αξιοποιηθεί περαιτέρω σε προκλινικές δοκιμές πιθανόν λόγω της υψηλής τοξικότητάς που εμφάνιζε σε πειράματα κυτταροκαλλιέργειας.

Σε μία προσπάθεια αξιοποίησης της ιδιότητας που έχει το μόριο SPD-304 να αναστέλλει την δράση της πρωτεΐνης RANKL, σχεδιάστηκαν 72 δομικά ανάλογά του τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα δέσμευσης της πρωτεΐνης, την δραστηριότητα και την τοξικότητα τους. Ειδικότερα, από τις 72 ενώσεις εντοπίσαμε 17 ανάλογα του SPD-304 που σε συγκέντρωση $5\mu M$ εμφανίζουν πλήρη παρεμποδιστική δράση στην οστεοκλαστογένεση. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής επικεντρωθήκαμε σε 7 ενώσεις που έδειξαν πλήρη παρεμπόδιση και χαμηλή κυτταροτοξικότητα.

Αρχικά, έγινε τροποποίηση του τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτυλίου του μορίου SPD-304 σε αρωματικό δακτύλιο που περιέχει μία θειϊκή ομάδα ως υποκαταστάτη (PRA2.2.3) (Εικ. 4.6). 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 επηρέασε την αναστολή της διαδικασίας της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=0.86\pm 0.18\mu M$). Διατηρώντας την τροποποίηση του τριφθορομεθυλοφαίνυλο δακτυλίου, απομακρύνθηκαν τα μεθύλια της διμεθυλοχρωμόνης. Η απομάκρυνση του 7' μεθυλίου (PRA2.2.2) (Εικ. 4.7) δεν βελτίωσε ούτε την τοξικότητα του μορίου ($LC_{50}=4.78\pm 0.08\mu M$), ούτε την αναστολή της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών ($IC_{50}=0.84\pm 0.17\mu M$), ενώ η απομάκρυνση του 6' μεθυλίου (PRA2.2.4) (Εικ. 4.8) μείωσε λίγο την τοξικότητα του μορίου ($LC_{50}=12.60\pm 1.60\mu M$) και την ικανότητα να αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση ($IC_{50}=3.94\pm 0.32\mu M$). Τέλος, η απομάκρυνση και των δύο μεθυλίων (PRA2.2.1) της διμεθυλοχρωμόνης (Εικ. 4.9), είχε ως αποτέλεσμα το μόριο να έχει πολύ μικρότερη τοξικότητα ($LC_{50}=58.50\pm 5.00\mu M$), και λίγο χαμηλότερη δραστηριότητα στην αναστολή της οστεοκλαστογένεσης ($IC_{50}=2.5\pm 0.67\mu M$) συγκριτικά με το SPD-304. Επομένως, η απομάκρυνση και των δύο μεθυλίων της χρωμόνης, είναι απαραίτητη για την

μείωση της τοξικότητας των αναλόγων, ενώ η αλλαγή του τριφθορομεθυλοφαινυλο δακτυλίου στον αρωματικό δακτύλιο με υποκαταστάτη τη θειϊκή ομάδα δεν φαίνεται να παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην βελτίωση των ιδιοτήτων των αναλόγων.

Στη συνέχεια, αντικαταστάθηκε ----- (PRA6.2.12) (Εικ. 4.10) και ----- (PRA6.3.12) (Εικ. 4.11). Και τα δύο μόρια ανέστειλαν την διαδικασία της οστεοκλαστεογένεσης 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 ($IC_{50}=0.99\pm 0.16\mu M$). Αξίζει να σημειωθεί πως τα μόρια PRA6.2.12 και PRA6.3.12 είναι τα πιο δραστικά από όσα δοκιμάστηκαν, υποδεικνύοντας πως η αλλαγή της διαμίνης σε διαμίδιο πιθανώς είναι ευεργετική ως προς την δραστηριότητα των αναλόγων. 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 ($LC_{50}=3.20\pm 0.11\mu M$) ενώ 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. Συνεπώς, η αλλαγή ----- στο PRA6.3.12 μόριο δεν φαίνεται να ωφέλησε τις ιδιότητες του μορίου ως προς την κυτταροτοξικότητα.

Έχοντας υπόψη τις τροποποιήσεις των προηγούμενων μορίων οι οποίες είχαν ένα θετικό αποτέλεσμα στις ιδιότητες των αναλόγων, σχεδιάστηκε ένα νέο μόριο (PRA5.2.8) (Εικ. 4.12), ο τριφθορομεθυλοφαινυλο 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 ($K_d=14.1$). 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 (Εικ. 4.13). 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 με το SPD-304 ($K_d=14.1$). Ως εκ τούτου, το μόριο PRA8.2.8 είναι πολύ δραστικό ($IC_{50}=1.87\pm 0.23\mu M$) και αποτελεί ένα μόριο που θα μπορούσε να ελεγχθεί σε προκλινικές δοκιμές στο μέλλον. 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 4.14). Οι αλλαγές αυτές βελτίωσαν την συγγένεια του μορίου με την πρωτεΐνη ($K_d=2.82$) σε σχέση με το αρχικό μόριο ($K_d=14.1$), 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 το PRA5.2.8 ($IC_{50}=8.55\pm 1.00\mu M$), δεν έφτασε όμως την δραστικότητα του αρχικού μορίου SPD-304 ($IC_{50}=0.99\pm 0.16\mu M$). Γενικά, φάνηκε ότι 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. Όσο βέβαια μειώνεται η κυτταροτοξικότητα ενός αναστολέα όπως στις ενώσεις PRA2.2.1, PRA8.2.8, και PRA5.2.8 τόσο απομακρύνεται η πιθανότητα να σχετίζεται η παρεμπόδιση της RANKL-επαγόμενης οστεοκλαστογένεσης με το φαινόμενο της κυτταροτοξικότητας.

Δεδομένου ότι το SPD-304 προσδένεται και στον TNF, τα 72 SPD-304 ανάλογα ελέγχθησαν από την ερευνητική ομάδα του Καθ. Γ. Κόλλια ως προς την παρεμποδιστική τους δράση σε δοκιμές TNF-επαγόμενης κυτταροτοξικότητας (της κυτταρικής σειράς L929) καθώς και σε δοκιμές πρόσδεσης του TNF με τα μόρια αναστολείς από την ομάδα του Καθ. Γ. Κοντοπίδη. Από τα 7 μικρά μόρια αναστολείς της RANKL πρωτεΐνης, με εξαίρεση το PRA2.2.1, παρατηρήθηκε, ότι δεν εμφανίζουν κάποια παρεμποδιστική δράση στην TNF-επαγόμενη κυτταροτοξικότητα (Πίνακας 6.I). Συνεπώς, τα μικρά μόρια PRA2.2.1, PRA5.2.8, PRA6.2.12, PRA6.3.12, PRA8.2.8 και PRA9.2.8 αναστέλουν εκλεκτικά την δράση του RANKL και όχι του TNF (Alexiou Polyxeni, 2014).

Compound ID	In vitro TNF- α		In vitro RANKL		
	Kd (μ M)	L929 assay (IC50 [μ M])	Kd (μ M)	Osteoclastogenesis, (IC50 [μ M])	toxicity (LC50 [μ M])
SPD304	8.38	toxic (<5)	14.1	0.99 \pm 0.16	3.2 \pm 0.11
PRA_2_2_1	7.61	>80	5.24	2.5 \pm 0.67	58.5 \pm 5
PRA_2_2_4	5.06	10	4.9	3.94 \pm 0.32	12.6 \pm 1.6
PRA_5_2_8	7.02	not active	4.6	8.55 \pm 1	62.33 \pm 2.59
PRA_6_2_12	2.5*	>40	0.7	0.12 \pm 0.06	19.5 \pm 1.51
PRA_6_3_12	>25**	not active	4.6	0.13 \pm 0.07	8.44 \pm 0.53
PRA_8_2_8	12.18	not active	2.18	1.87 \pm 0.23	51.97 \pm 2.64
PRA_9_2_8	13	not done	2.82	2.92 \pm 0.23	13.07 \pm 0.94

Πίνακας 6.1. Συνοπτικός πίνακας της δράσης των επιλεγμένων SPD-304 αναλόγων σε TNF και RANKL ως προς την σταθερά διάστασης (Kd), τις λειτουργικές δοκιμές και την κυτταροτοξικότητά τους.

Τέλος, προσδιορίστηκε ο μηχανισμός με τον οποίο επιδρούν τα μόρια – ανάλογα του SPD-304 με την μέθοδο cross-linking (Εικ. 4.15). Η μέθοδος υποδεικνύει πως παρουσία των αναλόγων διαταράσσεται η δυναμική ισορροπία που φυσιολογικά τείνει στον σχηματισμό των RANKL 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.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν για πρώτη φορά μικρά μόρια που στοχεύουν την πρωτεΐνη RANKL στη διαδικασία του τριμερισμού. Έπειτα από την αξιολόγηση των μικρών μορίων-αναλόγων του SPD-304 που σχεδιάστηκαν, τα μόρια που εμφάνιζαν την πιο θετική επίδραση στην αναστολή της οστεοκλαστογένεσης, χωρίς να επηρεάζουν στην επιβίωση των κυττάρων ήταν τα PRA2.2.1, PRA6.2.12 και PRA8.2.8. Η επόμενη κρίσιμη φάση στην μελέτη των νέων RANKL αναστολέων είναι η αξιολόγησή τους σε προκλινικές δοκιμές χρησιμοποιώντας κατάλληλα ζωικά μοντέλα υπερέκφρασης του RANKL.

6.3 Δημιουργία και χαρακτηρισμός διαγονιδιακών ποντικών που εκφράζουν τον *huRANKL* για την αξιολόγηση νέων αναστολέων του RANKL

Η αξιολόγηση νέων αναστολέων του RANKL σε προκλινικό επίπεδο αποτελεί πρόκληση στην σημερινή εποχή μιας και η αναστολή του από το μονοκλωνικό αντισώμα denosumab αποτελεί την νέα και ιδιαίτερα επιτυχημένη φαρμακευτική αντιμετώπιση της εμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Δεδομένου ότι ο RANKL έχει αναδειχθεί ο κύριος θεραπευτικός στόχος για την θεραπεία της οστικής απώλειας σε μια ποικιλία οστικών νοσημάτων που πλήττουν ένα σημαντικό ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού, τα επόμενα χρόνια αναμένεται να πυροδοτηθεί η έρευνα που στοχεύει στην εύρεση νέων RANKL αναστολέων. Συνεπώς, η ανάγκη δημιουργίας νέων ζωικών μοντέλων κατάλληλων για την αξιολόγηση νέων φαρμάκων που στοχεύουν την οστική απώλεια, αποτελεί μονόδρομο στο πεδίο της σύγχρονης έρευνας αφού τα υπάρχοντα μοντέλα ανταποκρίνονται μερικώς στην αποστολή τους.

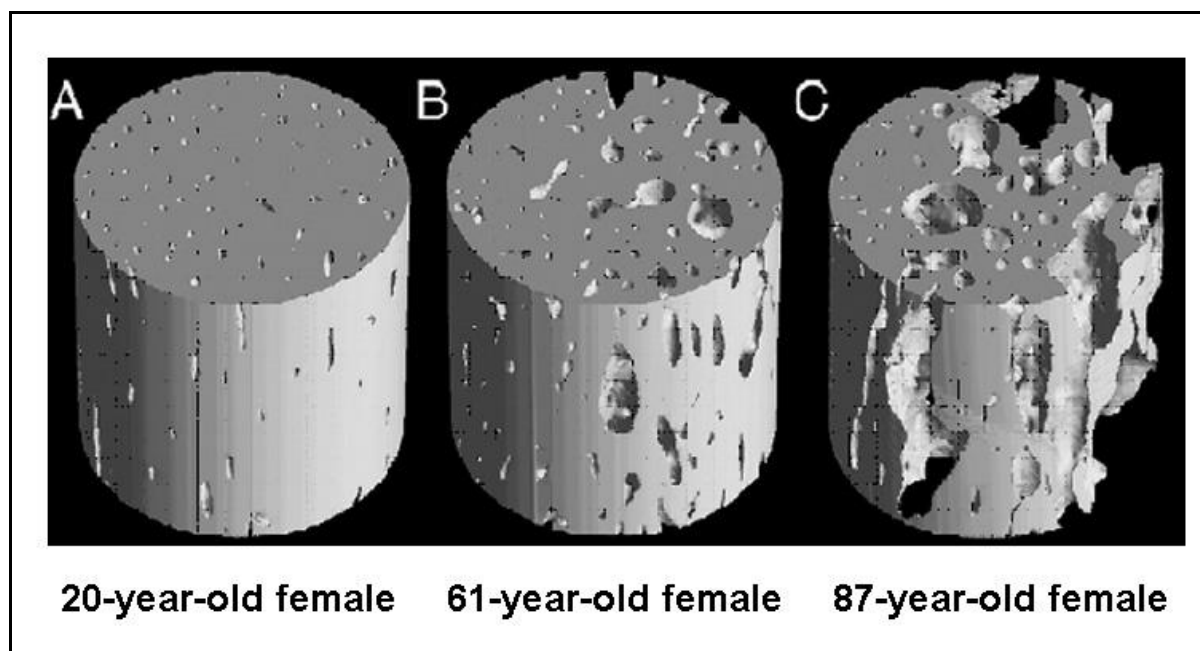
Στην παρούσα διδακτορική μελέτη περιγράφεται η δημιουργία ενός νέου μοντέλου οστεοπόρωσης σε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον ανθρώπινο RANKL (*huRANKL*). Το *huRANKL* γονίδιο περιλαμβάνει 5 εξόνια με αρκετά μεγάλη συντηρητικότητα ανάμεσα στα θηλαστικά και με ομόλογα γονίδια μόνο σε οργανισμούς που περιέχουν οστεοκλάστες, όπως είναι τα σπονδυλωτά. Η ρύθμιση της έκφρασης του RANKL γονιδίου ελέγχεται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες που μπορεί να εντοπίζονται σε απόσταση ακόμη και 70 kb από το σημείο έναρξης της μεταγραφής (O'Brien 2011). Με σκοπό να επιτύχουμε ένα φυσιολογικό πρότυπο υπερέκφρασης του διαγονιδίου απομονώσαμε μια γενωμική περιοχή 200kb από ένα BAC κλώνο, που περιλαμβάνει την κωδική περιοχή του *huRANKL* και όλες τις ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου και το τμήμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για μικροένεση σε προπυρήνες γονιμοποιημένων ωαρίων. Τα διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν τόσο μεγάλες γονιδιωματικές κατασκευές, όπως οι BAC κλώνοι, φαίνεται ότι ακολουθούν ένα φυσιολογικό πρότυπο υπερέκφρασης του διαγονιδίου και η έκφραση είναι ανάλογη του αριθμού των αντιγράφων του διαγονιδίου και ανεξάρτητη από τη θέση ενσωμάτωσης (van Keuren et al. 2009). Τα παραπάνω στοιχεία, επαληθεύθηκαν και στην περίπτωση των TgRANKL διαγονιδιακών ποντικών, όπου δείξαμε ότι α) το πρότυπο έκφρασης του *huRANKL* διαγονιδίου σε διάφορους ιστούς ακολουθεί το αντίστοιχο του ενδογενούς *muRANKL* γονιδίου και β) η έκφραση του διαγονιδίου βρίσκεται σε αντιστοιχία με τον αριθμό αντιγράφων του διαγονιδίου.

Στην παρούσα μελέτη επικεντρώθηκαν στην μελέτη δύο διαγονιδιακών σειρών που εκφράζουν τον huRANKL, τις Tg5516 και Tg5519. Η διαγονιδιακή σειρά Tg5516 φέρει ένα επιπλέον αντίγραφο του huRANKL διαγονιδίου και εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της RANKL σε σχέση με τα WT ποντίκια ενώ η διαγονιδιακή σειρά Tg5519 φέρει 10 αντίγραφα με ακόμη υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του huRANKL σε σχέση με την Tg5516 σειρά. Ο RANKL εκφράζεται φυσιολογικά σε διάφορους κυτταρικούς τύπους τόσο στο σκελετικό σύστημα όσο και σε εξωσκελετικούς ιστούς (Kartsogiannis et al. 1999). Από πειράματα συγκριτικής ανάλυσης των επιπέδων έκφρασης του huRANKL παρατηρήσαμε ότι και στις δύο διαγονιδιακές σειρές το huRANKL γονίδιο υπερεκφράζεται στους ιστούς που εκφράζεται το ενδογενές muRANKL γονίδιο. Ειδικότερα, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του huRANKL στα διαγονιδιακά ποντίκια εντοπίζονται στα οστά, κάτι που συμφωνεί με νεότερες μελέτες που δείχνουν ότι τα οστεοκύτταρα αποτελούν την σημαντικότερη πηγή έκφρασης του RANKL (O'Brien et al. 2013). Ακόμη, εντοπίζονται σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης και σε άλλους ιστούς και όργανα εκτός από τα οστά όπως τον εγκέφαλο και τον σπλήνα. Τα ευρήματα αυτά θέτουν ερωτήματα σε σχέση με την παθοφυσιολογία που πιθανώς να συσχετίζεται με την υπερέκφραση του huRANKL διαγονιδίου σε εξωσκελετικούς ιστούς αλλά και το ανοσολογικό προφίλ στα διαγονιδιακά ποντίκια και ειδικότερα τα Tg5519 ποντίκια. Περαιτέρω μελέτες πρόκειται να διαλευκάνουν τα ενδιαφέροντα αυτά σημεία αφού η μελέτη μας επικεντρώθηκε στην ανάλυση του σκελετικού συστήματος.

Οι δύο TgRANKL διαγονιδιακές σειρές εμφανίζουν μία πρόωρη εμφάνιση οστεοπορωτικού φαινοτύπου και στα δύο φύλα. Τα Tg5516 ποντίκια που υπερεκφράζουν το huRANKL διαγονίδιο σε σχετικά μικρότερα επίπεδα εμφανίζουν σημαντική απώλεια του σπογγώδους οστού στην μετάφυση του μηριαίου ήδη από την ηλικία των 2 μηνών με μειωμένες εμβιομηχανικές ιδιότητες σε σχέση με τα WT αδέρφια τους (Rinotas et al. 2014). Επίσης, σημαντική οστική απώλεια του σπογγώδους οστού παρατηρείται και στους σπόνδυλους της οσφυϊκής μοίρας. Αντίθετα, δεν παρατηρείται κάποια αλλοίωση στην δομή του φλοιώδους οστού μεταξύ των WT και Tg5516 ποντικών. Συμπερασματικά, τα Tg5516 (low copy) ποντίκια εμφανίζουν ήπια μορφής οστεοπόρωση.

Από την άλλη πλευρά, τα Tg5519 ποντίκια εμφανίζουν έντονα οστεοπορωτικά στοιχεία, με πλήρη απώλεια του σπογγώδους οστού, αυξημένη οστεοκλαστογένεση, προοδευτική καταστροφή της αναπτυξιακής πλάκας και έντονη πορώδη δομή του φλοιώδους οστού στην περιοχή του μηριαίου. Η έντονη οστική απώλεια δεν περιορίζεται μόνο στα μακρά οστά αλλά εντοπίζεται και στους σπόνδυλους της οσφυϊκής μοίρας με πλήρη αποδιοργάνωση και απώλεια του σπογγώδους στο κεντρικό σώμα των σπονδύλων. Αξιοσημείωτο είναι το

γεγονός ότι η πλήρης αποδιοργάνωση της μικροαρχιτεκτονικής του σπογγώδους οστού συνοδεύεται από σχηματισμό οστικών μικροδοκίδων που διασχίζουν κατά μήκος το σώμα του σπόνδυλου έχοντας ως φαίνεται στηρικτικό ρόλο. Τέλος, τα φαινοτυπικά στοιχεία που συμπληρώνουν την κλινική εικόνα είναι η σημαντική μείωση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων των οστών με σημαντικά μειωμένη οστική αντοχή (Rinotas et al. 2014). Τα κύτταρα του χόνδρου φαίνεται να αποτελούν μία σημαντική πηγή υπερέκφρασης του RANKL που ίσως επάγουν απώλεια του χόνδρου με σταδιακή αποδόμηση της αναπτυξιακής πλάκας που επιφέρει αναπτυξιακή υστέρηση του μηριαίου (Εικ. 5.11-12). Επίσης, η παρουσία έντονης οστεοκλαστικής δράσης στην περιοχή του φλοιώδους προκαλεί έντονα πορώδη δομή, στοιχείο που υποδηλώνει αυξημένη οστική απορρόφηση στα Tg5519 ποντίκια. Στους ανθρώπους έντονη πορώδη δομή του φλοιώδους οστού εμφανίζεται σε ασθενείς με οστεοπόρωση, κάτι που συσχετίζεται με μειωμένη οστική αντοχή και αυξημένο κίνδυνο πρόκλησης καταγμάτων (Cooper et al. 2007) (Εικ. 6.2). Συνεπώς, τα διαγονιδιακά Tg5519 ποντίκια αποτελούν ένα νέο πειραματικό μοντέλο οστεοπόρωσης που δίνει τη δυνατότητα μελέτης των παθογενετικών μηχανισμών που διέπουν την εμφάνιση οστικής απώλειας αλλά και την αξιολόγηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων αναλύοντας παράλληλα το σπογγώδες με το φλοιώδες.



Εικόνα. 6.2. Τρισδιάστατη απεικόνιση του φλοιώδους οστού όπου διακρίνεται η χαρακτηριστική σταδιακή αύξηση του πορώδους κατά την γήρανση των γυναικών σε ηλικίες (A) 20 ετών (B) 61 ετών και (C) 87 ετών (Cooper et al. 2007).

Επιπρόσθετα, τα οστεοπορωτικά Tg5519 ποντίκια εμφανίζουν σταδιακά αυξημένη λιπογένεση στην κοιλότητα του μυελού των οστών, κάτι που συμβαίνει επίσης στους ανθρώπους κατά την γήρανση και την οστεοπόρωση (Rosen & Klibanski 2009; Hardouin et al. 2014). Πολλές μελέτες αναφέρουν αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του φαινομένου της αυξημένης λιπογένεσης στο μυελό των οστών και της οστικής πυκνότητας, καθώς οι οστεοβλάστες και τα λιποκύτταρα προέρχονται από κοινά πρόδρομα μεσεγχυματικά κύτταρα (Li et al. 2011). Η γήρανση και η μείωση των οιστρογόνων αποτελούν παράγοντες που επάγουν την αυξημένη λιπογένεση στο μυελό των οστών με ταυτόχρονη μείωση του αριθμού των οστεβλαστών (Foo et al. 2007; Sharma et al. 2014). Ωστόσο, ο ακριβής μοριακός μηχανισμός που ρυθμίζει την λιπογένεση και την σημασία της στον οστικό μεταβολισμό παραμένει άγνωστος. Τα Tg5519 ποντίκια εμφανίζουν αυξημένο αριθμό λιποκυττάρων ήδη από την ηλικία των 3 μηνών, όπου έχει ήδη συντελεστεί σημαντική οστική απώλεια, με προοδευτική αύξηση όσο προχωρά η παθολογία. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν ότι η αυξημένη λιπογένεση δεν προηγείται της οστικής απορρόφησης αλλά μάλλον αποτελεί ένα επιπρόσθετο παθολογικό εύρημα καθώς εξελίσσεται η ασθένεια. Συνεπώς, τα Tg5519 ποντίκια θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα ιδανικό μοντέλο για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την αυξημένη λιπογένεση στο μυελό των οστών κατά την οστεοπόρωση.

Τα Tg5519 ποντίκια εμφανίζουν αρκετές φαινοτυπικές ομοιότητες με ένα γενετικό μοντέλο στο οποίο έγινε απαλοιφή του OPG γονιδίου ($OPG^{-/-}$) που κωδικοποιεί την παραγωγή του φυσικού αναστολέα του RANKL, OPG. Τα $OPG^{-/-}$ ποντίκια εμφανίζουν επίσης πλήρη απώλεια του σπογγώδους οστού, προοδευτική καταστροφή της αναπτυξιακής πλάκας και έντονη πορώδη δομή του φλοιώδους οστού (Bucay et al. 1998). Επιπλέον, εμφανίζουν εναποθέσεις ασβεστίου στην αορτή και τις νεφρικές αρτηρίες, στοιχείο που δεν παρουσιάζουν τα Tg5519 ποντίκια. Η συμβολή του RANKL στην πρόκληση ασβεστοποίησης των αγγείων παραμένει συγκεχυμένη λόγω των αντικρουόμενων αναφορών από διάφορες μελέτες (Kaden et al. 2004; Tseng et al. 2010). Ωστόσο, σε ζωικά μοντέλα με ασβεστοποίηση των αγγείων που έγινε χορήγηση του denosumab ενός αναστολέα του RANKL προκάλεσε αναστολή στην ασβεστοποίηση των αγγείων (Helas et al. 2009). Η μεγάλη ομοιότητα που εμφανίζουν τα $OPG^{-/-}$ με τα TgRANKL ποντίκια οφείλεται προφανώς σε ένα κοινό παθογενετικό μηχανισμό που αφορά στην παρουσία ελεύθερου RANKL, είτε λόγω απουσίας του αναστολέα OPG είτε λόγω υπερέκφρασης, που προκαλεί οστεοκλαστογένεση και οστική απώλεια.

Πολλές πειραματικές προσεγγίσεις πραγματοποιήθηκαν κατά το παρελθόν με σκοπό την αναστροφή της RANKL-επαγόμενης οστεοπέτρωσης χορηγώντας ανασυνδυσασμένη RANKL πρωτεΐνη. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την μερική ή πλήρη διάσωση του φαινοτύπου (N. Kim et al. 2000b; Douni et al. 2012; Lo Iacono et al. 2012). Αντίστοιχα, στην παρούσα μελέτη επιτύχαμε μερική διάσωση του RANKL-εξαρτώμενου οστεοπετρωτικού φαινοτύπου των RANKL^{tes/tes} ποντικών διασταυρώνοντάς τα με τα TgRANKL οστεοπορωτικά ποντίκια. Παρατηρήσαμε ότι στα Tg5516/RANKL^{tes/tes} ποντίκια η έκφραση του huRANKL διαγονιδίου προκαλεί μερική διάσωση του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου των RANKL^{tes/tes} ποντικών με πλήρη σχηματισμό της κοιλότητας του μυελού των οστών, αποτέλεσμα της παρουσίας οστεοκλαστών, ωστόσο χωρίς να σχηματίζονται μεσεντέριοι λεμφαδένες. Αντίθετα, η υπερέκφραση του huRANKL διαγονιδίου στα Tg5519 ποντίκια οδήγησε σε πλήρη διάσωση του RANKL-επαγόμενου οστεοπετρωτικού φαινοτύπου και σχηματισμό λεμφαδένων. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι το πρότυπο και τα επίπεδα υπερέκφρασης του huRANKL διαγονιδίου είναι επαρκή και ικανά για την πλήρη διάσωση του οστεοπετρωτικού φαινοτύπου, κάτι που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί σε επόμενο στάδιο για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων στην ARO με την χορήγηση RANKL. Οι TgRANKL διαγονιδιακές σειρές αποτελούν μοναδικά μοντέλα για την αξιολόγηση νέων αναστολέων έναντι του huRANKL σε προκλινικό επίπεδο, υπερτερώντας σε σχέση με τα υπάρχοντα ζωικά μοντέλα έκφρασης του huRANKL. Λόγω της υψηλής ειδικότητά τους τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του huRANKL, όπως το denosumab, δεν δένονται στο RANKL του ποντικού, συνεπώς δεν μπορούν να αξιολογηθούν στο κλασικό μοντέλο οστεοπόρωσης στο ποντίκι που επάγεται με ωθηκεκτομή (Bouxsein et al. 2005). Όλες οι προκλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν κατά το παρελθόν για την εκτίμηση της δραστηριότητας και ασφάλειας του denosumab, του μονοκλωνικού αντισώματος που χορηγείται στην εμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση, περιορίστηκε σε δοκιμές σε πθήκους (Kostenuik et al. 2011; Ominsky et al. 2011) και σε ένα πειραματικό μοντέλο που εκφράζει μία χμιαρική μορφή της RANKL πρωτεΐνης (ανθρώπινου/ποντικού) (Kostenuik et al. 2009). Αυτό το μοντέλο όμως παρουσίαζε σημαντικά μειονεκτήματα όπως χαμηλό ρυθμό οστικής ανακατασκευής με αποτέλεσμα να παρουσιάζει υψηλότερη οστική μάζα σε σχέση με τα WT ποντίκια καθιστώντας το μη αξιόλογο μοντέλο στην προκλινική έρευνα για την θεραπεία της οστεοπόρωσης. Αντίθετα, τα TgRANKL ποντίκια αναπτύσσουν πρόωρη οστεοπόρωση απόρροια του υψηλού ρυθμού οστικής ανακατασκευής. Έτσι, για πρώτη φορά έγινε εφικτή μία προκλινική δοκιμή του denosumab σε πειραματικό μοντέλο που υπερεκφράζει το huRANKL, όπως είναι τα Tg5519 ποντίκια. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η θεραπευτική

χορήγηση του denosumab όχι μόνο απέτρεψε την οστική απώλεια αλλά διέσωσε πλήρως τον οστεοπορωτικό φαινότυπο των Tg5519 ποντικών και ειδικότερα επήλθε πλήρης αναστροφή της δομής του σπογγώδους και φλοιώδους οστού. Περαιτέρω επιβεβαίωση της θεραπευτικής δράσης του denosumab στο Tg5519 μοντέλο επιτεύχθηκε μετρώντας τον δείκτη οστικής απορρόφησης TRACP-5b στον ορό, ο οποίος επανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα. Συμπερασματικά, οι δύο διαγονιδιακές TghuRANKL σειρές που υπερεκφράζουν τον ανθρώπινο RANKL αποτελούν μοναδικά μοντέλα οστεοπόρωσης για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν παθογένειες με αυξημένη οστική απώλεια καθώς και για την αξιολόγηση νέων αναστολέων του RANKL, όπως των SPD-304 αναλόγων, σε προκλινικό επίπεδο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7- ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aggarwal, B.B., 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology*, 3, pp.745–756.
- Albright, F., PH, S. & AM, R., 1941. Postmenopausal osteoporosis: Its clinical features. *Journal of the American Medical Association*, 116, pp.2465–2474.
- Anderson, D.M. et al., 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390(6656), pp.175–9.
- Aoki, K. et al., 2006. A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand-induced signaling, bone resorption, and bone loss. *The Journal of clinical investigation*, 116, pp.1525–1534.
- Armstrong, A.P. et al., 2008. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate*, 68, pp.92–104.
- Ashcroft, A.J. et al., 2003. Colonic Dendritic Cells, Intestinal Inflammation, and T Cell-Mediated Bone Destruction Are Modulated by Recombinant Osteoprotegerin. *Immunity*, 19, pp.849–861.
- Aubin, J.E., 1998. Advances in the osteoblast lineage. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 76, pp.899–910.
- Bachmann, M.F. et al., 1999. TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *The Journal of experimental medicine*, 189, pp.1025–1031.
- Bekker, P.J. et al., 2004. *A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women.*,
- Bekker, P.J. et al., 2001a. *The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women.*,
- Bekker, P.J. et al., 2001b. *The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women.*,
- Van Bezooijen, R.L. et al., 2007. Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 22, pp.19–28.
- Bischoff-Ferrari, H.A. et al., 2005. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 293, pp.2257–2264.

- Black, D.M. et al., 2000. *Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group.*,
- Black, D.M. et al., 2012. The effect of 3 versus 6 years of Zoledronic acid treatment of osteoporosis: A randomized extension to the HORIZON-Pivotal Fracture Trial (PFT). *Journal of Bone and Mineral Research*, 27, pp.243–254.
- Blair, H.C. et al., 1989. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science (New York, N.Y.)*, 245, pp.855–857.
- Bodmer, J.L., Schneider, P. & Tschopp, J., 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, pp.19–26.
- Body, J.-J. et al., 2003. *A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases.*,
- Boivin, G. et al., 1996. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 11, pp.1302–1311.
- Bonewald, L.F., 2011. The amazing osteocyte. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26(2), pp.229–38.
- Bonjour, J.P. et al., 1994. Peak bone mass. In *Osteoporosis International*.
- Bonnelye, E. et al., 2008. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*, 42, pp.129–138.
- Bouxsein, M.L. et al., 2005. Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20, pp.1085–1092.
- Boyce, B.F. & Xing, L., 2007. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy*, 9 Suppl 1, p.S1.
- Boyce, B.F. & Xing, L., 2008. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), pp.139–46.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S. & Lacey, D.L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), pp.337–42.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Bucay, N. et al., 1998. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *GENES & DEVELOPMENT*, (12), pp.1260–1268.

- Burr, D.B., 2002. Targeted and nontargeted remodeling. *Bone*, 30(1), pp.2–4.
- Chambers, T.J. & Magnus, C.J., 1982. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *The Journal of pathology*, 136, pp.27–39.
- Chen, G. et al., 2006. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer*, 107, pp.289–298.
- Chen, G., Deng, C. & Li, Y.-P., 2012. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences*, 8(2), pp.272–88.
- Chesneau, V. et al., 2003. Catalytic properties of ADAM19. *The Journal of biological chemistry*, 278, pp.22331–22340.
- Clarke, B., 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3 Suppl 3, pp.S131–9.
- Cooper, D.M.L. et al., 2007. Age-dependent change in the 3D structure of cortical porosity at the human femoral midshaft. *Bone*, 40, pp.957–965.
- Cowin, S.C., Moss-Salentijn, L. & Moss, M.L., 1991. Candidates for the mechanosensory system in bone. *Journal of biomechanical engineering*, 113, pp.191–197.
- Cummings, S.R. et al., 2009. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England journal of medicine*, 361, pp.756–765.
- Davidson, M. and A., 2009. BAFF: a local and systemic target in autoimmune diseases, Clinical and Experimental Immunology. *Clinical and Experimental Immunology*, 158(2), pp.155–163.
- Davidson, Z.L. and A., 2011. BAFF inhibition: a new class of drugs for the treatment of autoimmunity. *Experimental Cell Research*, 317(9), pp.1270–1277.
- Delmas, P.D., 2002. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, 359, pp.2018–2026.
- Dennis, J.E. et al., 1999. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14, pp.700–709.
- Douni, E. et al., 2012. A RANKL G278R mutation causing osteopetrosis identifies a functional amino acid essential for trimer assembly in RANKL and TNF. *Human molecular genetics*, 21(4), pp.784–98.
- Douni, E. et al., 2007. Functional genetic and genomic analysis of modeled arthritis. *Advances in experimental medicine and biology*, 602, pp.33–42.
- Downs, R.W. et al., 2000. *Comparison of alendronate and intranasal calcitonin for treatment of osteoporosis in postmenopausal women.*,

- Dudley, H.R. & Spiro, D., 1961. THE FINE STRUCTURE OF BONE CELLS. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 11, pp.627–649.
- Emery, J.G. et al., 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of biological chemistry*, 273, pp.14363–14367.
- Enomoto, T. et al., 2011. Establishment of a new murine model of hypercalcemia with anorexia by overexpression of soluble receptor activator of NF- κ B ligand using an adenovirus vector. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 29, pp.414–421.
- Eriksen EF, Axelrod DW, M.F., 1994. Bone Histomorphometry. *New York, Raven Press*, pp.1–12.
- Fata, J.E. et al., 2000. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*, 103, pp.41–50.
- Feeley, B.T. et al., 2006. Mixed metastatic lung cancer lesions in bone are inhibited by noggin overexpression and Rank:Fc administration. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 21, pp.1571–1580.
- Ferrari, M., Fornasiero, M.C. & Isetta, A.M., 1990. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of Immunological Methods*, 131, pp.165–172.
- Finkelstein, J.S. et al., 2009. *Effects of teriparatide retreatment in osteoporotic men and women.*
- Firestein, G.S., 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423, pp.356–361.
- Fisher, J.E. et al., 1999. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, pp.133–138.
- Fitzpatrick, L.A. & Bilezikian, J.P., 2006. Parathyroid Hormone: Structure, Function and Dynamic Actions. In *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. pp. 273–291.
- Foo, C. et al., 2007. Downregulation of beta-catenin and transdifferentiation of human osteoblasts to adipocytes under estrogen deficiency. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 23, pp.535–540.
- Francis, M.D. & Valent, D.J., 2007. Historical perspectives on the clinical development of bisphosphonates in the treatment of bone diseases. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 7, pp.2–8.
- Frith, J.C. et al., 2001. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis and rheumatism*, 44(9), pp.2201–10.

- Fromigu, O. et al., 2009. Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13, pp.2189–2199.
- Gaudio, A. et al., 2010. Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95, pp.2248–2253.
- Gravallese, E.M., 2002. Bone destruction in arthritis. *Ann Rheum Dis*, 61, pp.84–86.
- Gruss, H.J. & Dower, S.K., 1995. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*, 85, pp.3378–3404.
- Guerrini, M.M. et al., 2008. Human Osteoclast-Poor Osteopetrosis with Hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) Mutations. *American Journal of Human Genetics*, 83, pp.64–76.
- Gullberg, B., Johnell, O. & Kanis, J.A., 1997. World-wide projections for hip fracture. *Osteoporosis International*, 7, pp.407–413.
- Hanada, R. et al., 2009. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature*, 462(7272), pp.505–9.
- Hardouin, P., Pansini, V. & Cortet, B., 2014. Bone marrow fat. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*.
- He, M.M. et al., 2005. Small-molecule inhibition of TNF- α . *Science (New York, N.Y.)*, 310(5750), pp.1022–5.
- Helas, S. et al., 2009. Inhibition of receptor activator of NF- κ B ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. *The American journal of pathology*, 175, pp.473–478.
- Hikosaka, Y. et al., 2008. The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator. *Immunity*, 29, pp.438–450.
- Hill, P.A., 1998. Bone remodelling. *British Journal of Orthodontics*, 25, pp.101–107.
- Horwood, N.J. et al., 1998. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology*, 139, pp.4743–4746.
- Huang, H. & He, X., 2008. Wnt/ β -catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Current Opinion in Cell Biology*, 20, pp.119–125.
- Hughes, A.E. et al., 2000. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nature genetics*, 24(1), pp.45–8.

- Hurtel-Lemaire, A.S. et al., 2009. The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*, 284, pp.575–584.
- Lo Iacono, N. et al., 2012. Osteopetrosis rescue upon RANKL administration to Rankl^{-/-} mice: A new therapy for human RANKL-dependent ARO. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27, pp.2501–2510.
- Lo Iacono, N. et al., 2013. RANKL cytokine: from pioneer of the osteoimmunology era to cure for a rare disease. *Clinical & developmental immunology*.
- Ikeda, T. et al., 2001. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*, 142, pp.1419–1426.
- Ikeda, T. et al., 2003. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 278(47), pp.47217–22.
- Inaoka, T. et al., 1995. Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochemical and biophysical research communications*, 206, pp.89–96.
- Ito, S. et al., 2002. Crystal structure of the extracellular domain of mouse RANK ligand at 2.2-Å resolution. *The Journal of biological chemistry*, 277, pp.6631–6636.
- Itzstein, C., Coxon, F.P. & Rogers, M.J., 2011. The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. *Small GTPases*, 2(3), pp.117–130.
- Johnell, O. et al., 2004. Mortality after osteoporotic fractures. *Osteoporosis International*, 15, pp.38–42.
- Jones, D.H. et al., 2006. Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*, 440, pp.692–696.
- Kaden, J.J. et al., 2004. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 36, pp.57–66.
- Kalu, D.N. et al., 1993. Ovariectomy-induced bone loss and the hematopoietic system. *Bone and mineral*, 23, pp.145–161.
- Kalu, D.N. et al., 1989. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*, 124, pp.7–16.
- Karsenty, G. & Wagner, E.F., 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell*, 2, pp.389–406.
- Kartsogiannis, V. et al., 1999. Localization of RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone*, 25, pp.525–534.

- Kearns, A.E., Khosla, S. & Kostenuik, P.J., 2008. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine reviews*, 29(2), pp.155–92.
- Van Keuren, M.L. et al., 2009. Generating transgenic mice from bacterial artificial chromosomes: Transgenesis efficiency, integration and expression outcomes. *Transgenic Research*, 18, pp.769–785.
- Khosla, S., 2001. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 142(12), pp.5050–5.
- Kim, D. et al., 2000. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *The Journal of experimental medicine*, 192, pp.1467–1478.
- Kim, N. et al., 2000a. Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, pp.10905–10910.
- Kim, N. et al., 2000b. Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, pp.10905–10910.
- Kim, N. et al., 2005. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *The Journal of experimental medicine*, 202(5), pp.589–95.
- Kim, N.-S. et al., 2006. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Molecular and cellular biology*, 26, pp.1002–1013.
- Kirk, J.K. & Hepfinger, C., 2005. Calcitonin. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 3, pp.39–49.
- Knoop, K.A. et al., 2011. Distinct developmental requirements for isolated lymphoid follicle formation in the small and large intestine: RANKL is essential only in the small intestine. *American Journal of Pathology*, 179, pp.1861–1871.
- Koga, T. et al., 2005. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nature medicine*, 11, pp.880–885.
- Kong, Y.Y. et al., 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397(6717), pp.315–23.
- Kostenuik, P.J. et al., 2011. Decreased bone remodeling and porosity are associated with improved bone strength in ovariectomized cynomolgus monkeys treated with denosumab, a fully human RANKL antibody. *Bone*, 49, pp.151–161.
- Kostenuik, P.J. et al., 2009. Denosumab, a Fully Human Monoclonal Antibody to RANKL, Inhibits Bone Resorption and Increases BMD in Knock-In Mice That Express Chimeric

(Murine/Human) RANKL*. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH*, 24(2), pp.182–195.

Kostenuik, P.J., 2005. Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Current Opinion in Pharmacology*, 5, pp.618–625.

Kubota, T., Michigami, T. & Ozono, K., 2009. Wnt signaling in bone metabolism. *Journal of bone and mineral metabolism*, 27(3), pp.265–71.

Lacey, D.L. et al., 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93(2), pp.165–76.

Lagasse, E. & Weissman, I.L., 1997a. Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell*, 89(7), pp.1021–31.

Lagasse, E. & Weissman, I.L., 1997b. Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell*, 89, pp.1021–1031.

Lam, J. et al., 2001. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(7), pp.971–979.

Li, J. et al., 2000. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), pp.1566–71.

Li, X. et al., 2011. Quantification of vertebral bone marrow fat content using 3 Tesla MR spectroscopy: Reproducibility, vertebral variation, and applications in osteoporosis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 33, pp.974–979.

Li, X. et al., 2005. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry*, 280, pp.19883–19887.

Liberman, U.A. et al., 1995. *Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group.*

Lindsay, R. et al., 2006. A novel tetracycline labeling schedule for longitudinal evaluation of the short-term effects of anabolic therapy with a single iliac crest bone biopsy: early actions of teriparatide. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 21(3), pp.366–73.

Lippuner, K., 2012. The future of osteoporosis treatment - a research update. *Swiss medical weekly*, 142(July), p.w13624.

Liu, C. et al., 2010. Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184, pp.6910–6919.

Lloyd, S.A.J. et al., 2008. Soluble RANKL induces high bone turnover and decreases bone volume, density, and strength in mice. *Calcified Tissue International*, 82, pp.361–372.

- Lorenzo, J., Horowitz, M. & Choi, Y., 2008. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocrine reviews*, 29(4), pp.403–40.
- Loser, K. et al., 2006. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nature medicine*, 12, pp.1372–1379.
- Luckman, S.P. et al., 1998. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 13, pp.581–589.
- Lynch, M.P. et al., 1998. Apoptosis during bone-like tissue development in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 68, pp.31–49.
- Malone, J.D. et al., 1982. Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *The Journal of cell biology*, 92, pp.227–230.
- Marsters, S.A. et al., 1992. Identification of cysteine-rich domains of the type 1 tumor necrosis factor receptor involved in ligand binding. *The Journal of biological chemistry*, 267, pp.5747–5750.
- Martin, T.J., 2005. Osteoblast-derived PTHrP is a physiological regulator of bone formation. *The Journal of clinical investigation*, 115, pp.2322–2324.
- Masarachia, P.J. et al., 1996. Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone*, 19, pp.281–290.
- McClung, M.R. et al., 2006. *Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density.*
- Meunier, P.J. et al., 2002. *Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis--a 2-year randomized placebo controlled trial.*
- Meunier, P.J. et al., 2004. *The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis.*
- Min, H. et al., 2000. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *The Journal of experimental medicine*, 192, pp.463–474.
- Nakamura, H. et al., 2002. Localization of osteoprotegerin (OPG) on bone surfaces and cement lines in rat tibia. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 50, pp.945–953.
- Nakashima, K. et al., 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108, pp.17–29.
- Nakashima, T. et al., 2011. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature medicine*, 17(10), pp.1231–4.

- Nakashima, T. & Takayanagi, H., 2011. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1240, pp.E13–8.
- Nakashima, T. & Takayanagi, H., 2008. The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), pp.166–71.
- Nashi E, Wang Y, and D.B., 2010. The Role Of B Cells in Lupus Pathogenesis. *The International journal of biochemistry and cell biology*, 42(4), pp.543–550.
- Novack, D. V & Teitelbaum, S.L., 2008. The Osteoclast: Friend or Foe? *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 3, pp.457–484.
- O'Brien, C. a, Nakashima, T. & Takayanagi, H., 2013. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone*, 54(2), pp.258–63.
- O'Brien, C.A., 2011. Control of RANKL Gene Expression. *Bone*, 46(4), pp.911–919.
- Okamoto, K. & Takayanagi, H., 2011. Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis research & therapy*, 13(3), p.219.
- Ominsky, M.S. et al., 2011. Denosumab, a fully human RANKL antibody, reduced bone turnover markers and increased trabecular and cortical bone mass, density, and strength in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone*, 49, pp.162–173.
- Ominsky, M.S. et al., 2007. The RANKL inhibitor OPG-Fc increases cortical and trabecular bone mass in young gonad-intact cynomolgus monkeys. *Osteoporosis International*, 18, pp.1073–1082.
- Parfitt, A.M., 2002. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone*, 30(1), pp.5–7.
- Parfitt, A.M. et al., 1982. Vitamin D and bone health in the elderly. *The American journal of clinical nutrition*, 36, pp.1014–1031.
- Partis, M.D. et al., 1983. Cross-linking of protein by γ -maleimido alkanoylN-hydroxysuccinimido esters. *Journal of Protein Chemistry*, 2(3), pp.263–277.
- Perrone M, 2010. FDA clears Amgen's bone-strengthening drug Prolia. *BioScience Technology*.
- Pittenger, M.F. et al., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, pp.143–147.
- Polyxeni Alexiou, Athanasios Papakyriakou, Evangelos Ntougkos, Christos P. Papaneophytou, Fotini Liepouri, Anthi Mettou, Ioannis Katsoulis, Anna Maranti, Katerina Tsiliouka, Alexandros Strongilos, Sotiria Chaitidou, Eleni Douni, George Kontopidis, George , E.C. and E.E. & A, 2014. Rationally designed less toxic SPD-304 analogs and their preliminary evaluation of their TNF inhibitory effect. *Archiv der Pharmazie*, In press.

- Poulsen, T.S., 2004. Purification of BAC DNA. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 255, pp.91–100.
- Raggatt, L.J. & Partridge, N.C., 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of biological chemistry*, 285, pp.25103–25108.
- Räkel, A., Boucher, A. & Ste-Marie, L.-G., 2011. Role of zoledronic acid in the prevention and treatment of osteoporosis. *Clinical interventions in aging*, 6, pp.89–99.
- Reeve, J. et al., 1980. *Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involuntional osteoporosis: a multicentre trial.*,
- Reginster, J. et al., 2000. *Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group.*,
- Reginster, J.Y. et al., 2005. *Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study.*,
- Riggs, B.L. et al., 1982. Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. *The Journal of clinical investigation*, 70(4), pp.716–23.
- Rinotas, V. et al., 2014. Novel Genetic Models of Osteoporosis by Overexpression of Human RANKL in Transgenic Mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 29(5), pp.1158–69.
- Rizzoli, R. & Reginster, J.-Y., 2011. Adverse drug reactions to osteoporosis treatments. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 4, pp.593–604.
- Roodman, G.D., 2010. Insights into the pathogenesis of Paget's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192, pp.176–80.
- Rosen, C.J., 2005. Postmenopausal Osteoporosis. *Bone*, 8, pp.595–603. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096166>.
- Rosen, C.J. & Klibanski, A., 2009. Bone, fat, and body composition: evolving concepts in the pathogenesis of osteoporosis. *The American journal of medicine*, 122, pp.409–414.
- Russell, R.G. et al., 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*, 6(3), pp.183–96.
- Saag, K.G. et al., 2007. Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *The New England journal of medicine*, 357, pp.2028–2039.

- Sato, K. et al., 2006. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *The Journal of experimental medicine*, 203, pp.2673–2682.
- Scheller, E.L. et al., 2014. Use of osmium tetroxide staining with microcomputerized tomography to visualize and quantify bone marrow adipose tissue in vivo. *Methods in enzymology*, 537, pp.123–39.
- Schett, G., 2007. Joint remodelling in inflammatory disease. *Annals of the rheumatic diseases*, 66 Suppl 3, pp.iii42–4.
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, 3, pp.1101–1108.
- Schneeweis, L.A., Willard, D. & Milla, M.E., 2005. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand. *The Journal of biological chemistry*, 280, pp.41155–41164.
- Schoen, P. et al., 2013. Anti-RANKL nanobody ALX-0141 shows sustained biomarker inhibition in a Phase I study in healthy postmenopausal Women. *Bone Abstracts*, p.9052. Available at: <http://www.bone-abstracts.org/ba/0001/ba0001PP135.htm>.
- Seyama, K. et al., 1998. Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Blood*, 92, pp.2421–2434.
- Sharma, S. et al., 2014. Obesity: Friend or foe for osteoporosis. *Journal of mid-life health*, 5(1), pp.6–9.
- Silva-Fernández, L. et al., 2013. Denosumab for the treatment of osteoporosis: a systematic literature review. *Reumatología clínica*, 9(1), pp.42–52.
- Silverman, S.L., 1992. The clinical consequences of vertebral compression fracture. *Bone*, 13.
- Simonet, W.S. et al., 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89(2), pp.309–19.
- Skiles, G.L. & Yost, G.S., 1996. Mechanistic studies on the cytochrome P450-catalyzed dehydrogenation of 3-methylindole. *Chemical research in toxicology*, 9(1), pp.291–7.
- Sobacchi, C. et al., 2007. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nature genetics*, 39(8), pp.960–2.
- Stark, Z. & Savarirayan, R., 2009. Osteopetrosis. *Orphanet journal of rare diseases*, 4(5), pp.1–12..
- Steele DG, B.A., 1988. *The Anatomy and Biology of the Human Skeleton*, Texas A&M University Press.

- Suda, T. et al., 1997. Regulation of osteoclast function. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 12(6), pp.869–79.
- Sun, H. et al., 2007. Dehydrogenation of indoline by cytochrome P450 enzymes: a novel “aromatase” process. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 322, pp.843–851.
- Sun, H. & Yost, G.S., 2008. Metabolic activation of a novel 3-substituted indole-containing TNF- α inhibitor: Dehydrogenation and inactivation of CYP3A4. *Chemical Research in Toxicology*, 21, pp.374–385.
- Ta, H.M. et al., 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*, 107, pp.20281–20286.
- Takahashi, N. et al., 2008. *Principles of Bone Biology*, Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012373884400029X>.
- Takahashi, N., Udagawa, N. & Suda, T., 1999. A New Member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family , ODF / OPGL / TRANCE / RANKL , Regulates Osteoclast Differentiation and Function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256, pp.449–455.
- Takayanagi, H. et al., 2002. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental cell*, 3(6), pp.889–901.
- Takayanagi, H., 2009. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nature reviews. Rheumatology*, 5(12), pp.667–76.
- Takayanagi, H., 2007. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature reviews. Immunology*, 7(4), pp.292–304.
- Tanaka-Kamioka, K. et al., 1998. Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 13, pp.1555–1568.
- Thiébaud, D. et al., 1996. Cyclosporine induces high bone turnover and may contribute to bone loss after heart transplantation. *European journal of clinical investigation*, 26, pp.549–555.
- Tilman B. Drüeke, I.S., 2001. The spectrum of renal osteodystrophy. *Oxford University Press*.
- Tomimori, Y. et al., 2009. Evaluation of pharmaceuticals with a novel 50-hour animal model of bone loss. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 24, pp.1194–1205.

- Trouvin, A.-P. & Goëb, V., 2010. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clinical interventions in aging*, 5, pp.345–54.
- Tseng, W. et al., 2010. PKA-induced receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) expression in vascular cells mediates osteoclastogenesis but not matrix calcification. *The Journal of biological chemistry*, 285, pp.29925–29931.
- Turner, C.H., 2002. Biomechanics of bone: Determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporosis International*, 13, pp.97–104.
- Ubara, Y. et al., 2003. Histomorphometric features of bone in patients with primary and secondary hypoparathyroidism. *Kidney International*, 63, pp.1809–1816.
- Ubara, Y. et al., 2005. Significance of minimodeling in dialysis patients with adynamic bone disease. *Kidney International*, 68, pp.833–839.
- Väänänen, H.K. et al., 2000. The cell biology of osteoclast function. *Journal of cell science*, 113 (Pt 3, pp.377–381.
- Wada, T. et al., 2005. The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis. *Nature medicine*, 11, pp.394–399.
- Walsh, M.C. et al., 2006. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annual review of immunology*, 24, pp.33–63.
- Watts, N.B. et al., 1990. *Intermittent cyclical etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis.*,
- Westendorf, J.J., Kahler, R.A. & Schroeder, T.M., 2004. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene*, 341, pp.19–39.
- Whitaker, M. et al., 2012. Bisphosphonates for osteoporosis--where do we go from here? *The New England journal of medicine*, 366, pp.2048–51.
- Whyte, M.P., 2006. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANK/NF-kappaB signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068, pp.143–64.
- Whyte, M.P. & Mumm, S., 2004. Heritable disorders of the RANKL/OPG/RANK signaling pathway. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 4, pp.254–267.
- Wijanayaka, A.R. et al., 2011. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS ONE*, 6.
- Wiley, S.R. et al., 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3, pp.673–682.

Wong, B.R. et al., 1997. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *The Journal of biological chemistry*, 272, pp.25190–25194.

Yamamoto, T. et al., 2013. Assessing the effect of baseline status of serum bone turnover markers and vitamin D levels on efficacy of teriparatide 20 µg/day administered subcutaneously in Japanese patients with osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 31, pp.199–205.

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

Yao, Z., Xing, L. & Boyce, B.F., 2009. NF-kappaB p100 limits TNF-induced bone resorption in mice by a TRAF3-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation*, 119, pp.3024–3034.

Yasuda, H. et al., 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), pp.3597–602.

Yasuda, H., 2013. RANKL, a necessary chance for clinical application to osteoporosis and cancer-related bone diseases. *World journal of orthopedics*, 4(4), pp.207–217.

Yuan, Y.Y. et al., 2008. Skeletal deterioration induced by RANKL infusion: A model for high-turnover bone disease. *Osteoporosis International*, 19, pp.625–635.

Yun, T.J. et al., 1998. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161, pp.6113–6121.

Yun, T.J. et al., 2001. Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166, pp.1482–1491.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

A RANKL G278R mutation causing osteopetrosis identifies a functional amino acid essential for trimer assembly in RANKL and TNF

Eleni Douni^{1,2,*}, Vagelis Rinotas¹, Eleni Makrinou¹, Jochen Zwerina³, Josef M. Penninger⁴, Elias Eliopoulos², Georg Schett³ and George Kollias¹

¹Institute of Immunology, Biomedical Sciences Research Center 'Alexander Fleming', Vari 16672, Greece,

²Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, Athens 11855, Greece, ³Department of Internal Medicine 3, Rheumatology and Immunology, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen D-91054, Germany and ⁴Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, Vienna A-1030, Austria

Received September 6, 2011; Revised and Accepted October 29, 2011

Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), a trimeric tumor necrosis factor (TNF) superfamily member, is the central mediator of osteoclast formation and bone resorption. Functional mutations in RANKL lead to human autosomal recessive osteopetrosis (ARO), whereas RANKL overexpression has been implicated in the pathogenesis of bone degenerative diseases such as osteoporosis. Following a forward genetics approach using *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)-mediated random mutagenesis, we generated a novel mouse model of ARO caused by a new loss-of-function allele of *Rankl* with a glycine-to-arginine mutation at codon 278 (G278R) at the extracellular inner hydrophobic F β -strand of RANKL. Mutant mice develop severe osteopetrosis similar to *Rankl*-deficient mice, whereas exogenous administration of recombinant RANKL restores osteoclast formation *in vivo*. We show that RANKL^{G278R} monomers fail to assemble into homotrimers, are unable to bind and activate the RANK receptor and interact with wild-type RANKL exerting a dominant-negative effect on its trimerization and function *in vitro*. Since G278 is highly conserved within the TNF superfamily, we identified that a similar substitution in TNF, G122R, also abrogated trimerization, binding to TNF receptor and consequently impaired TNF biological activity. Notably, SPD304, a potent small-molecule inhibitor of TNF trimerization that interacts with G122, also inhibited RANKL activity, suggesting analogous inhibitory mechanisms. Our results provide a new disease model for ARO and identify a functional amino acid in the TNF-like core domain essential for trimer formation both in RANKL and in TNF that could be considered a novel potential target for inhibiting their biological activities.

INTRODUCTION

Bone remodeling is a constant process that functions through the synthesis of bone matrix by osteoblasts and the coordinate bone resorption by osteoclasts (1,2). Normally, osteoblastic and osteoclastic activities are balanced so that skeletal integrity is preserved. Perturbations in bone remodeling can result in skeletal abnormalities such as osteopetrosis and osteoporosis which are characterized by excessive or decreased bone

mass, due to impaired or enhanced osteoclast activity. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) is the primary mediator of osteoclast-induced bone resorption (3) and belongs to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily (4,5) that is characterized by homotrimerization. It is a type II transmembrane protein that consists of a short N-terminal cytoplasmic domain and a conserved extracellular TNF-like core domain forming an antiparallel β -sheet that is predicted to assemble into a trimer required for receptor activation

*To whom correspondence should be addressed at: Biomedical Sciences Research Center 'Alexander Fleming', 34 Fleming str., 16672 Vari, Greece. Tel: +30 2109656310; Fax: +30 2109656563; Email: douni@fleming.gr

(6,7). Soluble RANKL is generated either by proteolytic processing of the transmembrane form or by alternative splicing (8,9). RANKL is expressed on activated T lymphocytes (4,5) as well as on stromal cells (10,11) and binds as a trimer to its receptor RANK that is expressed on the surface of osteoclast precursors and mature osteoclasts. RANKL and RANK form a heterohexameric complex with a receptor molecule bound along each of the three clefts formed by neighboring monomers of the RANKL homotrimer. This interaction is necessary for osteoclast differentiation, activity and survival (10,12), which subsequently lead to bone resorption. Osteoprotegerin (OPG), a decoy receptor of RANKL, inhibits the binding of RANKL to RANK and thereby limits osteoclastogenesis (11). Genetic ablations of either RANKL (13,14) or RANK (15,16) result in severe osteopetrosis due to complete lack of osteoclast formation, demonstrating that RANKL and RANK are indispensable for osteoclastogenesis, whereas absence of OPG causes increased osteoclastogenesis and osteopenia (17). Although RANKL is best known for its role in bone resorption, it also plays multiple roles in the immune system (4,5,13,18,19), in mammary gland development during pregnancy (20), thermoregulation (21), cancer metastasis (22) and hormone-derived breast development (23).

As a result of its effects on bone metabolism, RANKL is considered a major therapeutic target for the suppression of bone resorption in bone metabolic diseases such as osteoporosis, rheumatoid arthritis and cancer metastasis (24). Consequently, recombinant proteins that inhibit RANKL–RANK interactions, such as RANK-Fc, Fc-OPG and anti-RANKL antibodies, have been developed as agents against osteoporosis. Indeed, clinical trials with denosumab, a fully human monoclonal antibody against RANKL, showed an increased bone mass and reduced incidence of fractures in postmenopausal women with osteoporosis (25) and in prostate cancer patients receiving androgen-deprivation therapy (26). This antibody has been recently approved in the USA and EU for the treatment of patients with osteoporosis and in prostate cancer patients undergoing hormonal ablation therapy. However, inhibitors that target formation of functional RANKL trimers have not been reported yet.

Additionally, a variety of loss-of-function mutations localized within the extracellular domain of RANKL have been recently reported in children with autosomal recessive osteopetrosis (ARO) (OMIM 602642), an incurable rare genetic disease (27). However, the molecular mechanisms by which the identified mutations cause RANKL inactivation and osteopetrosis have not been fully resolved. Characterization of functional RANKL mutations existing either in humans or in animal models is a powerful approach for the elucidation of the molecular basis of ARO as well as for the potential design of novel RANKL inhibitors. The aim of this study was to characterize a novel loss-of-function point mutation in the *Rankl* gene that causes osteopetrosis in mice, in order to define the underlying molecular mechanism that results in ARO pathogenesis, investigate whether a similar loss-of-function mechanism exists in other TNF family members such as TNF and examine whether the identified amino acid could serve as a potential target for RANKL inhibition.

RESULTS

Generation of a novel ENU-induced mouse model of severe osteopetrosis

The toothless (*tl*) phenotype was identified as a recessive trait in which complete failure of tooth eruption was detected in *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)-mutagenized G3 mice in both sexes (Supplementary Material, Fig. S1A). Mutant mice displayed also growth retardation, and lymphoid aberrations characterized by thymic hypoplasia, enlarged spleens and absence of lymph nodes. Additionally, these mice displayed early lethality, where 60% of the *tl*/*tl* mice died by the seventh week of age (Supplementary Material, Fig. S1B). Since failure of tooth eruption is a typical finding in osteopetrosis, we performed extensive histological analysis of the tibiae and femurs in 4–6-week-old *tl*/*tl* mice and wild-type (WT) control littermates. Staining of long bones with von Kossa (Fig. 1A), as well as with hematoxylin/eosin (Fig. 1B), revealed severe osteopetrosis in mutant mice, whereas staining with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), an enzyme that is highly expressed in osteoclasts, showed that *tl*/*tl* mice completely lacked TRAP-positive (TRAP+) multinucleated osteoclasts (Fig. 1B).

Failure of osteoclast formation can result either from an intrinsic defect in osteoclast differentiation or from an impaired crosstalk between osteoclasts and osteoblasts/stromal cells (28,29). To discriminate these possibilities, we performed *ex vivo* osteoclastogenesis assays using hematopoietic progenitor cells isolated from bone marrow (BM) or spleens that can differentiate into TRAP+ mature multinucleated osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and RANKL (13). Cultures of BM cells and splenocytes from either WT or *tl*/*tl* mice differentiated into TRAP+ multinucleated osteoclasts (Fig. 1C and Supplementary Material, Fig. S2A), indicating that the intrinsic osteoclast differentiation process is not defective in the *tl*/*tl* mice. To determine whether osteoblasts isolated from the *tl*/*tl* mice can support osteoclastogenesis, we established *ex vivo* co-culture assays between primary osteoblast cultures and hematopoietic progenitors from BM or spleens in the presence of 1,25(OH)₂ vitamin D3 and prostaglandin E2 (PGE2) (30). Osteoblasts from WT mice supported osteoclast formation in progenitors isolated either from WT or from *tl*/*tl* mice, whereas osteoblasts derived from *tl*/*tl* mice were inadequate to crosstalk with hematopoietic progenitors and direct their differentiation towards osteoclasts (Fig. 1D and Supplementary Material, Fig. S2B). These results demonstrate a defective crosstalk between osteoclast precursors and osteoblasts that could be possibly caused by a critical factor missing from the osteoblasts of *tl*/*tl* mice.

tl is a missense mutation in the *Rankl* gene

The entire genome of 124 F2 animals (62 affected and 62 normal control siblings) was scanned with a collection of 71 polymorphic markers. Initial screening of 20 animals (10 affected and 10 normal siblings) established linkage to distal chromosome 14. Fine mapping of the locus based on 248 meioses confirmed linkage to 14qD3 at 44 cM, between

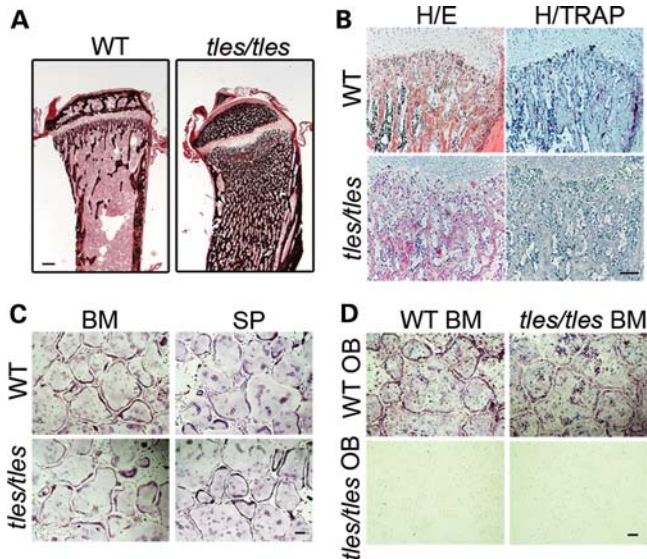


Figure 1. Severe osteopetrosis in *tles/tles* mice. (A) Representative von Kossa-stained proximal tibia sections are shown for 4-week-old WT and *tles/tles* mice ($n = 6$). (B) Representative serial sections of distal femurs stained with hematoxylin/eosin (H/E) and hematoxylin/TRAP (H/TRAP) ($n = 6$). (C) TRAP staining of osteoclast cultures derived from BM cells or splenocytes (SP) treated with M-CSF and RANKL. (D) TRAP staining of cocultures between BM cells and primary calvarial osteoblasts (OB) in the presence of $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D3 and PGE2. Representative data of three experiments performed in triplicate. Bars: (A) 200 μm ; (B, C and D) 100 μm .

single-nucleotide polymorphisms (SNPs) rs13482262 and rs30965774, with a logarithm of odds score of 33.8 and a P -value of 8.80912e^{-42} (Fig. 2A).

Screening of the region for candidate genes indicated the presence of the *Rankl* gene and sequencing of its coding region identified within exon 5 a single base transition of guanine to adenine (GenBank NM_011613.3), resulting in a glycine (G) to arginine (R) substitution at position 278 (G278R) (NP_035743) (Fig. 2B). G278 is located at the hydrophobic F β -strand of the monomer that is part of the inner A'AHCF β -sheet involved in intersubunit association and trimer assembly (6,7). Thus, the G278R substitution is likely to interrupt trimerization of the RANKL monomers due to steric clashes and positive charge introduction (Fig. 2C and D). G278 residue is highly conserved among various TNF superfamily members, including TNF, CD40L, TRAIL, BAFF and APRIL (Fig. 2E).

Genetic confirmation of the RANKL G278R mutation

To confirm that the RANKL G278R substitution causes the osteopetrotic phenotype developed in the *tles/tles* (*Rankl*^{*tles/tles*}) mice, we performed genetic complementation by generating *Rankl*^{*-tles*} compound heterozygous mice through intercrosses between heterozygous *Rankl*^{*+tles*} mice and heterozygous *Rankl* null mice (*Rankl*^{*+/-*}) (13). *Rankl*^{*-tles*} mice ($n = 6$) exhibited severe osteopetrosis characterized by failure of tooth eruption, high bone mass and absence of osteoclasts comparable with the phenotype developed in *Rankl*^{*tles/tles*} and *Rankl*^{*-/-*} mice (Fig. 3A). These results verify that the

G-to-A transition is a loss-of-function mutation that results in severe osteopetrosis in the *Rankl*^{*tles/tles*} mice.

Three-dimensional microstructural analyses using high-resolution microcomputed tomography confirmed severe osteopetrosis in *Rankl*^{*tles/tles*} mice (Fig. 3B), which was further validated using bone histomorphometric analysis (Fig. 3C). *Rankl*^{*tles/tles*} mice develop severe osteopetrosis similar to *Rankl*^{*-/-*} mice, also indicating that the mutant protein is inactive. Interestingly, *Rankl*^{*+tles*} mice are not osteopetrotic and exhibit bone parameters similar to those of WT control mice and *Rankl*^{*+/-*} mice (Fig. 3C).

To verify whether administration of recombinant RANKL restores osteoclast formation *in vivo*, *Rankl*^{*tles/tles*} mice were treated from day 13 of age for a period of 14 days with daily subcutaneous injections of recombinant murine RANKL at 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A massive formation of TRAP+ cells was identified both in trabecular and in cortical bones of RANKL-treated *Rankl*^{*tles/tles*} mice, indicating that exogenous RANKL efficiently restores osteoclast formation *in vivo* (Fig. 3D). These results confirm that administration of recombinant RANKL might be considered for the therapy of human RANKL-mediated ARO (27).

G278R impairs RANKL trimerization and binding to RANK

G278R substitution allows normal RANKL gene expression and protein production (Supplementary Material, Fig. S3). Since G278 resides at the subunit interfaces in the trimer, it may alter trimer formation. To determine whether G278R affects trimer assembly, recombinant soluble WT RANKL and RANKL^{G278R} fused at the N-terminus with glutathione *S*-transferase (GST) were produced and characterized biochemically. Previous studies have shown that the GST moiety does not impact on RANKL function (31,32), whereas it enhances the formation of multimers due to the natural tendency of GST to dimerize. RANKL multimers were detected in WT GST-RANKL, but not in GST-RANKL^{G278R}, using both monoclonal and polyclonal antibodies against murine RANKL or polyclonal antibodies against GST in native polyacrylamide gels (Fig. 4A). Instead, a lower molecular weight band was detected exclusively in GST-RANKL^{G278R} using polyclonal antibodies against RANKL or GST, which corresponds most probable to GST-RANKL^{G278R} monomers. In addition, both antibodies immunoreacted with high molecular weight GST-RANKL^{G278R} complexes, indicating protein aggregation. The failure of GST-RANKL^{G278R} detection by the monoclonal antibody in native conditions could be explained by the modification of the RANKL^{G278R} structure so that the specific epitopes were either destroyed or masked. However, both GST-RANKL and GST-RANKL^{G278R} were identified by both monoclonal and polyclonal antibodies against RANKL in SDS-reduced conditions (Fig. 4A).

The inability of the soluble RANKL^{G278R} protein to form trimers was then verified using chemical crosslinking (Fig. 4B). GST was removed from the RANKL protein, with proteolytic cleavage of GST-RANKL bound on glutathione beads. Even though, soluble WT RANKL was released efficiently from the beads, the majority of the soluble

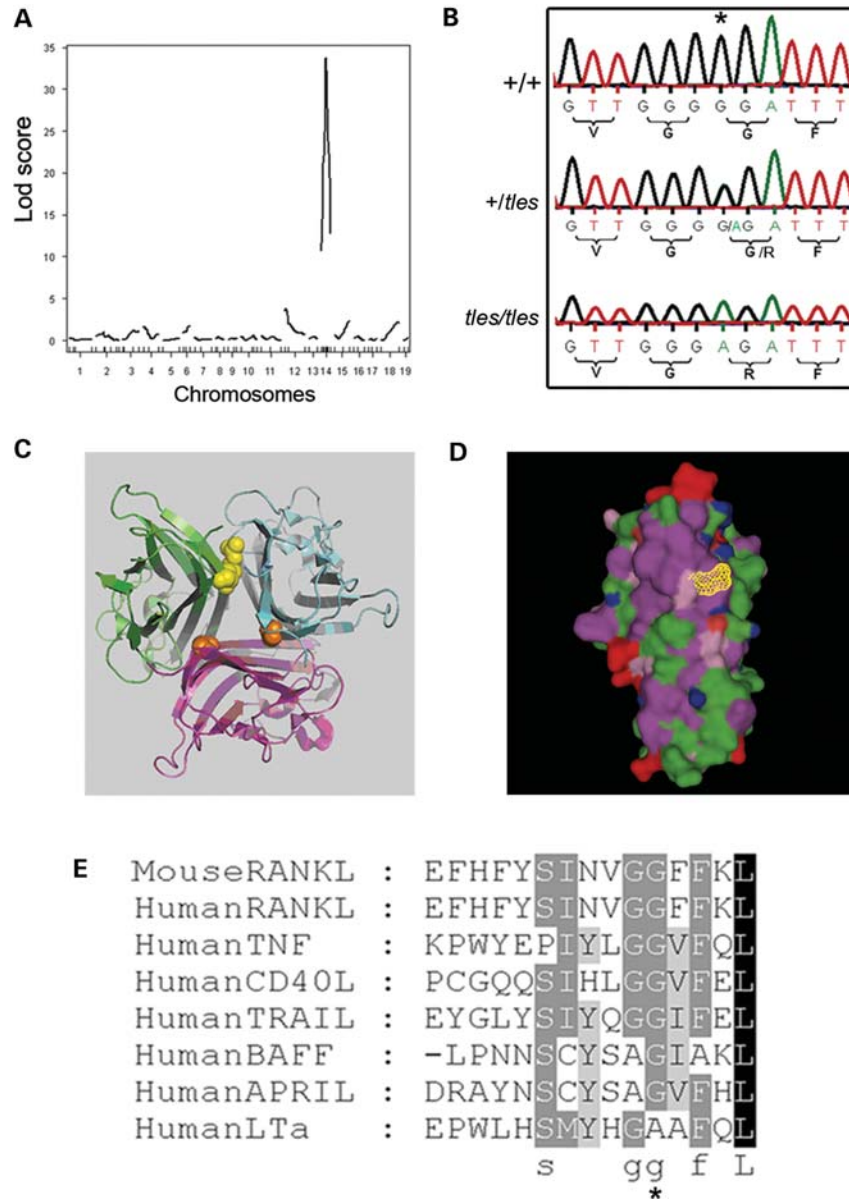


Figure 2. Mapping, identification and representation of the *tles* mutation. **(A)** Based on genome-wide genetic analysis, the causal mutation was mapped to chromosome 14. **(B)** DNA sequencing of the *Rankl* gene in WT (+/+) control, +/-*tles* heterozygous and *tles/tles* homozygous mice revealed that the mutation corresponds to a G-to-A transition (asterisk) causing a glycine-to-arginine substitution at residue 278. **(C)** Ribbon diagram of the RANKL trimer viewed down the 3-fold symmetry axis represents a trimer consisting of two WT monomers containing G278 (orange) and one monomer containing the G278R mutated residue (yellow). **(D)** Space-filling diagram of the RANKL monomer viewed towards the trimer interface, with the mutation G278R (yellow chickenwire) in place. Hydrophobic amino acids are colored purple, polar in green and charged (+/-) in blue/red, respectively. **(E)** The sequence of the extracellular F β -strand of the murine RANKL is aligned to those of human TNF family cytokines RANKL, TNF, CD40L, TRAIL, BAFF, APRIL and LT α . The degree of homology correlates with gray scaling, 0–50% conservation (no color), 50–70% (gray), 70–90% (dark gray), >90% (black). The asterisk indicates G278.

RANKL^{G278R} protein remained bound on the beads after digestion (data not shown). This phenomenon indicates increased hydrophobicity of the RANKL^{G278R} protein due to the formation of hydrophobic protein–protein interactions. Chemical crosslinking of soluble WT RANKL showed a trimer form in addition to a dimer and a monomer form, whereas without crosslinker only monomers were detected (Fig. 4B) (33). In contrast, crosslinking of the released soluble RANKL^{G278R} protein revealed only the monomer form and a high molecular weight ‘aggregate’ form.

To verify that RANKL^{G278R} cannot form trimers in eukaryotic cells, HEK 293FT cells were transiently transfected with expression vectors of the full-length WT or RANKL^{G278R} fused to FLAG or Myc tag at the C-terminus (Fig. 4C). Similar to the analysis of recombinant RANKL proteins, trimer formation was detected only in WT RANKL-Myc but not in RANKL^{G278R}-Myc. Co-transfection of WT RANKL-FLAG with either WT RANKL-Myc or RANKL^{G278R}-Myc revealed the presence of trimer formation only in cells co-expressing both WT forms (Fig. 4C). These results indicate

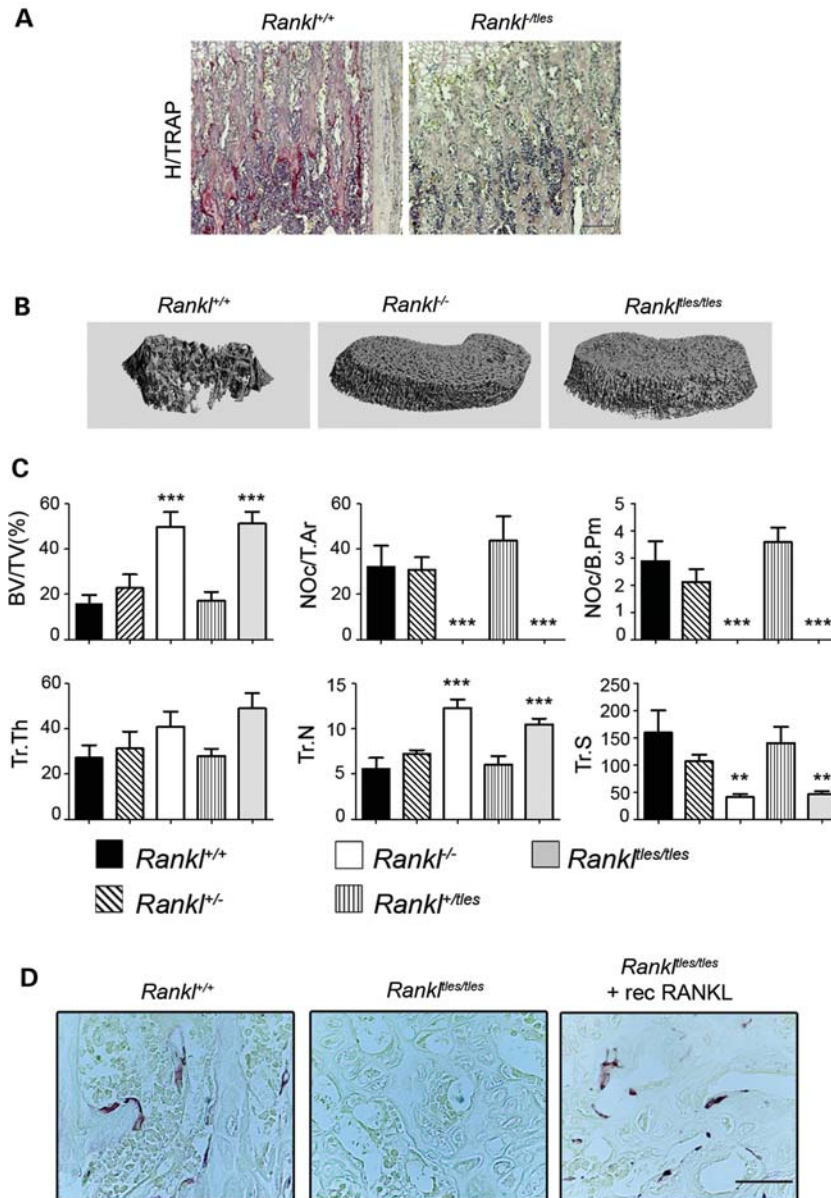


Figure 3. Genetic confirmation of the RANKL G278R mutation. (A) Serial sections of tibiae from 3-week-old *Rankl*^{-les} compound heterozygous mice were stained with hematoxylin and TRAP (H/TRAP). Bar: 100 μ m. (B) Representative femur trabecular areas from *Rankl*^{+/+}, *Rankl*^{-/-} and *Rankl*^{les/les} mice scanned with microCT ($n = 6$ per group). (C) Histomorphometric analysis of structural bone parameters of femurs from *Rankl*^{+/+} ($n = 12$), *Rankl*^{+/-} ($n = 6$), *Rankl*^{-/-} ($n = 6$), *Rankl*^{+les} ($n = 6$) and *Rankl*^{les/les} ($n = 6$) littermate mice at 4 weeks of age. BV/TV, bone volume/total volume; NOc/T.Ar, number of osteoclasts/total area; NOc/B.Pm, number of osteoclasts/bone perimeter/mm; Tr.Th, trabecular thickness (mm); Tr.N, trabecular number/mm; Tr.S, trabecular separation/mm³. *** $P < 0.0001$ and ** $P < 0.001$ when *Rankl*^{-/-} and *Rankl*^{les/les} mice were compared with the rest groups. (D) Osteoclast formation is restored by recombinant RANKL administration. Daily subcutaneous injections of recombinant RANKL at 150 μ g/kg in *Rankl*^{les/les} mice ($n = 4$) induce formation of TRAP+ cells in trabecular bones. Representative TRAP staining of distal femur sections are shown. Scale bar: 50 μ m.

that RANKL^{G278R} not only fails to form trimers but also inhibits WT RANKL trimerization.

Soluble RANKL (8,9) was detected in supernatants of HEK 293FT cells transfected with WT RANKL-FLAG and WT RANKL-Myc or co-transfected with both WT forms but not in supernatants of cells transfected with RANKL^{G278R}-Myc or co-transfected with WT RANKL-FLAG (Fig. 4D). These results support a failure of trimer assembly in cells expressing RANKL^{G278R} or coexpressing RANKL^{G278R} and WT RANKL,

as the specific antibodies recognize epitopes on RANKL trimers which are not formed in the latter cases.

To investigate whether RANKL^{G278R} interacts with WT RANKL, immunoprecipitation was performed. Lysates of HEK 293FT cells transfected with WT RANKL-FLAG in the presence of either WT RANKL-Myc or RANKL^{G278R}-Myc were immunoprecipitated with an anti-Myc antibody, and the immunoprecipitates were assayed for the presence of the FLAG epitope by immunoblot (Fig. 4E). WT RANKL-

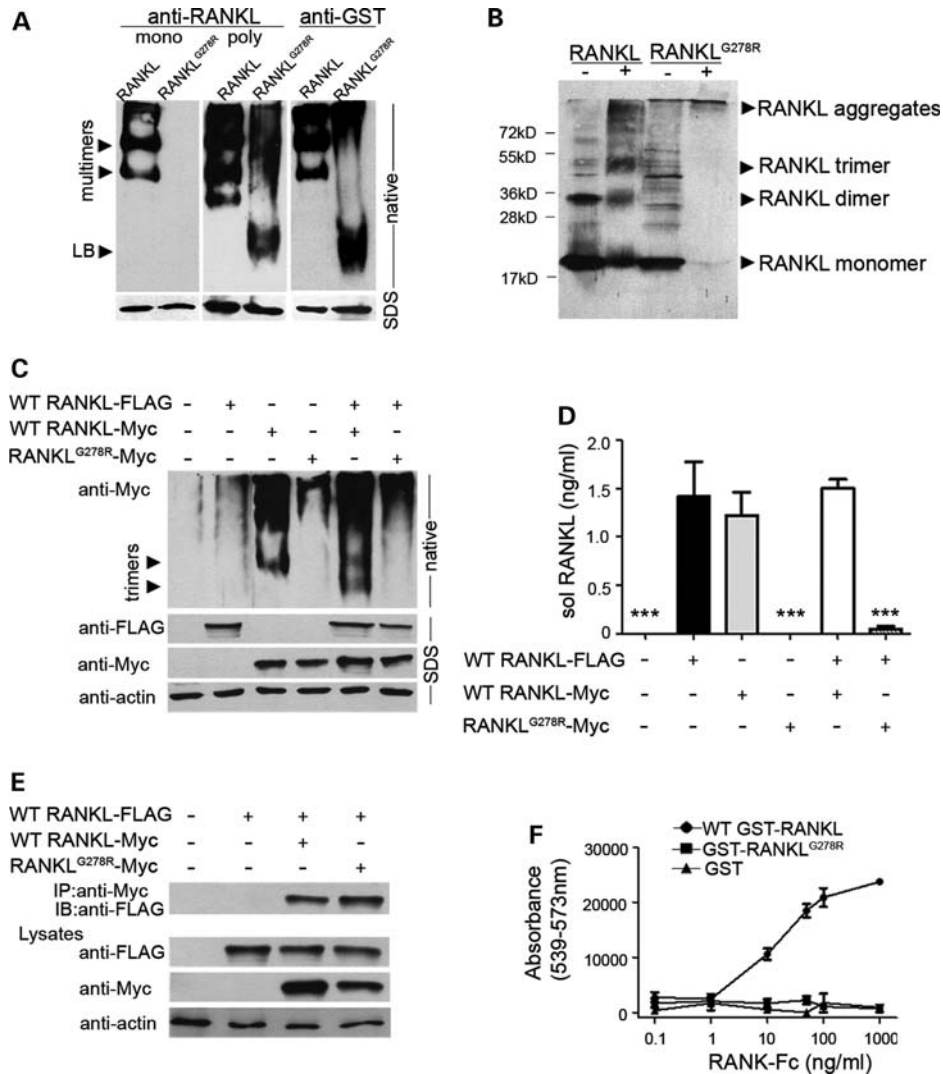


Figure 4. RANKL^{G278R} fails to trimerize and bind to RANK but interacts with WT RANKL. (A) Recombinant WT GST-RANKL and GST-RANKL^{G278R} were resolved either on native or on SDS-reduced polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and detected by western blotting using monoclonal (mono) or polyclonal (poly) antibodies against RANKL or against GST. (B) Soluble WT RANKL and RANKL^{G278R} proteins were crosslinked with DSS (+) or PBS (-), run on 12% SDS-PAGE and detected by western blot using an anti-RANKL polyclonal antibody. (C) HEK 293FT cells were transfected with full-length WT RANKL-FLAG, WT RANKL-Myc and/or RANKL^{G278R}-Myc. Lysates were analyzed in native gels followed by western blot using an anti-Myc antibody. The protein input was determined in SDS-PAGE and western blotting using antibodies against FLAG, Myc and actin. (D) The levels of soluble RANKL were quantified in supernatants of transfected HEK 293FT cells displayed in (C). Data are shown as mean \pm SEM of three experiments in duplicate. *** P < 0.0001 when compared with WT RANKL-expressing cells. (E) Lysates of transfected HEK 293FT cells were immunoprecipitated with a Myc-specific antibody, and immunoblotted with an anti-FLAG antibody. The protein input was determined in western blots using antibodies against FLAG, Myc and actin. A representative figure of three independent experiments is shown for western blots. (F) Different concentrations of RANK-Fc were added to plates coated with either WT GST-RANKL, GST-RANKL^{G278R} or GST, and the binding was monitored by fluorescence detection of PE-conjugated goat anti-human IgG. Data are shown as mean \pm SEM of three experiments performed in duplicate.

FLAG coimmunoprecipitated with either WT RANKL-Myc or RANKL^{G278R}-Myc, indicating that WT RANKL interacts with RANKL^{G278R}.

To examine whether RANKL^{G278R} binds to the RANK receptor, serial dilutions of murine RANK-Fc were incubated with immobilized WT GST-RANKL, GST-RANKL^{G278R} or GST (Fig. 4F). RANK-Fc interacted with GST-RANKL in a dose-dependent manner, but not with GST-RANKL^{G278R} or GST. This result shows that the binding affinity of GST-RANKL^{G278R} for RANK-Fc was completely abolished, as a result of its inability to form trimers. Collectively, these

results indicate that G278R substitution is critically involved in the abrogation of RANKL trimer formation and subsequently receptor binding.

RANKL^{G278R} lacks biological activity and possesses a dominant-negative effect

To confirm that RANKL^{G278R} is inactive and to test whether it interferes with the ability of WT RANKL to induce *ex vivo* osteoclast formation, BM cells were treated with 25 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml GST-RANKL for 5 days in the presence

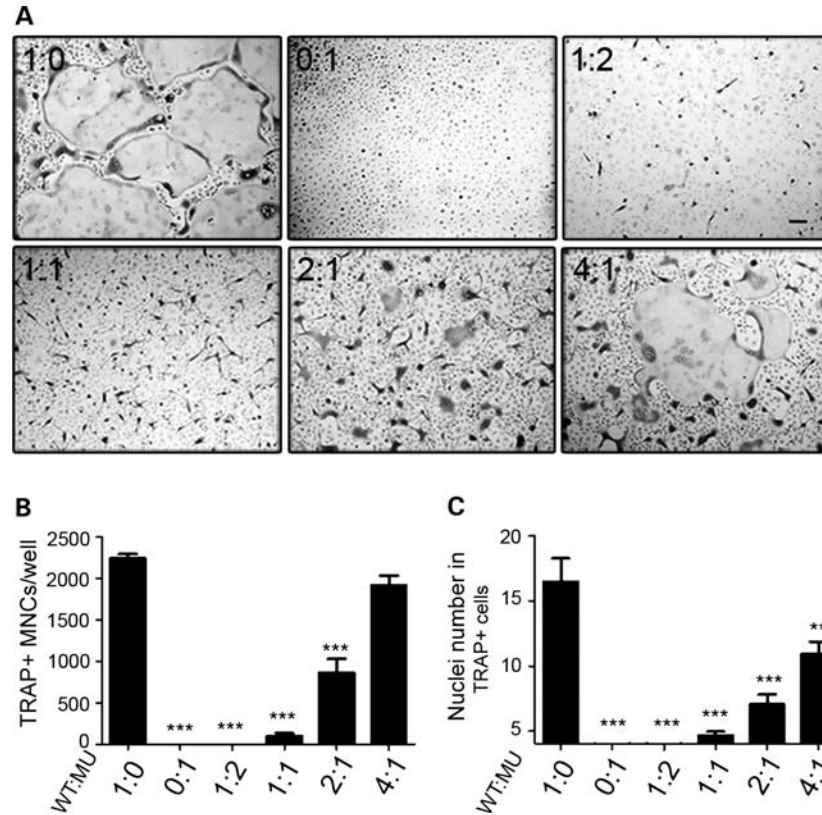


Figure 5. Dose-dependent suppression of RANKL-induced osteoclast formation by RANKL^{G278R}. (A) Representative TRAP stain of osteoclast cultures from WT BM cells treated with M-CSF and GST-RANKL in the absence (1:0) or presence of GST-RANKL^{G278R} at various concentrations including 100 ng/ml (1:2), 50 ng/ml (1:1), 25 ng/ml (2:1) or 12.5 ng/ml (4:1). Bar: 100 μ m. (B) The number of TRAP+ multinucleated (three or more nuclei) cells was calculated per well (24-well plate). (C) The nuclei number in TRAP+ multinucleated cells was also calculated. Data are shown as mean \pm SEM of three experiments in duplicate. Each group was compared with that of GST-RANKL (1:0) (** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$).

or absence of GST-RANKL^{G278R} at different concentrations from 12.5 to 100 ng/ml (Fig. 5A–C). It is shown that WT GST-RANKL (ratio 1:0) induces formation of TRAP+ giant osteoclasts. Instead, RANKL^{G278R} lacks biological activity as GST-RANKL^{G278R} failed to induce formation of TRAP+ cells (ratio 0:1). Complete inhibition in the formation of multinucleated TRAP+ osteoclasts was noticed when the concentration of WT GST-RANKL was half of that of GST-RANKL^{G278R} (ratio 1:2). Incubation of WT GST-RANKL with GST-RANKL^{G278R} at equal molar 1:1 concentrations impaired the formation of TRAP+ giant multinucleated cells, whereas small-sized TRAP+ cells with low numbers of nuclei were still formed. However, TRAP+ giant multinucleated cells were formed at a 2:1 ratio, which were morphologically smaller and exhibited less multinucleation when compared with osteoclasts formed in the presence of WT GST-RANKL exclusively (ratio 1:0). Formation of giant osteoclast-like cells was evident when WT GST-RANKL was mixed with GST-RANKL^{G278R} at a ratio of 4:1 or higher. Incubation of WT GST-RANKL with GST at similar concentrations (12.5–100 ng/ml) did not affect the formation of osteoclasts. These results indicate that the RANKL^{G278R} variant lacks biological activity and possesses a dominant-negative effect on WT RANKL function.

However, a dominant-negative effect does not apply in heterozygous mutant mice. Since heterozygous mice are expected

to produce a 1(WT):1(RANKL^{G278R}) protein ratio, we investigated the interactions between WT RANKL and RANKL^{G278R} at equimolar amounts, after preincubation for 1 h, crosslinking with disuccinimidyl suberate (DSS) and analysis in SDS–PAGE (Supplementary Material, Fig. S4). Interestingly, a dramatic increase in the intensity of RANKL trimers, dimers and monomers was observed, which could be explained by an interaction of RANKL^{G278R} with WT RANKL and the formation of trimeric heterocomplexes (2 WT:1 RANKL^{G278R}). Exchange of one WT monomer in homotrimers with one RANKL^{G278R} monomer is expected to increase the amount of WT monomers which could further bind together to form homodimers, as this constitutes a dynamic process. The increase in RANKL trimers could be attributed to the presence of both intact WT RANKL homotrimers and newly formed heterotrimers with RANKL^{G278R} (2 WT:1 RANKL^{G278R}), which according to our *in silico* binding analyses are likely functional. Therefore, we postulate that, in heterozygous mice, adequate levels of functional RANKL trimers are formed enabling proper osteoclastogenesis, which could explain the absence of a dominant-negative effect in heterozygous animals.

G122R substitution abrogates TNF activity

Glycine at codon 278 of RANKL is highly conserved among various members of the TNF superfamily (Fig. 2E). Thus,

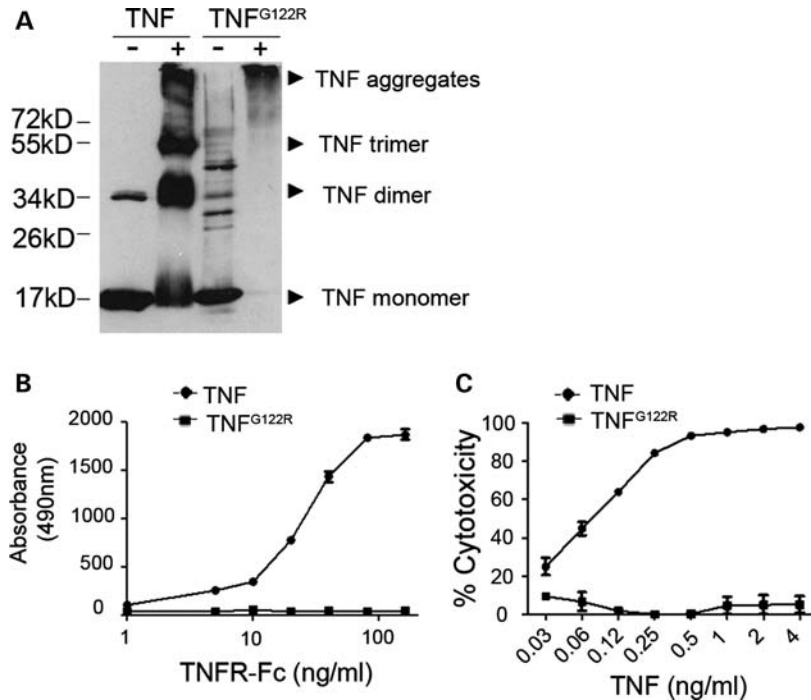


Figure 6. G122R substitution abrogates TNF trimer formation, binding to TNFR and bioactivity. (A) Soluble WT TNF and TNF^{G122R} proteins were crosslinked with DSS (+) or PBS (-), run on 12% SDS-PAGE and detected by western blot using an anti-TNF polyclonal antibody. (B) Different concentrations of p75TNFR-Fc (1–160 ng/ml) were added to plates coated with either soluble TNF or TNF^{G122R}, and the binding was monitored by detection of HRP-conjugated goat anti-human IgG. Data are shown as mean \pm SEM of a representative experiment performed in triplicate. (C) L929 cytotoxicity assay was performed in the presence of WT GST-TNF or GST-TNF^{G122R} at serial dilutions (0.03–4 ng/ml). Data are shown as mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate.

we investigated whether a similar substitution in human TNF, which corresponds to a replacement of glycine with arginine at position 122 (G122R) in the soluble form or at position 198 in the transmembrane form, modifies TNF trimerization and function. Biochemical analysis showed that TNF multimers were detected in recombinant WT GST-TNF but not in GST-TNF^{G122R}, indicating failure of spontaneous trimer assembly (Supplementary Material, Fig. S5). This result was also confirmed by chemical crosslinking (Fig. 6A) of soluble WT TNF or TNF^{G122R} after the removal of GST. Similar to the RANKL^{G278R} variant, G122R substitution in TNF abrogated trimer formation, whereas monomers and, mainly, aggregates were formed instead of trimers, dimers and monomers detected in WT TNF (Fig. 6A) (34).

To examine whether TNF^{G122R} binds to TNF receptor, serial dilutions of human p75TNFR-Fc were incubated with immobilized soluble TNF or TNF^{G122R} (Fig. 6B). p75TNFR-Fc interacted with TNF in a dose-dependent manner, but not with TNF^{G122R}, indicating that TNF^{G122R} cannot bind to its receptor. The biological activity of the GST-TNF^{G122R} variant was tested using *in vitro* cytotoxicity assays. Although recombinant WT GST-TNF induced dose-dependent cytotoxicity in L929 cells, GST-TNF^{G122R} was inefficient to induce cytotoxicity not only at similar doses (0.03–4 ng/ml) (Fig. 6C) but also at doses 60 times more concentrated (240 ng/ml). These results indicate that a similar residue substitution in soluble human TNF, G122R, is critically involved in the abrogation of TNF trimer assembly, receptor binding and biological activity.

Small-molecule SPD304 interferes with RANKL structure and inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis

A novel small-molecule inhibitor of TNF trimerization, named SPD304, has been recently reported (35) to interact with glycine 122 (G122), which corresponds to G278 in RANKL. Experimental evidence on the TNF analogue (35) and *in silico* binding studies on mouse RANKL confirm that the optimal binding position of SPD304, causing trimer inhibition, is located very close (<4 Å) to the G278 mutation position in the structure (Supplementary Material, Fig. S6A). To experimentally confirm the interference of the SPD304 with the RANKL structure, soluble mouse RANKL was preincubated with increasing concentrations of SPD304 (6–200 μ M) and analyzed in native gels showing the natural conformation of RANKL protein (Supplementary Material, Fig. S6B). In the absence of SPD304, soluble RANKL was detected as a single main band, whereas a second band of lower molecular weight was also evident in the presence of SPD304. This change of the RANKL conformation appeared even in the lower concentration of SPD304 tested (6 μ M) and was more noticeable at 200 μ M, indicating a possible release of RANKL dimers and monomers by SPD304. To confirm this, chemical crosslinking experiments were performed in soluble RANKL preincubated with SPD304 at similar concentrations. Indeed, in the presence of SPD304, a dramatic increase of RANKL dimers and monomers was detected, indicating disruption of the trimeric RANKL structure (Supplementary Material, Fig. S6C). Intriguingly, a significant

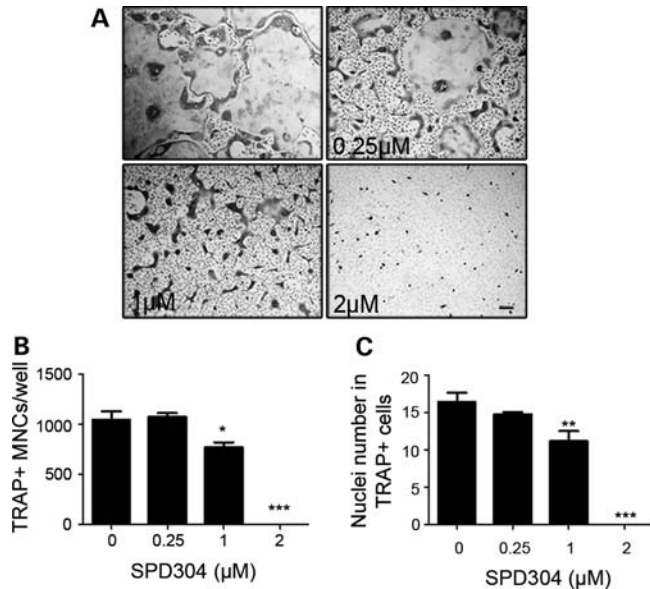


Figure 7. SPD304 inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis. (A) Representative TRAP stain of osteoclast cultures from WT BM cells treated with M-CSF and GST-RANKL in the presence of 0.25–2 μM SPD304. Bar: 100 μm . (B) The number of TRAP+ multinucleated (three or more nuclei) cells was quantitated per well (48-well plate). (C) The nuclei number in TRAP+ multinucleated cells was also calculated. Data are shown as mean \pm SEM of three experiments performed in duplicate. The effect of SPD304 on osteoclast formation was compared with that of untreated cells (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$).

increase in the intensity of the band corresponding to RANKL trimers was also noticed. This could reflect a possible conformational alteration in the structure of RANKL trimers complexed with SPD304 that lowers the threshold required for the detection of RANKL trimeric molecules by the polyclonal anti-RANKL antibody, enabling the detection of more RANKL molecules.

To investigate whether SPD304 can inhibit RANKL function in osteoclastogenesis assays, BM cells were treated with 25 ng/ml M-CSF and 80 ng/ml GST-RANKL in the presence of SPD304 at different concentrations ranging from 0.25 to 2 μM . SPD304 at 1 μM attenuated both the number and the size of TRAP+ multinucleated cells, whereas at 2 μM the formation of multinuclear TRAP+ osteoclast was completely inhibited (Fig. 7A–C). SPD304 did not display any cell toxicity at the indicated doses. Collectively, these results provide supporting evidence that SPD304 modifies the conformation of the RANKL trimeric structure and inhibits RANKL-mediated osteoclastogenesis.

DISCUSSION

Human osteopetroses are a heterogeneous group of bone remodeling disorders characterized by an increase in bone density due to a defect in osteoclastic bone resorption. Functional mutations in RANKL have been identified in a new form of osteoclast-poor ARO that could not be cured by hematopoietic stem cell transplantation. Three loss-of-function RANKL mutations have been identified in ARO, M199K, del145-177AA and V277WfX5 (27); the single amino acid

substitution, M199K, is located within a highly conserved domain, the deletion 145–177 removes β -strand A and half of the AA' loop which could abolish the interaction with RANK, whereas the frameshift deletion V277WfX5 and the resultant loss of strand F, which is important for the trimerization of RANKL, could abrogate the conformation and the binding activity (36). Interestingly, these RANKL mutations were localized within the extracellular bioactive TNF-like core domain, whereas the underlying molecular mechanisms leading to ARO pathogenesis remain unknown. Characterization of functional RANKL mutations derived either in humans or in animal models constitutes a powerful approach for the elucidation of the molecular basis of ARO as well as for the potential design of novel RANKL inhibitors.

Following a forward genetics approach using ENU-mediated random mutagenesis, we identified a novel ARO model (*tlcs*), characterized by defective tooth eruption, complete lack in osteoclasts, increased bone mass and absence of lymph nodes. In this study, we demonstrate that the *tlcs* osteopetrotic phenotype is caused by a missense point mutation in the *Rankl* gene that corresponds to a single amino acid substitution from glycine to arginine (G278R) at the extracellular TNF-like core domain of RANKL. Since the skeletal phenotype of the *Rankl* mutant mice (*Rankl^{tlcs/tlcs}*) is similar to the existing *Rankl* knockout models (13,14), our results indicate that a single amino acid change is sufficient to cause a loss-of-function *Rankl* allele and subsequently ARO *in vivo*. However, the *Rankl^{tlcs/tlcs}* mice differ from the *Rankl* knockout mice at the molecular level. Even though *Rankl^{tlcs/tlcs}* mice produce physiological levels of a non-functional RANKL protein, in *Rankl* knockout mice there is no production of either mRNA or RANKL protein. This is due to the fact that the *Rankl* null alleles have been highly disrupted by the incorporation of the neomycin selection cassette as well as by the deletion of large protein regions. Instead, the mutant allele contains a point mutation in a coding region that causes a single amino acid substitution, mimicking natural genetic variants. The *Rankl^{tlcs/tlcs}* osteopetrotic model is the first reported animal model that carries a functional mutation in the *Rankl* gene and closely resembles RANKL-mediated human ARO, as in both cases the RANKL protein is produced but is inactive due to disruptive mutations at the extracellular bioactive TNF-like core domain, unlike the *Rankl* null alleles (13,14). G278R substitution fully abrogates RANKL function by impairing trimer assembly, providing a possible mechanistic explanation for some forms of human RANKL-mediated ARO. Even though, an equivalent substitution for G278 has not been reported in ARO patients so far, such amino acid is deleted at the frameshift deletion V277WfX5, which is predicted to cause loss of the βG , βH and βF strands of RANKL, important for its trimerization (27). It is therefore likely that the loss of trimerization we have described in this study may represent a pathogenetic mechanism driving ARO pathology. Thus, in addition to the use of *Rankl* knockout models for preclinical studies, our newly described ARO model may also be useful in the validation of new therapeutic approaches in ARO due to the presence, as in humans, of a mutated RANKL variant. Indeed, administration of recombinant soluble RANKL completely rescues the osteoclast defect *in vivo*, indicating that treatment with recombinant RANKL

might overcome failure of osteoclast formation and osteopetrosis in ARO. Future comparative studies could show whether the effectiveness of novel therapeutic approaches is similar in both ARO mouse models, *Rankl^{tlcs/tlcs}* and *Rankl* knockout mice, which differ at the protein level.

At the molecular level, our data demonstrate that a single amino acid substitution in the core of TNF-like trimeric structure, G278R, completely inactivates RANKL function by inhibiting its trimerization. Even though, it has been previously proposed that RANKL trimerization involves intersubunit interactions among 43 residues, scattered mainly within the 10 highly conserved β -strands of each monomer (6), it is shown here for first time that a single amino acid substitution is sufficient to completely disrupt trimer assembly. G278 is originally shown here to constitute one of the critical amino acid involved in RANKL function, providing new opportunities for the rational design of novel RANKL inhibitors. So far, the identification of functional RANKL residues has been based on predictions made on the crystal structure of RANKL/RANK (36,37). Such studies have been exclusively concentrated in amino acids interacting with the RANK receptor such as the Glu225, Arg222 and Asp299 residues (37), where their substitution leads to a dramatic decrease on binding to RANK and subsequent inability to promote osteoclast formation. Our forward genetics approach identifies and characterizes a critical amino acid substitution that results in protein inactivation and subsequently to osteopetrosis *in vivo*.

From our constructed model of the RANKL^{G278R} protein based on the known crystal structure (6,7), it is apparent that RANKL^{G278R} mutation may not affect the formation and folding of the monomer but will most definitely affect the formation of a trimer assembly. The RANKL^{G278R} mutation is located at the hydrophobic F β -strand (Fig. 2C), which is 100% conserved between human and mouse RANKL. The F β -strand is part of the inner A'AHCF β -sheet that is involved in intersubunit association. The introduction of a positive charge as well as a long side chain is expected to disrupt the hydrophobic interface and create steric hindrances causing packing inefficiencies (Fig. 2D). Our biochemical analysis on recombinant soluble RANKL has revealed that functional trimers or multimers are not detected for the RANKL^{G278R} protein, confirming our structure-based prediction regarding the trimerization inability of RANKL^{G278R}. Instead, our studies reveal the presence of monomers as well as the formation of RANKL^{G278R} aggregates that could be explained by the exposure of hydrophobic regions previously buried in trimer interfaces. Such hydrophobic surfaces have a natural tendency to stick together forming non-functional protein aggregates. Since formation of a functional RANKL trimer is prerequisite for receptor binding, RANKL^{G278R} is unable to bind and activate RANK that is required for the stimulation of the downstream signaling cascades, leading to osteoclast differentiation, activation and survival.

Interestingly, the G278 residue of RANKL is highly conserved in various members of the TNF superfamily including TNF, CD40L, TRAIL, BAFF and APRIL, suggesting a similar involvement in homotrimer assembly. Notably, a similar substitution of this conserved glycine residue by valine at position 227 has also been detected in the *CD40L* gene in patients with X-linked hyper IgM syndrome (38). However, it has not been

experimentally proven that glycine 227 is involved in ligand trimerization. Therefore, we investigated whether a similar substitution in another TNF family member results also in an inability in the formation of trimers. TNF, the prototype of the TNF superfamily, has a central role in the pathogenesis of chronic inflammatory and autoimmune disorders (39), and TNF inhibitors were the first biologic therapeutics approved for the treatment of rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease. Our present data confirm that a similar residue substitution in soluble TNF, G122R, abrogates TNF trimer formation, binding to the p75TNF receptor and bioactivity. Therefore, the identified conserved glycine within the TNF-like core domain seems to be critically involved in trimer formation and could be exploited for the design of novel specific inhibitors against TNF superfamily members.

Recombinant RANKL^{G278R} protein has a dominant-negative effect in *ex vivo* osteoclastogenesis assays which depends on the ratio between WT and RANKL^{G278R} proteins. According to our *in vitro* experimental data and proposed structural model, functional trimers can be formed when the ratio of WT to RANKL^{G278R} protein is 3:0 (WT homotrimers) or 2:1 (no dominant negative), whereas there is no activity at the ratio of 0:3 (only RANKL^{G278R}) or 1:2 (dominant negative), as the latter are proposed to lack trimerization potency. The formation of a heterotrimer with one mutant monomer may still be possible without exerting a dominant-negative effect, since two out of three hydrophobic interfaces between the monomers are still intact and hold the trimer assembly (Fig. 2C). However, the introduction of two or three mutant monomers in the trimer is expected to introduce extra charge repulsions as well as additional steric hindrances leading to the failure of functional trimer assembly. The absence of a dominant-negative effect in heterozygous *Rankl^{tlcs/+}* mice *in vivo* can be explained by the stoichiometry between WT and RANKL^{G278R} in RANKL trimers. As RANKL spontaneously forms trimers, WT and RANKL^{G278R} proteins can interact and form either 2(WT):1(RANKL^{G278R}) trimers or 1(WT):2(RANKL^{G278R}) trimers. Even though heterozygous mice are expected to produce a 1 (WT):1(RANKL^{G278R}) protein ratio, due to the trimeric RANKL nature these RANKL variants can still form functional WT homotrimers or 2(WT):1(RANKL^{G278R}) trimers, which are shown *in vitro* to lead to osteoclastogenesis (Fig. 5). Indeed, our biochemical analyses show that at equimolar ratio, soluble WT RANKL and RANKL^{G278R} interact, increasing the levels of trimeric RANKL molecules (Supplementary Material, Fig. S4). Such trimers could correspond to both intact WT RANKL homotrimers and the newly formed heterotrimers with RANKL^{G278R} (2WT:1RANKL^{G278R}), which according to our *in silico* binding analyses are likely functional. Therefore, we postulate that, in heterozygous mice, adequate levels of functional RANKL trimers are formed enabling proper osteoclastogenesis, which could explain why a dominant-negative effect does not apply in the heterozygous animals. Instead, complete blockade of RANKL trimer formation *in vivo* would require at least two times higher levels of the RANKL^{G278R} protein so that the stoichiometry favors the dominant-negative effect by 1(WT):2(RANKL^{G278R}), which is not probable in heterozygous mice, but may be achieved pharmacologically.

RANKL is a key therapeutic target in bone-loss diseases such as osteoporosis, rheumatoid arthritis and bone metastasis. Recombinant proteins that inhibit RANKL–RANK interactions, such as RANK-Fc, Fc-OPG and anti-RANKL antibodies, have been effectively used for the treatment of osteolytic bone diseases (25,40,41). However, the use of large macromolecules as therapeutic agents can be hindered by drawbacks, including antigenicity, poor bioavailability and high cost. A variety of novel antiresorptive agents, either small peptides or peptidomimetics based on the structure of RANKL and RANK, have been recently developed that mainly antagonize either the RANKL–RANK interaction (36,37,42) or the interaction of RANK with signaling adaptor molecules (43). Such inhibitors have been developed as alternative agents to overcome the disadvantages of using macromolecules. The identification of G278 as a critical residue functionally involved in RANKL trimer assembly points to the potential use of novel RANKL inhibitors, such as peptides or small molecules that are designed to interact with such residue in order to inhibit trimerization. It has been previously shown that trimer assembly within the TNF ligand family constitutes a dynamic process where subunits can be exchanged (44). This phenomenon could explain the dominant-negative effect exerted by the RANKL^{G278R} variant. Additionally, it has been recently demonstrated that the disruption of tightly preassociated homotrimeric proteins, such as TNF, is feasible through inhibitors that accelerate subunit dissociation. SPD304, the strongest small-molecule TNF antagonist reported to date, promotes the dissociation of TNF trimers (35) by displacing one of the three TNF subunits and forming a complex with the remaining two that are unable to bind to and stimulate TNF receptors. Among the 16 interacting residues, 7 are localized in the F β -strand, including G122, which corresponds to G278 in RANKL. Our results demonstrate that SPD304 effectively inhibits RANKL-induced *ex vivo* osteoclast formation, suggesting a commonality of mechanism to that of TNF inhibition. This effect might be explained by interference of SPD304 with the hydrophobic interfaces of RANKL monomers, including the G278 residue. Indeed, *in silico* binding studies on mouse RANKL confirm that the optimal binding position of SPD304, causing trimer inhibition, is located very close (<4 Å) to the G278 mutation position (35). Therefore, both the G278R mutation and SPD304 acting on the same location of the trimer's monomer–monomer interface are likely to cause an equivalent inhibition effect to the trimer formation. Our experimental results provide supporting evidence that SPD304 interferes with the trimeric RANKL structure promoting release of dimers and monomers similar to the mechanism reported for TNF (35). However, SPD304 contains a potentially toxic 3-substituted indole moiety that produces reactive intermediates which possibly cause toxicities by covalently binding to nucleophilic residues of protein and/or DNA (45). Further modifications of SPD304 will allow the development of more potent chemical agents that abrogate trimerization with higher specificity to TNF and/or RANKL and less toxicity that can be applied for therapeutic purposes. Especially for RANKL, the development of small-molecule inhibitors could offer accessibility to tissues such as brain where RANKL is highly expressed and is involved in important

biological processes like thermoregulation (21). In this aspect, our results provide a molecular basis for the rational design and evaluation of novel RANKL inhibitors, either peptides and/or small molecules that target trimerization as a novel strategic approach for impairing RANKL bioactivity. Collectively, our results reveal a functional amino acid critical for ligand trimerization and bioactivity within the TNF ligand superfamily which could be used as a target for designing novel inhibitors that specifically inhibit trimer assembly and subsequently function of RANKL, TNF or other TNF superfamily members.

MATERIALS AND METHODS

Mouse husbandry

The *Rankl*^{-/-} mice have been previously reported (13). DBA/2J mice were purchased from the Jackson Laboratories. Mice were maintained and bred under specific pathogen-free conditions in the animal facility of Biomedical Sciences Research Center (BSRC) 'Alexander Fleming'. All animal procedures were approved and carried out in strict accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee of BSRC 'Alexander Fleming' and in accordance with the Hellenic License for Animal Experimentation at the BSRC 'Alexander Fleming'.

ENU mutagenesis

G0 males of a mixed C57BL/6Jx129S6 background were treated with ENU (Sigma-Aldrich, Inc.) administered in three weekly doses at 100 mg/kg of body weight (46,47). Each G0 mouse was crossed to WT C57BL/6Jx129S6 females to produce G1 males that were further mated with WT females to produce G2 daughters that were subsequently backcrossed with the G1 parent to generate G3 progeny (47–49). ENU mutagenesis was performed at BSRC 'Alexander Fleming'.

Mapping and sequencing

Heterozygous *+/tles* animals were outcrossed with DBA/2J mice and the F1 offspring were intercrossed to generate the F2 progeny harboring the recessive *tles* mutation. F2 progeny were screened for osteopetrosis and used for genetic analysis. A total of 71 polymorphic markers, including simple sequence-length polymorphisms (SSLPs) and SNPs, were used for genome-wide linkage analysis. SSLPs were resolved on 4% agarose gels, whereas SNPs were identified by pyrosequencing using the Pyromark ID instrument (Biotage AB). A standard genome scan was conducted using R/qtl (The R Foundation for Statistical Computing, version 2.8.0) (50). Log-likelihood linkage for single-trait analysis was established by non-parametric interval mapping of a binary model (diseased versus healthy control siblings), on 124 F2 animals in total, computed at 1 cM increments over the entire genome. Sequencing was carried out as a service by MWG Biotech AG.

Crystal structure and molecular modeling

The RANKL homotrimer structure was obtained from the Protein Data Bank (PDB; code 1S55) (www.rcsb.org/pdb/). Molecular models for the G278R mutant homo- and heterotrimers were built using Modeller v9.4 (51) and tested for packing inconsistencies and atomic clashes using the program QUANTA-CHARM (Molecular Simulations, Inc., San Diego, CA, USA) (52).

Histopathological analysis

Femurs and tibiae were fixed in 4% PFA for 6 h, decalcified in 13% EDTA and embedded in paraffin. Sections of 5 μm thickness were stained with hematoxylin/eosin. Osteoclasts were stained for TRAP activity using a leukocyte acid phosphatase (TRAP) kit (Sigma-Aldrich).

Ex vivo osteoclast formation

BM cells were collected after flushing out of femurs and tibiae, subjected to gradient purification using ficoll-paque (GE Healthcare), plated in 24-well plates at a density of 5×10^5 cells per well and cultured in αMEM medium (GIBCO) containing 10% fetal bovine serum supplemented with 40 ng/ml RANKL (R&D Systems) and 25 ng/ml M-CSF (R&D Systems) for 5 days. Similarly, splenocytes were collected, plated in 24-well plates at a density of 10^6 cells per well and cultured in the presence of recombinant RANKL and M-CSF for 6 days. GST-RANKL^{G278R} was preincubated with WT GST-RANKL at room temperature for 20 min, prior to the stimulation of the BM cell cultures, in order to enable exchange of the RANKL variants and heterotrimer formation. Small-molecule SPD304 (Sigma-Aldrich) was preincubated with 80 ng/ml GST-RANKL at various concentrations from 0.25 to 2 μM in αMEM medium for 1 h at room temperature and then added to culture. Osteoclasts were stained for TRAP activity.

Osteoblasts were isolated from calvariae of 10-day-old mice, using a sequential collagenase/dispase digestion procedure, were plated in 24-well plates at a density of 4×10^4 cells per well and cultured overnight in αMEM medium with 10% FBS. BM cells or splenocytes were collected, cultured with 10 ng/ml M-CSF overnight, subjected to gradient centrifugation and co-cultured with osteoblasts at a density of 5×10^5 (BM cells) and 2×10^6 (splenocytes) in αMEM medium supplemented with 1,25(OH)₂ vitamin D3 (10 nM) and PGE2 (1 μM) for 6 days.

Bone histomorphometry

Left femurs were fixed in 4% formalin and embedded in methylmethacrylate resin (Technovit; Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) using standard procedures. Four-micrometer-thick sections were prepared with a Jung microtome (Jung, Heidelberg, Germany) and stained with von Kossa stain and toluidine blue. Standard bone histomorphometric measures were analyzed using a Zeiss Axioskop 2 microscope (Zeiss, Marburg, Germany) equipped with an Osteomeasure image analysis system.

MicroCT imaging

MicroCT images were acquired on a vivaCT40 (Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland). The scanner generates a cone beam at 5 mm spot size and operates at 50 keV. Images of femurs from WT, RANKL^{-/-}, RANKL^{+/-}, RANKL^{ties/ties} and RANKL^{+/-ties} mice were acquired.

Quantification of soluble RANKL

The levels of soluble mouse RANKL were quantitated using a commercial ELISA kit (R&D).

Expression and purification of GST-RANKL and GST-TNF

The extracellular domains of RANKL, RANKL^{G278R}, TNF and TNF^{G122R} were expressed in *Escherichia coli* as a GST-fusion protein. Briefly, a cDNA encoding the core ectodomain of murine RANKL residues 158–316, with or without the G278R substitution, was cloned into pGEX-6P-1 (GE Healthcare Life Sciences) downstream of GST. For the generation of recombinant GST-TNF, a cDNA encoding the extracellular domain of human TNF from valine 77 to leucine 233 was also cloned into pGEX-6P-1. The G122R substitution was introduced by a two-step overlapping PCR approach. Following IPTG-mediated (100 μM) induction of protein expression, BL21 cells were lysed by sonication, and incubated with glutathione-sepharose beads. The GST-fused proteins were released from the affinity matrix by competitive elution with 50 mM glutathione (Sigma-Aldrich).

Purification of soluble RANKL and TNF

After the capture of GST-RANKL or GST-TNF on glutathione beads, soluble RANKL or TNF was eluted by cleavage of beads with PreScission Protease (GE healthcare) for overnight at 4°C.

Protein crosslinking assay

The chemical crosslinking reagent DSS (Sigma) was used to examine the trimeric property of RANKL and TNF (33). 50 mM of DSS was prepared as a stock solution in dimethyl sulfoxide. RANKL or TNF proteins at a final concentration of 0.1 mM in PBS buffer (pH 7.5) were mixed with 1 mM DSS (the molar ratio of DSS is 10:1). The crosslinking reactions were carried out for 1 h at room temperature and terminated with 50 mM Tris (pH 7.5) for 30 min. Proteins from reaction mixtures were separated on 12% SDS-PAGE, followed by staining with Coomassie blue R-250 or proceeded in western blot.

Generation of C-terminus-tagged full-length WT and RANKL^{G278R}

The full-length mouse WT or RANKL^{G278R} cDNA constructs encoded residues 1–316 without a stop codon. A Myc-tagged RANKL expression vector was constructed by inserting full-length RANKL into the pcDNA3.1/myc-His A MCS vector

(Invitrogen). FLAG-tagged RANKL was created by subcloning full-length RANKL into the p3XFLAG-CMV-14 expression vector (Sigma-Aldrich).

Transient 293 transfection assays

HEK 293FT cells were transfected with 1 µg of plasmid DNA using TransIt-293 transfection reagent (Mirus, Madison, WI, USA). After 48 h, transfected cells were harvested in PBS and the half quantity was diluted in equal volume of 2× Laemmli sample buffer, and analyzed in 12% acrylamide denatured gels. The remaining cells were lysed by sonication, centrifuged and analyzed in 8% native acrylamide gels.

Western blot

Recombinant proteins or lysates were resolved either on 8% native acrylamide gels or on 12% SDS denatured acrylamide gels. RANKL was detected by western blotting using either a monoclonal (clone IK22/5, eBioscience) or a polyclonal (R&D Systems) anti-RANKL antibody, whereas for GST detection a rabbit polyclonal anti-GST antibody was used. Human TNF was detected using a rabbit polyclonal anti-TNF antibody provided by Professor Wim Buurman (Maastricht University). Moreover, antibodies against Myc (rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology), FLAG (M2, Sigma) and actin (goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology) were also used.

Immunoprecipitation

HEK 293FT cells were harvested 48 h after transient transfection, lysed and incubated with an anti-Myc antibody. Anti-Myc immunocomplexes were precipitated with protein A/G Sepharose (Santa Cruz Biotechnology). Protein complexes were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-FLAG antibody.

Binding assay of GST-RANKL^{G278R} to RANK

Nunc plates were coated with recombinant WT GST-RANKL, GST-RANKL^{G278R} or GST at 3 µg/ml and after blocking with 1% BSA were incubated with increasing amount of recombinant mouse RANK-Fc (R&D Systems). RANK binding was detected with a phycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-human IgG (Fc) (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) that was measured (539–573 nm) with the fluorescent plate reader TECAN infinite M200.

Binding assay of TNF^{G122R} to TNFR

Nunc plates were coated with recombinant soluble TNF or TNF^{G122R} at 3 µg/ml and incubated with increasing amount of recombinant human p75TNFR-Fc (Wyeth). TNFR binding was detected with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human IgG (Fc) (SouthernBiotech) using *o*-phenylenediamine substrate (Thermo Scientific Pierce), which was measured at 490 nm.

In vivo administration of soluble RANKL

Recombinant soluble RANKL was produced after the digestion of the GST-RANKL protein with prescission protease (GE Healthcare) for the removal of GST. Mice were treated from day 13 of age for a period of 14 days with subcutaneous injections of 150 µg/kg soluble RANKL.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed on the Prism software, using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. All values are reported as the mean ± standard error of the mean (SEM). All *P*-values <0.05 were considered significant.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank George Alexakos, Nikos Giannakas and Spiros Lalos for expert technical assistance in genetic analysis, animal breeding and histology, respectively.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by the European Commission (grant number MUGEN LSHG-CT-2005-005203 to E.D. and G.K., MASTERSWITCH HEALTH-F2-2008-223404 to G.S. and G.K.); the Hellenic Ministry for Development (grant number 04AKMON72 to E.D. and G.K.); the Public Benefit Foundation John S. Latsis (grant number 2010-16 to E.D.) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant number IMMUNO-BONE SPP1408 to G.S.).

REFERENCES

1. Karsenty, G. and Wagner, E.F. (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell*, **2**, 389–406.
2. Boyle, W.J., Simonet, W.S. and Lacey, D.L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, **423**, 337–342.
3. Fuller, K., Wong, B., Fox, S., Choi, Y. and Chambers, T.J. (1998) TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J. Exp. Med.*, **188**, 997–1001.
4. Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D. and Galibert, L. (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, **390**, 175–179.
5. Wong, B.R., Rho, J., Arron, J., Robinson, E., Orlicki, J., Chao, M., Kalachikov, S., Cayani, E., Bartlett, F.S. III, Frankel, W.N. *et al.* (1997) TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 25190–25194.
6. Lam, J., Nelson, C.A., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. and Fremont, D.H. (2001) Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J. Clin. Invest.*, **108**, 971–979.
7. Ito, S., Wakabayashi, K., Ubukata, O., Hayashi, S., Okada, F. and Hata, T. (2002) Crystal structure of the extracellular domain of mouse RANKL ligand at 2.2-Å resolution. *J. Biol. Chem.*, **277**, 6631–6636.
8. Hikita, A., Yana, I., Wakeyama, H., Nakamura, M., Kadono, Y., Oshima, Y., Nakamura, K., Seiki, M. and Tanaka, S. (2006) Negative regulation of

- osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF- κ B ligand. *J. Biol. Chem.*, **281**, 36846–36855.
9. Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M. and 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*, **142**, 1419–1426.
 10. Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S. *et al.* (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, **93**, 165–176.
 11. Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yan, K., Goto, M., Murakami, A. *et al.* (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 3597–3602.
 12. Lacey, D.L., Tan, H.L., Lu, J., Kaufman, S., Van, G., Qiu, W., Rattan, A., Scully, S., Fletcher, F., Juan, T. *et al.* (2000) Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival *in vitro* and *in vivo*. *Am. J. Pathol.*, **157**, 435–448.
 13. Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A. *et al.* (1999) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, **397**, 315–323.
 14. Kim, N., Odgren, P.R., Kim, D.K., Marks, S.C. Jr and Choi, Y. (2000) Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 10905–10910.
 15. Dougall, W.C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M.E., Maliszewski, C.R. *et al.* (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.*, **13**, 2412–2424.
 16. Li, J., Sarosi, I., Yan, X.Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H.L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G. *et al.* (2000) RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 1566–1571.
 17. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L. *et al.* (1998) Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.*, **12**, 1260–1268.
 18. Rossi, S.W., Kim, M.Y., Leibbrandt, A., Parnell, S.M., Jenkinson, W.E., Glanville, S.H., McConnell, F.M., Scott, H.S., Penninger, J.M., Jenkinson, E.J. *et al.* (2007) RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J. Exp. Med.*, **204**, 1267–1272.
 19. Takayanagi, H. (2007) Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 292–304.
 20. Fata, J.E., Kong, Y.Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R.A., Elliott, R., Scully, S., Voura, E.B., Lacey, D.L. *et al.* (2000) The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*, **103**, 41–50.
 21. Hanada, R., Leibbrandt, A., Hanada, T., Kitaoka, S., Furuyashiki, T., Fujihara, H., Trichereau, J., Paolino, M., Qadri, F., Plehm, R. *et al.* (2009) Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature*, **462**, 505–509.
 22. Jones, D.H., Nakashima, T., Sanchez, O.H., Kozieradzki, I., Komarova, S.V., Sarosi, I., Morony, S., Rubin, E., Sarao, R., Hojilla, C.V. *et al.* (2006) Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature*, **440**, 692–696.
 23. Schramek, D., Leibbrandt, A., Sigl, V., Kenner, L., Pospisilik, J.A., Lee, H.J., Hanada, R., Joshi, P.A., Aliprantis, A., Glimcher, L. *et al.* (2010) Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progesterin-driven mammary cancer. *Nature*, **468**, 98–102.
 24. Leibbrandt, A. and Penninger, J.M. (2009) RANK(L) as a key target for controlling bone loss. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **647**, 130–145.
 25. Cummings, S.R., San Martin, J., McClung, M.R., Siris, E.S., Eastell, R., Reid, I.R., Delmas, P., Zoog, H.B., Austin, M., Wang, A. *et al.* (2009) Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, **361**, 756–765.
 26. Smith, M.R., Egerdie, B., Hernandez Toriz, N., Feldman, R., Tammela, T.L., Saad, F., Heracek, J., Szwedowski, M., Ke, C., Kupic, A. *et al.* (2009) Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, **361**, 745–755.
 27. Sobacchi, C., Frattini, A., Guerrini, M.M., Abinun, M., Pangrazio, A., Susani, L., Bredius, R., Mancini, G., Cant, A., Bishop, N. *et al.* (2007) Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nat. Genet.*, **39**, 960–962.
 28. Grigoriadis, A.E., Wang, Z.Q., Cecchini, M.G., Hofstetter, W., Felix, R., Fleisch, H.A. and Wagner, E.F. (1994) c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, **266**, 443–448.
 29. Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T. and Shultz, L.D. (1990) The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, **345**, 442–444.
 30. Suda, T., Ueno, Y., Fujii, K. and Shinki, T. (2003) Vitamin D and bone. *J. Cell Biochem.*, **88**, 259–266.
 31. Xu, J., Tan, J.W., Huang, L., Gao, X.H., Laird, R., Liu, D., Wsocki, S. and Zheng, M.H. (2000) Cloning, sequencing, and functional characterization of the rat homologue of receptor activator of NF- κ B ligand. *J. Bone Miner. Res.*, **15**, 2178–2186.
 32. Cheng, T., Pavlos, N.J., Wang, C., Tan, J.W., Lin, J.M., Cornish, J., Zheng, M.H. and Xu, J. (2009) Mutations within the TNF-like core domain of RANKL impair osteoclast differentiation and activation. *Mol. Endocrinol.*, **23**, 35–46.
 33. Zhang, S., Liu, C., Huang, P., Zhou, S., Ren, J., Kitamura, Y., Tang, P., Bi, Z. and Gao, B. (2009) The affinity of human RANK binding to its ligand RANKL. *Arch. Biochem. Biophys.*, **487**, 49–53.
 34. Zhang, X.M., Weber, I. and Chen, M.J. (1992) Site-directed mutational analysis of human tumor necrosis factor- α receptor binding site and structure-functional relationship. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24069–24075.
 35. He, M.M., Smith, A.S., Oslob, J.D., Flanagan, W.M., Braisted, A.C., Whitty, A., Cancilla, M.T., Wang, J., Lugovskoy, A.A., Yoburn, J.C. *et al.* (2005) Small-molecule inhibition of TNF- α . *Science*, **310**, 1022–1025.
 36. Ta, H.M., Nguyen, G.T., Jin, H.M., Choi, J., Park, H., Kim, N., Hwang, H.Y. and Kim, K.K. (2010) Structure-based development of a receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) inhibitor peptide and molecular basis for osteopetrosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 20281–20286.
 37. Liu, C., Walter, T.S., Huang, P., Zhang, S., Zhu, X., Wu, Y., Wedderburn, L.R., Tang, P., Owens, R.J., Stuart, D.I. *et al.* (2010) Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. *J. Immunol.*, **184**, 6910–6919.
 38. Seyama, K., Nonoyama, S., Gangsaas, I., Hollenbaugh, D., Pabst, H.F., Aruffo, A. and Ochs, H.D. (1998) Mutations of the CD40 ligand gene and its effect on CD40 ligand expression in patients with X-linked hyper IgM syndrome. *Blood*, **92**, 2421–2434.
 39. Douni, E., Armaka, M., Kontoyiannis, D.L. and Kollias, G. (2007) Functional genetic and genomic analysis of modeled arthritis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **602**, 33–42.
 40. Feeley, B.T., Liu, N.Q., Conduah, A.H., Krenek, L., Roth, K., Dougall, W.C., Huard, J., Dubinett, S. and Lieberman, J.R. (2006) Mixed metastatic lung cancer lesions in bone are inhibited by noggin overexpression and Rank:Fc administration. *J. Bone Miner. Res.*, **21**, 1571–1580.
 41. Body, J.J., Greipp, P., Coleman, R.E., Facon, T., Geurs, F., Feraud, J.P., Harousseau, J.L., Lipton, A., Mariette, X., Williams, C.D. *et al.* (2003) A phase I study of AMGN-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer*, **97**, 887–892.
 42. Aoki, K., Saito, H., Itzstein, C., Ishiguro, M., Shibata, T., Blaque, R., Mian, A.H., Takahashi, M., Suzuki, Y., Yoshimatsu, M. *et al.* (2006) A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand-induced signaling, bone resorption, and bone loss. *J. Clin. Invest.*, **116**, 1525–1534.
 43. Poblenz, A.T., Jacoby, J.J., Singh, S. and Darnay, B.G. (2007) Inhibition of RANKL-mediated osteoclast differentiation by selective TRAF6 decoy peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **359**, 510–515.
 44. Ameloot, P., Declercq, W., Fiers, W., Vandenabeele, P. and Brouckaert, P. (2001) Heterotrimeric complexes formed by tumor necrosis factors of different species or mutants. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27098–27103.
 45. Sun, H. and Yost, G.S. (2008) Metabolic activation of a novel 3-substituted indole-containing TNF- α inhibitor: dehydrogenation and inactivation of CYP3A4. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 374–385.

46. Justice, M.J., Carpenter, D.A., Favor, J., Neuhauser-Klaus, A., Hrabe de Angelis, M., Soewarto, D., Moser, A., Cordes, S., Miller, D., Chapman, V. *et al.* (2000) Effects of ENU dosage on mouse strains. *Mamm. Genome*, **11**, 484–488.
47. Hrabe de Angelis, M.H., Flaswinkel, H., Fuchs, H., Rathkolb, B., Soewarto, D., Marschall, S., Heffner, S., Pargent, W., Wuensch, K., Jung, M. *et al.* (2000) Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat. Genet.*, **25**, 444–447.
48. Nelms, K.A. and Goodnow, C.C. (2001) Genome-wide ENU mutagenesis to reveal immune regulators. *Immunity*, **15**, 409–418.
49. Georgel, P., Du, X., Hoebe, K. and Beutler, B. (2008) ENU mutagenesis in mice. *Methods Mol. Biol.*, **415**, 1–16.
50. Broman, K.W., Wu, H., Sen, S. and Churchill, G.A. (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, **19**, 889–890.
51. Sali, A. and Blundell, T.L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, **234**, 779–815.
52. Brooks, B.R., Brooks, C.L. III, Mackerell, A.D. Jr, Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S. *et al.* (2009) CHARMM: the biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.*, **30**, 1545–1614.

Novel Genetic Models of Osteoporosis by Overexpression of Human RANKL in Transgenic Mice

Vagelis Rinotas,^{1,2} Alexandra Niti,¹ Romain Dacquin,³ Nicolas Bonnet,⁴ Marina Stolina,⁵ Chun-Ya Han,⁵ Paul Kostenuik,⁵ Pierre Jurdic,³ Serge Ferrari,⁴ and Eleni Douni^{1,2}

¹Laboratory of Genetics, Department of Biotechnology, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

²Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming", Vari, Greece

³Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Université de Lyon, CNRS, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

⁴Department of Rehabilitation and Geriatrics, Geneva University Hospital and Faculty of Medicine, Geneva, Switzerland

⁵Metabolic Disorders Research, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA

ABSTRACT

Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) plays a key role in osteoclast-induced bone resorption across a range of degenerative bone diseases, and its specific inhibition has been recently approved as a treatment for women with postmenopausal osteoporosis at high or increased risk of fracture in the United States and globally. In the present study, we generated transgenic mice (TghuRANKL) carrying the human RANKL (huRANKL) genomic region and achieved a physiologically relevant pattern of RANKL overexpression in order to establish novel genetic models for assessing skeletal and extraskeletal pathologies associated with excessive RANKL and for testing clinical therapeutic candidates that inhibit human RANKL. TghuRANKL mice of both sexes developed early-onset bone loss, and the levels of huRANKL expression were correlated with bone resorption and disease severity. Low copy Tg5516 mice expressing huRANKL at low levels displayed a mild osteoporotic phenotype as shown by trabecular bone loss and reduced biomechanical properties. Notably, overexpression of huRANKL, in the medium copy Tg5519 line, resulted in severe early-onset osteoporosis characterized by lack of trabecular bone, destruction of the growth plate, increased osteoclastogenesis, bone marrow adiposity, increased bone remodeling, and severe cortical bone porosity accompanied by decreased bone strength. An even more severe skeletal phenotype developed in the high copy Tg5520 founder with extensive soft tissue calcification. Model validation was further established by evidence that denosumab, an antibody that inhibits human but not murine RANKL, fully corrected the hyper-resorptive and osteoporotic phenotypes of Tg5519 mice. Furthermore, overexpression of huRANKL rescued osteopetrotic phenotypes of RANKL-defective mice. These novel huRANKL transgenic models of osteoporosis represent an important advance for understanding the pathogenesis and treatment of high-turnover bone diseases and other disease states caused by excessive RANKL. © 2014 American Society for Bone and Mineral Research.

KEY WORDS: BONE; OSTEOPOROSIS; RANKL; ANIMAL MODELS; TREATMENT

Introduction

Bone remodeling is a constant physiological process of bone resorption and formation. Osteoclasts initiate the remodeling cascade by removing bone matrix and subsequently osteoblasts refill these resorption cavities with organic bone matrix, which gradually attains its biomechanical strength and stiffness via mineralization.⁽¹⁾ In the healthy young adult skeleton, osteoblastic and osteoclastic activities are typically balanced so that skeletal integrity is preserved. Osteoporosis is a metabolic disease that is associated with unbalanced bone remodeling resulting from decreased bone formation and/or accelerated bone resorption. As a result, refilling of resorption cavities can be incomplete, leading to progressive bone loss, increased bone fragility, and fracture risk.⁽²⁾

The cause of the increased bone remodeling is multifactorial, but a recently discovered cytokine, receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), constitutes the master regulator of bone resorption.⁽³⁾ RANKL, a type II transmembrane protein from the tumor necrosis factor (TNF) superfamily, binds and activates its cognate receptor RANK as a trimer, and it also exists in a soluble form.⁽⁴⁾ Binding of RANKL to RANK initiates a signaling cascade essential for the differentiation, activity, and survival of osteoclasts^(5,6) and subsequently for osteoclast-induced bone resorption.⁽³⁾ The effects of RANKL are physiologically counterbalanced by the soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG), which inhibits the binding of RANKL to RANK on osteoclast progenitors by sequestering RANKL⁽⁷⁾ and thereby limiting osteoclastogenesis.⁽⁴⁾ RANKL is broadly expressed not only in

Received in original form July 9, 2013; revised form September 10, 2013; accepted September 30, 2013. Accepted manuscript online October 11, 2013.

Address correspondence to: Eleni Douni, PhD, Laboratory of Genetics, Department of Biotechnology, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens 11855, Greece. E-mail: douni@aua.gr

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

The first two authors as well as the second two authors contributed equally to this work.

Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 29, No. 5, May 2014, pp 1158–1169

DOI: 10.1002/jbmr.2112

© 2014 American Society for Bone and Mineral Research

bone cells including osteoblasts, osteocytes, and hyperplastic chondrocytes but also in a wide variety of tissues and specific cells such as spleen, heart, lung, brain, thymus, T and B lymphocytes, or mammary epithelia cells.^(8,9) This expression pattern is consistent with the pleiotropic effects of RANKL in diverse tissues including lymphoid tissue organization, mammary gland development during pregnancy, hormone-driven mammary cancer, cancer metastasis, and thermoregulation.⁽¹⁰⁾

Genetic defects impairing the function of RANKL or RANK both in mice and humans result in severe autosomal recessive osteopetrosis (ARO)⁽¹¹⁾ owing to impaired osteoclast formation, demonstrating that RANKL and RANK are indispensable for osteoclastogenesis. On the other hand, when RANKL overwhelms the effects of OPG, as occurs in OPG-deficient mice⁽¹²⁾ and in postmenopausal osteoporosis,⁽¹³⁾ the imbalance in the bone remodeling process results in bone loss and early-onset osteoporosis. In addition, estrogen or androgen deficiency in humans and rodents leads to increased RANKL expression that is possibly associated with increased bone loss and risk of fractures,^(13,14) providing a rationale for the development of RANKL-targeted therapies. Indeed, clinical trials with denosumab, a fully human IgG2 monoclonal antibody that specifically binds human RANKL (huRANKL) with high affinity, showed an increased bone mass and reduced incidence of fractures in postmenopausal women with osteoporosis⁽¹⁵⁾ and in prostate cancer patients receiving androgen-deprivation therapy.⁽¹⁶⁾ This antibody was recently approved for the treatment of postmenopausal women with osteoporosis and patients developing cancer-related bone loss. However, preclinical studies assessing the efficacy and safety of novel huRANKL inhibitors have been restricted so far to limited animal models expressing either nonhuman primate RANKL⁽¹⁷⁾ or chimeric murine/human RANKL.⁽¹⁸⁾ Importantly, the ability of human RANKL to potently activate murine RANK suggested to us that the creation of human RANKL transgenic mice could provide a useful model for studying high-turnover bone disease and other RANKL-induced pathologies without the need for frequent injections of recombinant human RANKL.⁽¹⁸⁾ In addition, controlled expression of huRANKL in transgenic mice is necessary because constitutive overexpression of soluble RANKL from early development is lethal at the late fetal stage.⁽¹⁹⁾

This initial report provides an extensive characterization of several transgenic mouse lines (TghuRANKL) that overexpress to varying degrees human RANKL in tissues that normally express this cytokine. TghuRANKL mice of both sexes developed early-onset osteoporosis and the severity of the osteoporotic phenotype was directly related to the levels of RANKL expression. Skeletal phenotypes of these mice mimicked moderate to severe human osteoporosis including trabecular bone loss, cortical porosity, and increased bone fragility, which was successfully reversed upon denosumab treatment. These mice represent the first genetic rodent models of osteoporosis involving overexpression of huRANKL, which can be used to facilitate the understanding of RANKL-induced pathologies such as osteoporosis, while also permitting the preclinical evaluation of denosumab and potentially other novel huRANKL inhibitors.

Materials and Methods

Mouse husbandry

Osteopetrotic *Rankl*^{fl^{es}/fl^{es}} mice, which bear a loss-of-function *Rankl* mutation, were previously described.⁽²⁰⁾ These and other mice were maintained and bred under specific pathogen-free

conditions in the animal facility of BSRC "Alexander Fleming". All animal procedures were approved and carried out in strict accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee and the Region of Attica Veterinarian Office.

Generation and genotyping of RANKL transgenic mice

For the generation of huRANKL transgenic mice, a Not I fragment of 200 kb containing the huRANKL gene was isolated from a human genomic BAC clone (RP11-86N24, ImaGenes GmbH, Berlin, Germany) with pulse field gel electrophoresis. The excised band was subsequently run in 4% low melting agarose gel and isolated with β -agarase (New England Biolabs, Hitchin, UK) digestion. After dialysis in microinjection buffer, the transgene was microinjected into the pronuclei of fertilized (C57BL/6J \times CBA/J)F2 oocytes, as described elsewhere.⁽²¹⁾ To identify transgenic founder mice by Southern blot, DNA was isolated from tail biopsies, digested with BamHI, and hybridized with the microinjected fragment. Founder transgenic mice were bred with C57BL/6J mice to establish the various transgenic lines. TgRANKL progeny were genotyped by PCR (5'TCTTCAACTAATGGTGTACG; 5'TCTACAAGGTCAAGAGCATG).

Transgenic copy number

Copy number of the transgene was determined by quantitative real-time PCR (qPCR) using tail DNA from the TghuRANKL mice and wild-type (WT) littermates ($n = 8-9$). qPCR was performed using SsoFast EVA Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) on a Rotor-Gene 6000 RT-PCR machine (Corbett Life Science, Sydney, Australia). A common pair of primers complementary to both human and mouse RANKL gene sequences was used to amplify both genes (5'ACCTGTACGCCAACATTTC; 5'CTGGGATTTGATGCTGGT). For each sample, the Ct value of RANKL was normalized against the mouse HuR gene (5'AGGACACAGCTTGGGCTACG; 5'CGTTCAGTGTGCTGATTGCT) and the values of both RANKL and HuR genes were extrapolated from their respective standard curves.

Quantitative expression analysis

Total RNA was extracted from various tissues using a monophasic solution of guanidine isothiocyanate and phenol according to the manufacturer's instructions (TRI Reagent, MRC, Cincinnati, OH, USA). After removal of DNA remnants with DNase I treatment (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), first-strand cDNA was synthesized using 2 μ g of total RNA and M-MLV (Sigma-Aldrich), whereas qPCR was performed at 55°C for 35 cycles. Specific primer pairs were used for the quantitative expression analysis of human RANKL (5'ACGCGTATTTACAGCCAGTG; 5'CCCCTAATGCTCCAATCTG), mouse RANKL (5'TGTACTTTCGAGCGCAGATG; 5'AGGCTTGTTCATCCTCCTG), and mouse OPG (5'CTTGCCCTTGATGGAGAGCCT; 5'TCGCTCGATTGCGAGTCT). The same primer pair used for RANKL copy number detection was also used for detecting both mouse and human RANKL expression. The samples were normalized to β 2-microglobulin expression (5'TTCTGGTGCTGTCTCACTGA; 5'CAGTATGTTCCGGCTCCCATTC). Relative expression was calculated as the fold difference compared with control values using Bio-Rad RelQuant. For each experiment, two technical and three biological replicas were used.

Histopathological analysis

Femurs and tibias were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 6 hours, decalcified in 13% EDTA, and embedded in paraffin.

Sections of 5- μ m thickness were stained with hematoxylin/eosin. Osteoclasts were stained for TRAP activity using a leukocyte acid phosphatase (TRAP) kit (Sigma-Aldrich). Nondecalcified bones were embedded in methyl methacrylate, and stained for Von Kossa to visualize mineralized bone. For assessment of bone formation, mice were injected with 100 μ L calcein (5 mg/mL), 6 and 2 days before euthanization, and undecalcified bones were embedded in methyl methacrylate according to standard double-labeling protocols.⁽²²⁾ Ectopic calcification in soft tissues was detected after staining with 2% Alizarin Red S (Applichem, Gatersleben, Germany).

Serum bone markers

Serum levels of mouse tartrate-resistant acid phosphatase form 5b (TRACP-5b), an osteoclast activity marker, was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer's instructions (Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK). The levels of soluble human RANKL were quantified using a human RANKL Single-Plex assay kit (Millipore/Linco, St. Charles, MO, USA) with detection limit of the assay at 4.88 pg/mL.

Biochemical markers and blood analysis

Serum clinical chemistry tests (performed by Microanalysis SA, Athens, Greece), including glucose, urea, total cholesterol, creatinine, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), phosphorus, calcium, and ionized calcium were measured using a multichannel auto analyzer (Architect c8000, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA). Blood samples, obtained by heart puncture, were collected in EDTA-coated tubes and blood analysis was performed (by Microanalysis SA) using full automatic blood cell counter Model PCE 210 N (ERMA INC., Tokyo, Japan).

Micro-CT

Bones (femur and tibia) were fixed in PBS plus 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at 4°C and then washed and stored in 70% ethanol. Three-dimensional microarchitecture of the distal femur from 4-week-old or 3-month-old WT and transgenic mice was evaluated using a high-resolution SkyScan1076 microtomographic imaging system (SkyScan, Kontich, Belgium). Images were acquired at 48 KeV, 200 mA with a 0.5-mm aluminum filter. Three-dimensional reconstructions (8.8 mm cubic resolution) were generated using NRecon software (SkyScan) as previously described.⁽²³⁾ For the trabecular bone regions, we assessed the bone volume fraction (BV/TV, %), trabecular number (Tb.N, mm^{-1}), trabecular separation (Tb.S, mm), and the connectivity density (Con. Dens., mm^{-3}). Femoral cortical geometry was assessed in micro-computed tomography (micro-CT UCT40, Scanco Medical AG, Basserdorf, Switzerland) using 50 continuous CT slides (600 μ m) located at the femoral midshaft as previously described.⁽²⁴⁾ For cortical bone, we measured the bone volume fraction (BV/TV), cortical tissue volume (Ct.TV, mm^3), bone volume (Ct.BV, mm^3), marrow volume (BMV, mm^3), and the average cortical width (Ct.Th, mm).

Biomechanical test

The femur was placed in the material-testing machine on two supports separated by the distance of 9.9 mm and load was applied to the middle of the shaft, thus creating a three-point bending test. The mechanical resistance to failure was tested using a servo-controlled electromechanical system (Instron 1114,

Instron Corp., High Wycombe, UK) with actuator displaced at 2 mm/min. Both displacement and load were recorded. Ultimate force (maximal load, measured in Newtons), stiffness (slope of the linear part of the curve, representing the elastic deformation, N/mm), and elastic and plastic energy (area under the curve, up to and beyond the yield point, respectively; N/mm) were calculated from the load-displacement curves.

Denosumab treatment

Denosumab at the dose of 10 mg/kg was administered subcutaneously in the medium-copy Tg5519 mice ($n = 14$, 7 females and 7 males) twice per week from the 4th week of age for a period of 6 weeks. Saline was administered in control experimental groups consisting of Tg5519 and WT littermates ($n = 14$, 7 females and 7 males per group). Body weight was recorded weekly for each mouse. At 10 weeks of age, all mice were euthanized and the long bones were collected for blinded histopathological analysis. In addition, blood was collected to assess serum TRACP-5b levels (murine ELISA, Immunodiagnostic Systems).

Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm standard error (SE). Student's *t* test was performed to compare means between two groups, and one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare means of multiple groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant; * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ when not otherwise specified.

Results

Generation, identification, and expression analysis in TghuRANKL mice

To achieve a correct spatial pattern of huRANKL expression in mice, a 200-kb genomic fragment containing the whole human *RANKL* gene isolated from a BAC clone was used for transgenesis (Supplemental Fig. S1A). No gene other than *RANKL* is encoded within the microinjected fragment. Four transgenic founders, Tg5516, Tg5519, Tg5520, and Tg5521, carrying the huRANKL gene (TghuRANKL) were generated with pronuclear injections as shown by Southern blot analysis after genomic digest with BamHI and hybridization with the microinjected fragment (Fig. 1A). The Tg5521 line was not further studied because the founder was mosaic for the transgene and produced a limited number of transgenic mice. The transgene copy number was calculated in the remaining three transgenic lines using a common primer pair amplifying both mouse and human genomic sequences in qPCR (Fig. 1B). The low copy Tg5516 line (1 extra copy), the medium copy Tg5519 line (10 extra copies), and the high copy Tg5520 line (27 extra copies) were further characterized. From these lines, Tg5516 and Tg5519 transmitted the transgene to offspring, whereas the Tg5520 male founder did not produce any progeny. Therefore, more extensive expression and phenotypic analysis was performed in transgenic lines Tg5516 and Tg5519.

Comparative analysis of the levels of huRANKL expression in various tissues including bone, brain, spleen, thymus, kidney, lung, heart, and liver revealed that the medium copy Tg5519 line expressed huRANKL at significantly higher levels relative to the low copy Tg5516 line (Fig. 1C). More specifically, Tg5519 mice overexpressed huRANKL in all tissues studied, with higher levels in bone, brain, spleen, and kidney. Notably, in both TghuRANKL

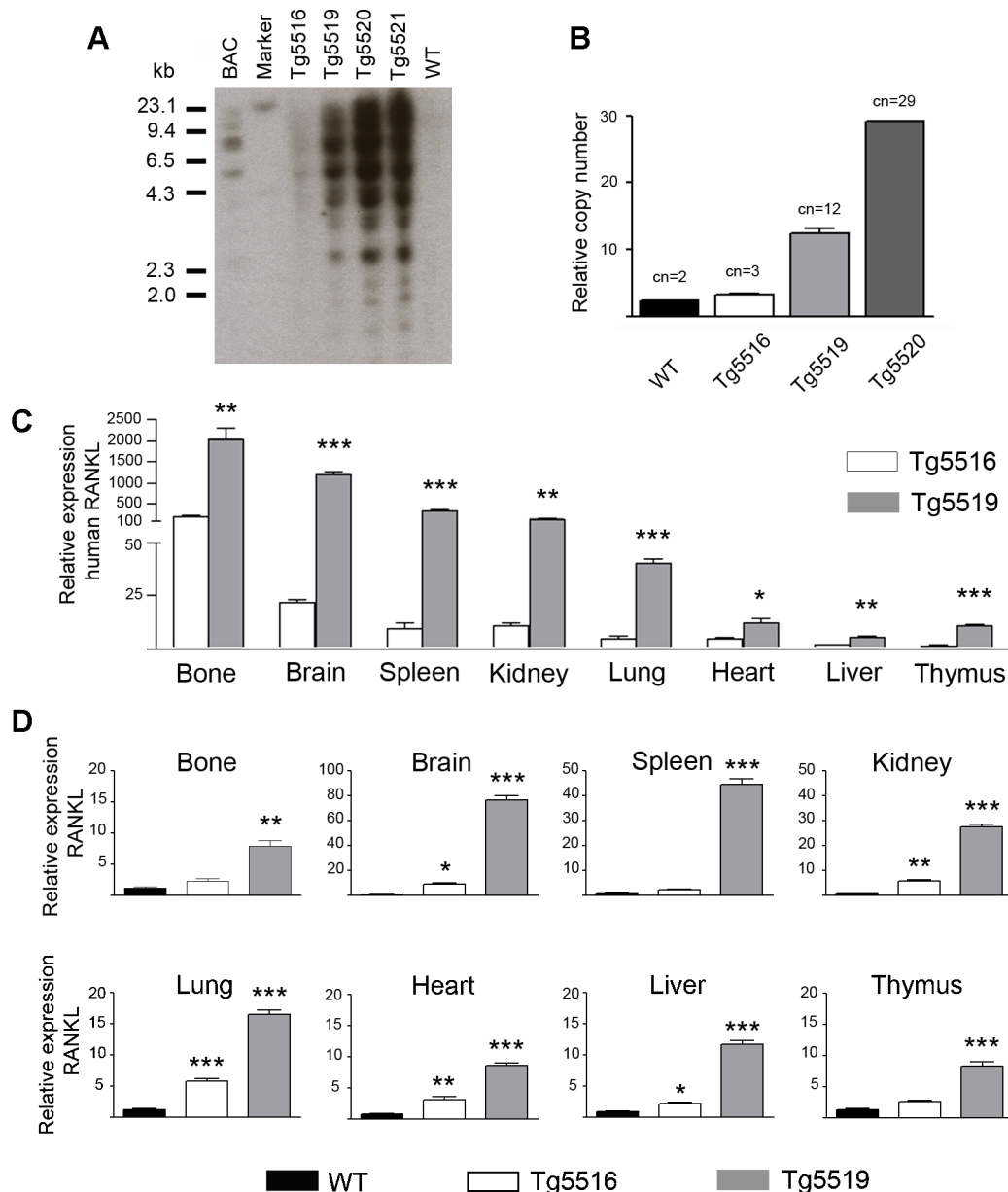


Fig. 1. Generation of huRANKL transgenic mice and comparative expression analysis. (A) Southern blot analysis on genomic DNA isolated from TghuRANKL founder and WT control mice. BAC digest was used as a positive control, whereas known molecular weights are indicated in kilobases (kb). (B) Copy number (cn) of the integrated transgenes and the endogenous mouse RANKL in WT, Tg5516, and Tg5519 mice ($n = 8-9$ per group) as well as in the Tg5520 founder. Comparative analysis of the expression levels of huRANKL (C) as well as of both human and mouse RANKL (D) in various tissues from Tg5516, Tg5519, and WT mice by qPCR ($n = 3$ per group). The expression levels of RANKL in transgenic tissues were statistically compared with endogenous RANKL levels in WT mice (D). Relative fold change of RANKL mRNA expression was normalized against $\beta 2$ -microglobulin mRNA. Mean \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

lines the levels of huRANKL were dramatically increased in bone tissue, isolated from femurs and tibias after removal of bone marrow cells, in accordance with recent studies showing that osteocytes, former osteoblasts trapped in the bone matrix, are the major source of RANKL production.⁽²⁵⁾ Importantly from a pathophysiology perspective, the pattern of huRANKL expression in various tissues from both transgenic lines closely followed the pattern of endogenous RANKL expression seen in WT mice (Supplemental Fig. S1B). To enable comparison of the levels of

the huRANKL transgene in various tissues of TghuRANKL mice with those of the endogenous mouse RANKL in WT mice, a common primer pair recognizing both mouse and human RANKL cDNA was used in qPCR. Such relative expression analysis showed that the low copy Tg5516 line expressed RANKL at significantly higher levels compared with WT mice but much lower in comparison to the medium copy Tg5519 line (Fig. 1D), confirming our previous results based on huRANKL expression (Fig. 1C).

To investigate whether the increased levels of huRANKL expression in transgenic mice influenced expression at the levels of endogenous mouse RANKL, we performed a similar analysis in tissues overexpressing huRANKL such as bone and spleen (Supplemental Fig. S1C) using a primer pair that specifically amplifies mouse RANKL cDNA. Our results showed that the levels of mouse RANKL expression in such tissues were comparable between TghuRANKL and WT control mice, indicating that the overexpression of huRANKL and the subsequent pathology had no effect in enhancing or suppressing endogenous mouse RANKL mRNA expression. Moreover, increased levels of endogenous OPG expression were detected in bone tissues from Tg5519 mice compared with Tg5516 and WT control mice, probably as a result of a negative feedback mechanism in response to huRANKL overexpression (Supplemental Fig. S1D). The high copy Tg5520 founder also overexpressed huRANKL at all tissues studied (data not shown). At the protein level, the serum levels of soluble huRANKL protein were dramatically increased in the Tg5519 line (1065 pg/mL \pm 151, n = 11) and the Tg5520 founder (1003 pg/mL) compared with Tg5516 mice (6.27 pg/mL \pm 0.84, n = 7) and WT control mice (undetectable, n = 11).

Low huRANKL-expressing Tg5516 mice develop trabecular bone loss

The low copy number Tg5516 mice were indistinguishable in appearance and average weight from WT littermates. Similarly, no hematological or biochemical abnormalities were observed in Tg5516 mice (Supplemental Tables S1 and S2). Histopathological and quantitative micro-CT analysis of the metaphyseal region of distal femurs in Tg5516 mice showed trabecular bone loss that was subtle at 4 weeks of age (Supplemental Fig. S2A, B) and pronounced at 2 (Supplemental Fig. S2A) and 3 months of age (Supplemental Fig. S2A, Fig. 2A) in both males and females. Trabecular bone volume fraction (BV/TV) was reduced nearly 2.5-fold, and trabecular number (Tb.N) was reduced more than 50% in 3-month-old Tg5516 mice compared with WT controls (Fig. 2A). Furthermore, Tg5516 mice had significantly wider trabecular separation (245%) than WT mice, whereas the connectivity density was decreased by sixfold. In contrast, the mid-diaphysis cortical bone volume (Ct.BV) and thickness (Ct.Th) were similar in Tg5516 mice and WT controls as assessed by micro-CT analysis (Fig. 2B, C). Notably, mid-diaphysis femurs from 3-month-old Tg5516 mice had reduced biomechanical

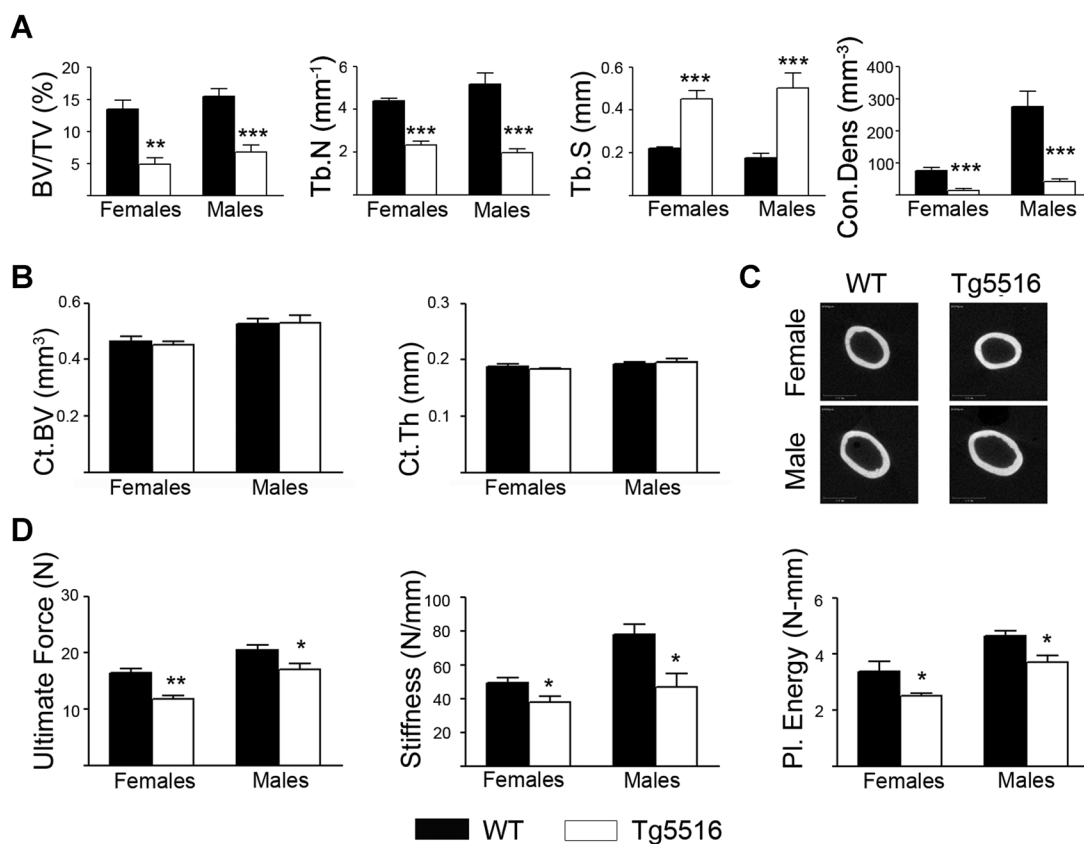


Fig. 2. Low-expressing Tg5516 mice developed trabecular bone loss and increased bone fragility. (A) Quantitative analysis of the trabecular bone in the metaphyseal region of the distal femurs in 3-month-old (n = 5–6 per sex) Tg5516 and WT female and male littermates with micro-CT. BV/TV (bone volume/total volume, %), Tb.N (trabecular number per mm), Tb.S (trabecular separation, mm), Con.Dens. (connectivity density, mm⁻³). (B) Quantitative analysis of midshaft cortical bone in femurs from 3-month-old Tg5516 and WT control females and males with micro-CT (n = 5 per sex). Ct.BV (cortical bone volume, mm³), Ct.Th (cortical thickness, mm). (C) Representative micro-CT 3D cortical reconstructions of mid-diaphysis cortical bone in femurs from Tg5516 and WT mice. (D) Changes in the biomechanical parameters of the femurs from 3-month-old Tg5516 and WT control mice (n = 5 per sex). Ultimate force (N); stiffness (N/mm); plastic energy (N-mm). Mean \pm SE; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

properties such as ultimate force (–22%), stiffness (–34%), and plastic energy (–23%) as assessed by three-point bending tests (Fig. 2D). Biochemical markers of bone turnover such as TRACP-5b were normal as well as serum alkaline phosphatase levels (Supplemental Table S2). These results demonstrate that the low huRANKL-expressing Tg5516 mice develop a mild osteoporotic phenotype characterized by trabecular bone loss and decreased bone strength in both males and females by the third month of age.

Tg5519 mice overexpressing huRANKL develop severe osteoporosis

Overexpression of huRANKL in Tg5519 mice led to severe bone loss that was already established from the first month of age in both males and females. Histologically, the metaphyseal regions of the distal femur and the proximal tibia were profoundly osteoporotic in the Tg5519 mice, exhibiting an almost complete absence of trabeculae by 3 months of age (Fig. 3A), which precluded quantitative bone measurements through micro-CT analysis. Cartilage abnormalities were also observed through the accumulation of cartilaginous remnants (shown as asterisks) mainly in the epiphysis of 4-week-old (Fig. 3A) and the metaphysis of 3-month-old Tg5519 mice (Fig. 3B), which gradually disappeared. No obvious disorganization of the growth plate of 1- or 2-month-old Tg5519 mice was observed and the thickness of the various zones appeared similar to WT littermates. However, cellular density in the resting/proliferation zones appeared increased along with proliferation of the cartilaginous remnants in the epiphysis subjacent to the growth plate. Interestingly, Tg5519 mice displayed a progressive growth plate loss, already evident at 3 months of age, which almost disappeared by the age of 10 months (Fig. 3A). Growth retardation was not noticed in Tg5519 mice, even though the femoral length was modestly decreased in 3-month-old Tg5519 mice compared with WT controls (Supplemental Fig. S3). Staining of femurs with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), an enzyme that is highly expressed in osteoclasts, revealed increased number of giant osteoclasts in 3-month-old Tg5519 mice both at epiphysis (Fig. 3B) as well as the mid-diaphysis cortical region (Fig. 3C).

The skeletal phenotype of the Tg5519 line was also pronounced in cortical bone. Histopathological analysis of cortical bone at the mid-diaphysis showed that Tg5519 mice had severe intracortical porosity when compared with WT littermates at 3 months of age (Fig. 3C). Von Kossa staining of undecalcified femur sections confirmed the presence of intracortical pores (Fig. 3D). Moreover, abundant fluorochrome incorporation, an index of intracortical (endosteal) bone formation, was identified in cortical bone of Tg5519 femoral diaphysis using the calcein double-labeling technique (Fig. 3E), suggesting the presence of woven bone. In addition, abundant osteoclasts were present within the cortical bone area of Tg5519 mice as opposed to WT cortical bones (Fig. 3C), indicating increased cortical bone remodeling. To confirm the presence of increased bone turnover in Tg5519 mice, we further evaluated the levels of serum biomarkers. The levels of serum alkaline phosphatase (ALP), a marker of bone formation activity, was 2.5-fold increased in 4-week-old Tg5519 mice and nearly 10-fold in 3-month-old Tg5519 mice in comparison to WT control mice (Supplemental Fig. S4A), reflecting disease severity. As expected, the serum levels of TRACP-5b were also dramatically increased in 3-month-old Tg5519 mice compared with WT control mice

(31.34 ± 1.2 versus 8.74 ± 0.6), indicating active bone resorption (Supplemental Fig. S4B).

Cortical bone loss and cortical porosity increased progressively throughout life (Supplemental Fig. S5A). Micro-CT analysis of cortical bone at the mid-diaphysis confirmed the presence of intracortical porosity in 3-month-old Tg5519 mice (Fig. 4A). Tg5519 mice ($n = 11$) exhibited a significant decrease in cortical bone volume (Ct.BV, –26%), cortical bone volume fraction (BV/TV, –38%), and cortical thickness (–48%) compared with WT control mice (Fig. 4B). Interestingly, femurs of Tg5519 mice (Fig. 4A, B) display a significant increase in the bone marrow volume (BMV, +67%) and the cortical total volume (Ct.TV, +26%) relative to WT littermates, indicating an increase in the bone width compared with WT mice. As expected, mid-diaphysis femurs from 3-month-old Tg5519 mice ($n = 10$) displayed significant reduced biomechanical properties such as ultimate force (–58%), stiffness (–70%), and plastic energy (–45%) relative to WT littermates as assessed by three-point bending tests (Fig. 4C).

To investigate the disease status at an earlier time point, we assessed both the metaphyseal trabecular region of distal femurs and the cortical bone parameters in 4-week-old Tg5519 mice through micro-CT. Our results showed that by the 4th week of age there was already substantial trabecular bone loss (Supplemental Fig. S5B). Moreover, the extent of cortical porosity was quantified in two different cortical regions, near growth plate (Supplemental Fig. S5C) and at mid-diaphysis (Supplemental Fig. S5D), showing more increased cortical porosity near growth plate. Because mid-diaphysis is already severely affected at the age of 3 months (Fig. 4B), it appears that during disease progression the cortical porosity was extended from metaphysis toward diaphysis. Moreover, the cortical bone was mainly characterized by open porosity (Supplemental Fig. S5C, D) implying a direct interaction with the bone marrow cells that probably contributed to the recruitment and maturation of osteoclast precursors. Collectively, these results indicate that huRANKL overexpression resulted in increased bone remodeling and “trabecularization” of the cortical bone.

Apart from the severe bone phenotype, histological analysis also revealed progressively increased adipocyte numbers in bone marrow of Tg5519 mice apparent from the third month of age (Fig. 3A, Supplemental Fig. S5A). Increased marrow adiposity was inversely correlated with bone marrow cellularity in Tg5519 mice from the 6th month of age (data not shown). Despite the severe bone phenotype, the Tg5519 mice appeared normal and no clinical chemistry abnormalities (Supplemental Table S2) other than elevated alkaline phosphatase levels were observed. Similarly to Tg5516 mice, no hematological abnormalities (Supplemental Table S1) were observed in Tg5519 mice. In addition, no gross histopathological lesions were detected in Tg5519 mice with the exception of few scattered peribronchial inflammatory foci observed in the lungs of 3-month-old Tg5519 mice (Supplemental Fig. S6). Soft tissue calcification was not observed in Tg5519 mice (data not shown).

Severe osteoporosis and soft tissue calcification in the high copy Tg5520 founder

The high copy Tg5520 founder (Fig. 1B) overexpressing huRANKL exhibited progressive kyphosis indicating severe osteoporosis and never gave progenies probably because of the severe skeletal phenotype. At 8 months of age, the Tg5520 founder was euthanized and the tissues were assessed histologically. Histological examination of the metaphyseal distal femurs

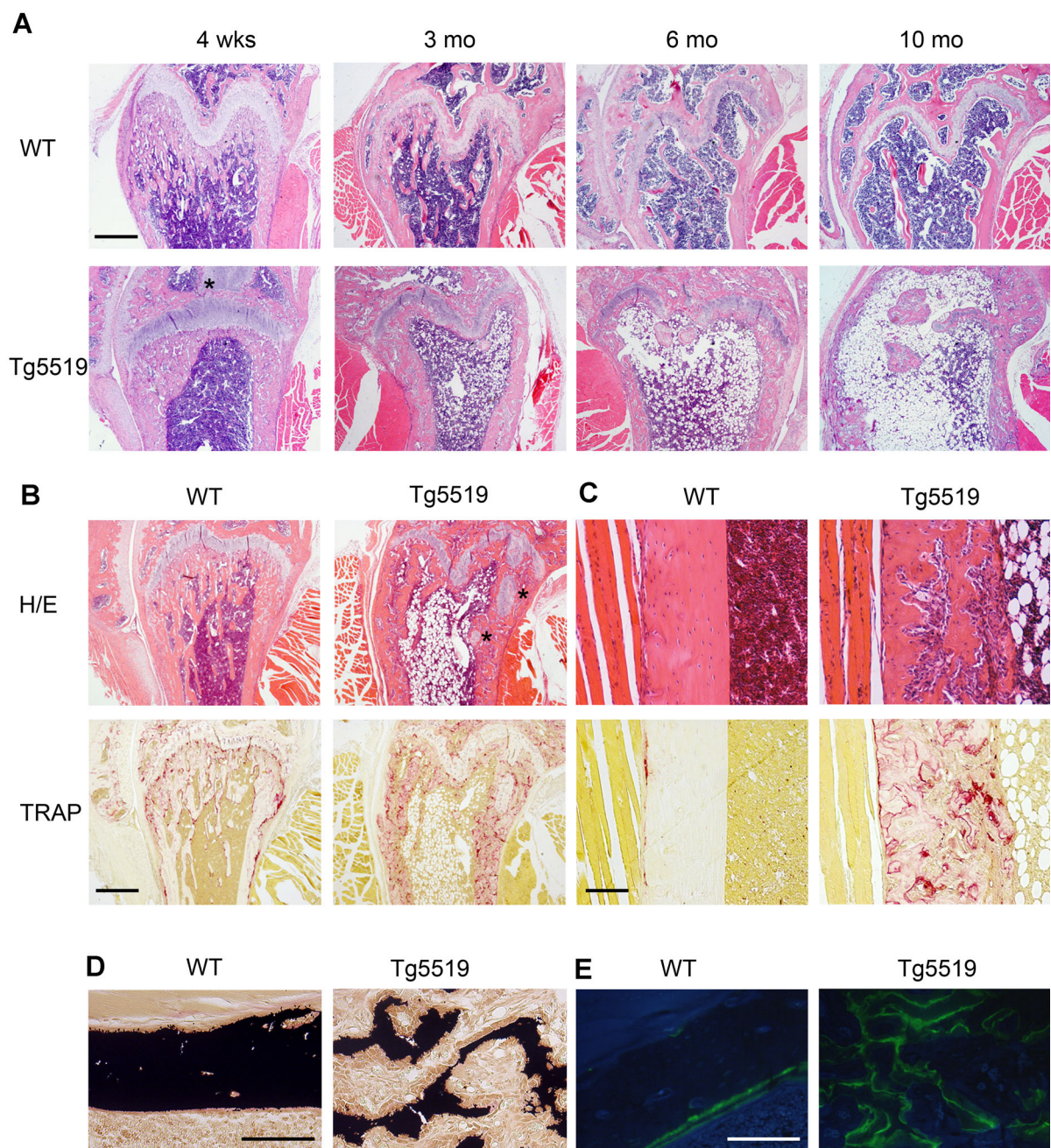


Fig. 3. Tg5519 mice overexpressing huRANKL developed trabecular bone loss, growth plate loss, marrow adiposity, increased osteoclastogenesis, intracortical porosity, and increased cortical bone remodeling. (A) Representative sections of metaphyseal distal femurs from 4-week-, 3-month-, 6-month-, and 10-month-old Tg5519 mice and WT littermates, stained with hematoxylin/eosin (H/E) ($n = 6$). Scale bar = 500 μm . (B) Representative serial sections of distal femurs from 3-month-old Tg5519 and WT controls stained with H/E and TRAP ($n = 6$). Scale bar = 500 μm . (C) Cortical bone porosity with increased osteoclastogenesis in 3-month-old Tg5519 mice. Representative serial sections of mid-diaphysis cortical bone stained with H/E and TRAP ($n = 6$). Scale bar = 100 μm . (D) Von Kossa staining of cortical bone and (E) double calcein labeling in 3-month-old Tg5519 and WT mice. Asterisks indicate cartilage remnants in Tg5519 mice (A, B). Scale bar = 100 μm .

revealed absence of trabecular bone, growth plate loss, and bone fractures (Fig. 5A). Tg5520 founder also developed intracortical porosity, giant osteoclasts inside the cortical area (Fig. 5B), and increased marrow adiposity (Fig. 5A, B) similarly to Tg5519 mice. Interestingly, ectopic calcification was observed in soft tissues

like kidney (Fig. 5C), heart (Fig. 5D), lung (Fig. 5E), and tongue (Fig. 5F) of the Tg5520 founder compared with WT control (Supplemental Fig. S7), as revealed by staining with hematoxylin/eosin and Alizarin red, which specifically stains calcium phosphate deposits.

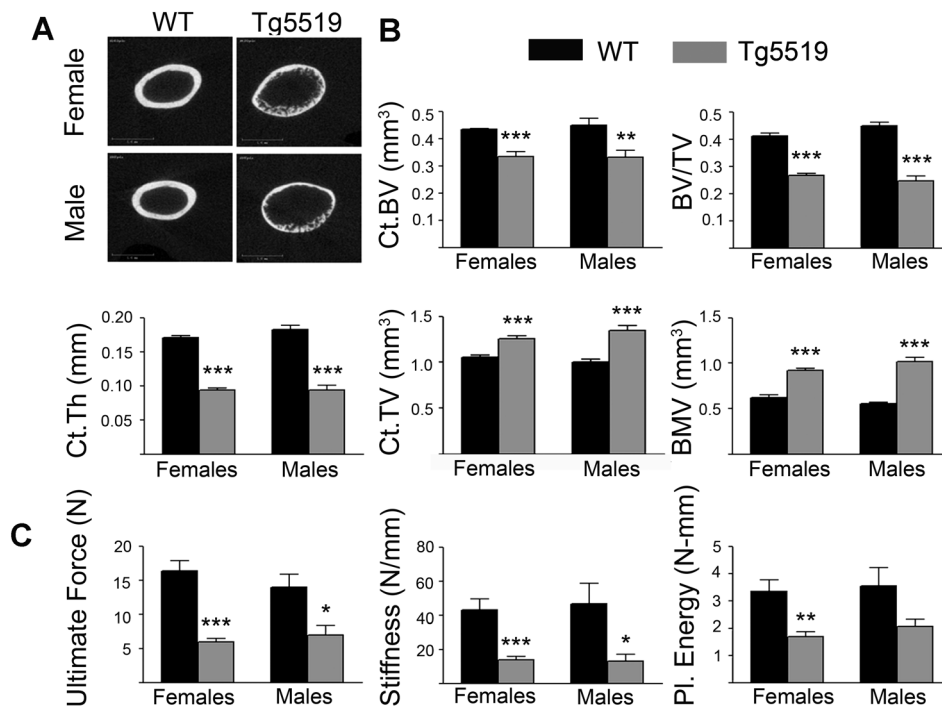


Fig. 4. Tg5519 mice developed cortical porosity and increased bone fragility. (A) Representative micro-CT 3D cortical reconstructions and (B) quantitative analysis of mid-diaphysis cortical bone in femurs from 3-month-old Tg5519 and WT mice with micro-CT ($n = 6$ for females and $n = 5$ for males). Ct.BV (cortical bone volume, mm³), BV/TV (bone volume/total volume), Ct.Th (cortical thickness, mm), Ct.TV (cortical total volume/mm³), BMV (bone marrow volume/mm³). (C) Altered biomechanical parameters of the femurs from 3-month-old Tg5519 and WT mice. Ultimate force (N); stiffness (N/mm); plastic energy (N-mm) ($n = 6$ for females and $n = 4$ for males). Mean \pm SE; * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Transgenic rescue of RANKL-mediated osteopetrosis

Subsequently, we investigated whether the huRANKL transgene was sufficient to rescue RANKL-mediated osteopetrosis. In the past, we identified a recessive loss-of-function *Rankl* allele in *Rankl*^{tlcs/tlcs} mice, causing severe osteopetrosis, failure of tooth eruption, defective lymph node organogenesis, and premature lethality similarly to *Rankl*-deficient mice.⁽²⁰⁾ Introduction of a low copy huRANKL transgene into the *Rankl*^{tlcs/tlcs} genome through crossings with the Tg5516 line fully restored survival (not shown), body weight gain, and eruption of the lower incisors, although eruption of upper incisors was partial (Supplemental Fig. S8A, B). Moreover, the osteopetrotic phenotype was rescued as shown by the presence of fully expanded bone marrow cavities in the long bones of Tg5516/*Rankl*^{tlcs/tlcs} mice (Supplemental Fig. S8C). However, the partial rescue of the tooth eruption (Supplemental Fig. S8B) as well as failure of lymph node organogenesis (Supplemental Fig. S8D) noticed in Tg5516/*Rankl*^{tlcs/tlcs} mice indicate that the low copy huRANKL transgene did not completely rescue the phenotype caused by a loss-of-function mouse *Rankl* allele. In contrast, a medium copy huRANKL transgene in Tg5519/*Rankl*^{tlcs/tlcs} mice rescued the clinical signs (Supplemental Fig. S8A) and the osteopetrotic phenotype (Supplemental Fig. S8C) of the *Rankl*^{tlcs/tlcs} mice, including restoration of tooth eruption (Supplemental Fig. S8B) and mesenteric lymph nodes organogenesis (Supplemental Fig. S8D). Collectively, these results indicate that the levels and pattern of huRANKL expression in transgenic lines are adequate for the restoration of the osteopetrotic phenotype. Moreover, our

data show that the huRANKL transgene is fully active in mice, implying full activation of the mouse RANK receptor.

Denosumab treatment inhibits bone resorption in Tg5519 mice

We further investigated whether the severe osteoporotic phenotype developed in Tg5519 mice could be suppressed and restored by denosumab, a human monoclonal antibody against human RANKL. Denosumab, at 10 mg/kg, was administered subcutaneously in Tg5519 mice ($n = 14$) for a period of 6 weeks starting from the 4th week of age where bone resorption was already established both at the trabecular and the cortical areas. Saline-treated WT and Tg5519 littermates were included to assess physiological bone structure and disease progression during the treatment period, respectively. Histological analysis of distal femurs from saline-treated Tg5519 mice showed remarkable trabecular bone loss at 10 weeks of age, whereas treatment with denosumab resulted in preservation of trabecular bone in the metaphyses of Tg5519 mice (Fig. 6A). Moreover, the cortical porosity and the increased intracortical osteoclastogenesis developed in Tg5519 littermates were completely suppressed upon denosumab treatment (Fig. 6B). Denosumab treatment also fully reversed the increased serum levels of TRACP-5b in Tg5519 mice back to the levels of WT littermates (Fig. 6C). Overall, these results demonstrate that the specific inhibition of human RANKL by denosumab treatment substantially reversed the severe osteoporotic phenotype of Tg5519 mice.

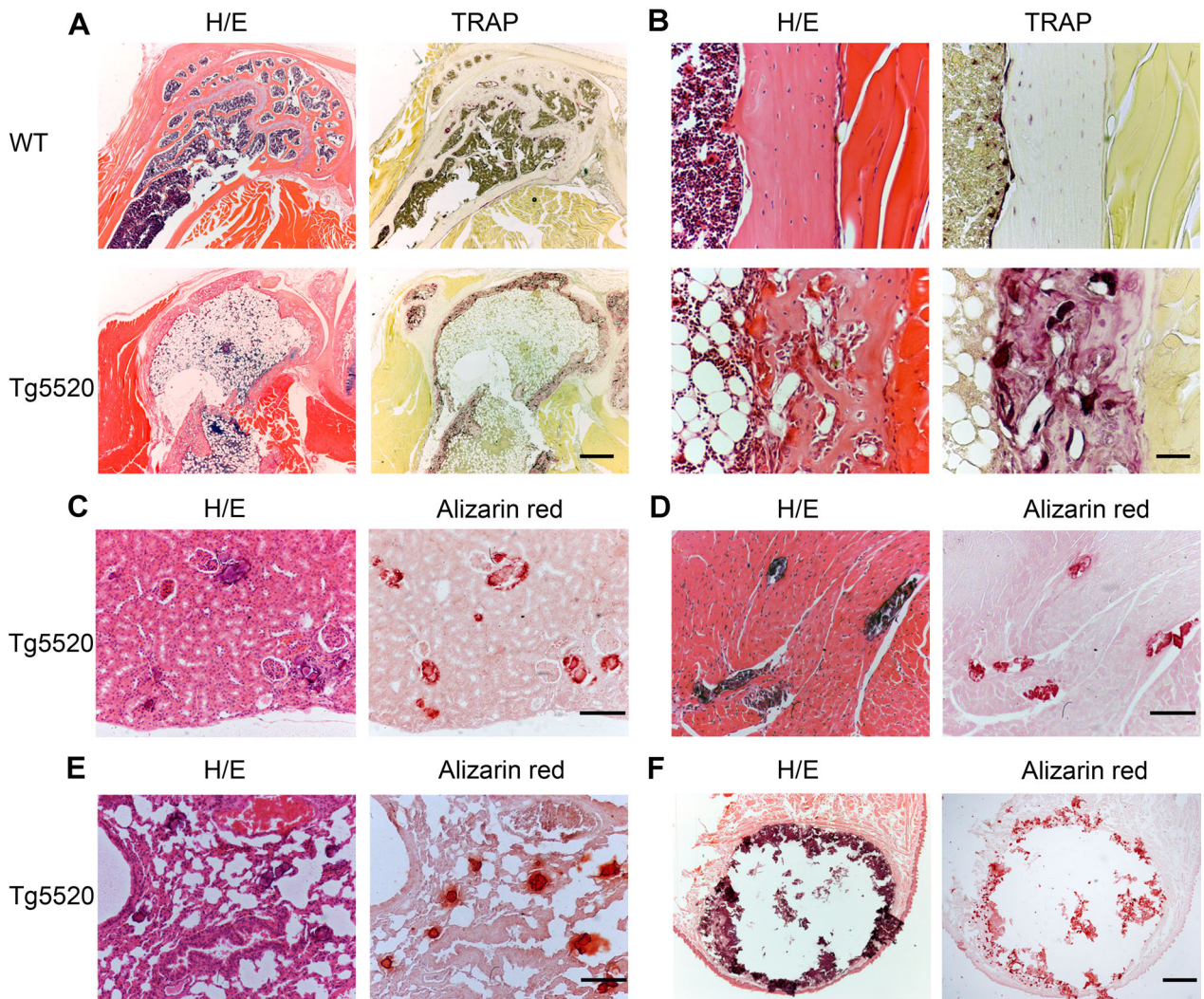


Fig. 5. High copy number Tg5520 founder developed trabecular and growth plate loss, cortical porosity, and soft tissue calcification. (A) Serial sections of metaphyseal distal femurs and (B) mid-diaphysis cortical bone from 8-month-old Tg5520 founder and WT control, stained with hematoxylin/eosin (H/E) and TRAP showed loss of trabecular bone and growth plate, fractures, cortical porosity, and giant osteoclasts. (C) Serial sections of kidney, (D) heart, (E) lung, and (F) tongue from the Tg5520 founder stained with hematoxylin/eosin (H/E) and alizarin red showed ectopic calcification. Scale bars: A, F = 500 μ m; B = 50 μ m; C, D = 100 μ m.

Discussion

In the current study, we report the generation and characterization of novel osteoporosis models by overexpression of huRANKL in transgenic mice carrying the human RANKL genomic locus. The gene structure of RANKL is highly conserved in mammals, consisting of 5 exons that span 33.9 kb in humans and 30.5 kb in mice, whereas RANKL homologues have been identified so far only in organisms that contain osteoclasts, ie, vertebrates. In mammals, the transcription of RANKL is controlled by multiple transcriptional enhancers, some of which reside in long distance, more than 70 kb, upstream from the transcription start site.⁽⁹⁾ To achieve a physiologically relevant expression pattern of RANKL overexpression, a 200-kb genomic region, isolated from a BAC library, spanning the coding region as well as the regulatory sites of the huRANKL gene was used for microinjections into the

pronucleus of fertilized eggs. Large genomic transgenes derived from BAC clones are more likely to provide physiologically relevant expression patterns and copy dependent expression levels, regardless of position effects.⁽²⁶⁾ These effects were also verified in the TghuRANKL lines as the levels of huRANKL expression in various tissues were analogous to the transgene copy number and followed the expression pattern of endogenous mouse RANKL gene. Mice from the low copy Tg5516 line expressed huRANKL in higher levels compared with WT littermates but much lower levels relative to the medium copy Tg5519 line. Previous studies have shown that RANKL is widely expressed in a variety of cell types both in skeletal and extraskeletal tissues.⁽⁸⁾ Our studies showed that mice from both TghuRANKL lines, Tg5516 and Tg5519, overexpressed huRANKL in all tissues shown to express endogenous RANKL in the WT controls. Notably, huRANKL was more highly expressed

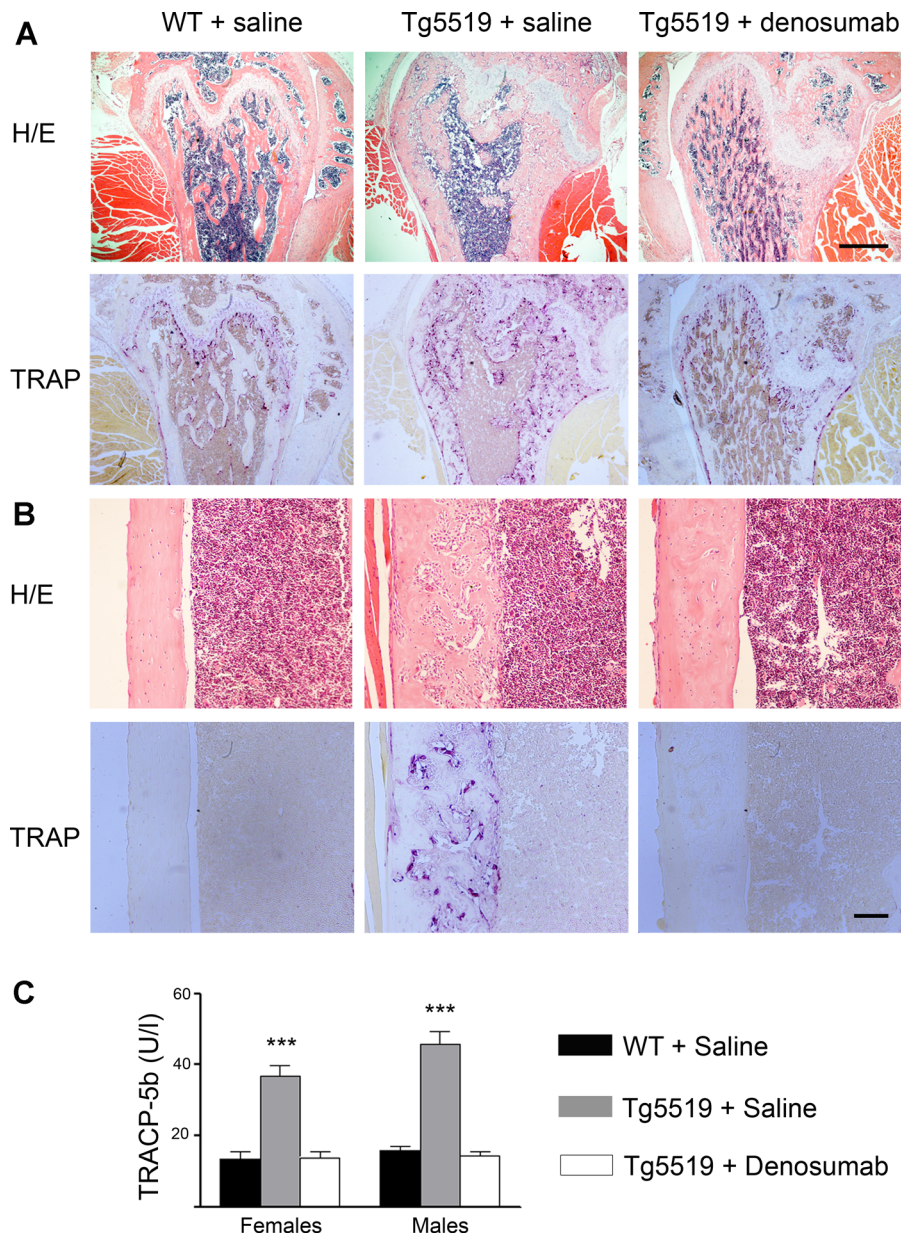


Fig. 6. Therapeutic effects of denosumab in Tg5519 mice. Representative serial sections of metaphyseal distal femur (A) and mid-diaphysis cortical bone (B) stained with hematoxylin/eosin (H/E) and TRAP from Tg5519 mice treated either with saline or denosumab and WT littermates treated with saline ($n = 14$ mice per group). Scale bars: A = 500 μm ; B = 100 μm . (C) Serum TRACP-5b levels in Tg5519 mice treated with denosumab compared with those in saline-treated WT and Tg5519 littermates ($n = 14$ per group). Mean \pm SE; *** $p \leq 0.001$.

in the bone tissue, in accordance with recent genetic studies in mice revealing that osteocytes are the major source of RANKL production,⁽²⁵⁾ stimulating osteoclast formation and remodeling. Further studies assessing the effect of huRANKL overexpression in extraskeletal tissues such as the brain and the immune system in Tg5519 mice could reveal novel pathological implications.

TghuRANKL mice overexpressing human RANKL exhibited an early-onset osteoporotic phenotype in both sexes. Tg5516 mice expressing human RANKL at low levels displayed significant trabecular bone loss already established at the second month of age and reduced biomechanical properties compared with WT controls. In contrast, the cortical bone parameters as well as the serum bone remodeling markers measured were similar

between Tg5516 mice and WT mice, indicating the development of a mild osteoporotic phenotype. On the other hand, greater overexpression of human RANKL in the Tg5519 line resulted in severe osteoporosis characterized by lack of trabecular bones, destruction of the growth plate, and severe cortical bone porosity in the femur accompanied by decreased bone strength compared with WT littermates. Chondrocytes are presumably overexpressing RANKL, and either this source, or other sources, is promoting chondroclasis and growth plate loss that ultimately diminishes longitudinal bone growth. Osteoclast formation at the intracortical surfaces as well as serum markers of bone turnover such as TRACP-5b were progressively increased in Tg5519 mice, indicating active bone resorption. Tg5519 mice

also displayed active bone formation and significantly increased serum alkaline phosphatase levels, which is consistent with increased remodeling activation that leads to osteoblast-mediated refilling of a great number or volume of resorption spaces. Cortical porosity, the result of intracortical bone resorption, was particularly pronounced in the Tg5519 line. In humans, cortical porosity increases during aging and osteoporosis progression⁽²⁷⁾ and is associated with decreased bone strength and may contribute to the increased fracture risk in such patients. Thus, the Tg5519 mice represent a unique animal model for the investigation of the pathogenetic mechanisms in cortical porosity as well as the evaluation of novel therapies through parallel analyses of both trabecular and cortical bone sites.

In addition, Tg5519 mice developed a progressive increase in bone marrow adipocytes. In humans, accelerated marrow adiposity has been associated with aging and osteoporosis.⁽²⁸⁾ Previous studies have shown an inverse association between bone marrow adiposity and bone mineral density,⁽²⁹⁾ since osteoblasts and adipocytes are thought to differentiate from the same mesenchymal stem cells. Adipocyte infiltration into the bone marrow occurs during aging and estrogen deficiency as a result of increased adipogenesis within the bone marrow at the expense of osteoblastogenesis.^(30,31) However, the causal role of increased bone marrow fat in regulating bone density remains ambiguous. The progressive marrow adiposity observed in 3-month-old Tg5519 mice accompanied the increased bone remodeling established already from the 4th week of age. Thus, our study indicates that the increase in marrow adiposity does not precede bone resorption but rather emerges after disease occurrence. The hematopoietic-to-adipogenic transition is certainly another interesting phenotype of the Tg5519 mice, which could be used to gain mechanistic insights into the role of RANKL in this phenomenon.

Tg5519 mice displayed phenotypic similarities with the OPG-deficient mice including early onset of trabecular bone loss, progressive growth plate destruction, cortical porosity, and increased bone remodeling.⁽¹²⁾ In both cases, elevated serum alkaline phosphatase levels and greater quantity of fluorescent label in the cortical bone probably reflect the coupling of bone formation to bone resorption within the basic multicellular remodeling unit. However, compared with the high-expressing Tg5519 mice, OPG-deficient mice exhibited an even more severe skeletal phenotype. OPG-deficient mice also displayed medial calcification of the aorta and renal arteries⁽¹²⁾ that was not apparent in Tg5519 mice. The effect of RANKL in vascular calcification remains somewhat ambiguous because of the opposing results derived from different studies,^(32,33) but RANKL inhibitors including denosumab have been shown to inhibit vascular calcification in several animal models.⁽³⁴⁾ The high copy Tg5520 founder did exhibit extensive calcification in soft tissues like kidney, lung, heart, and tongue, which might be the first evidence that systemic RANKL overexpression can cause soft tissue calcification.

Previous studies attempting to restore RANKL-mediated osteopetrosis through administration of soluble mouse RANKL⁽³⁵⁾ or transgenic expression of mouse RANKL in T and B lymphocytes resulted in partial rescuing.⁽³⁶⁾ Similarly, our results showed partial restoration of the RANKL-mediated osteopetrotic phenotype in the presence of a low copy huRANKL transgene but complete rescue of the skeletal and lymph node organogenesis phenotype upon huRANKL overexpression in Tg5519/*Rankl^{ties/tles}* mice. These results indicate that the levels and pattern of

huRANKL expression in transgenic lines are adequate for the restoration of the osteopetrotic phenotype, and could be further exploited for the development of novel therapeutic approaches that target cell-based local delivery of RANKL in ARO.

Previous preclinical studies assessing the efficacy and safety of denosumab in animal models have been restricted so far to cynomolgus monkeys^(17,37) as well as to knock-in mice expressing a chimeric murine/human RANKL.⁽¹⁸⁾ A significant limitation of those chimeric knock-in mice is that their remodeling rate is lower and their bone mass higher than WT controls, which limits their utility for osteoporosis research. In contrast, the TghuRANKL mice exhibit early-onset osteoporosis secondary to greatly increased remodeling rate. Our results confirmed that inhibition of huRANKL by denosumab in Tg5519-treated mice not only prevented bone loss progression but also fully restored the “osteoporotic” trabecular and cortical bone structure. Further validating the TghuRANKL model, denosumab decreased serum TRACP-5b to the level of WT controls, indicating normal activity of their endogenous RANKL.

Collectively, our TghuRANKL mice constitute the first transgenic models of early-onset osteoporosis attributable to human RANKL overexpression and thus offer a unique system for understanding the pathogenesis of high-turnover bone diseases and for the preclinical evaluation of novel huRANKL inhibitors. In addition, further studies on TghuRANKL mice might reveal novel extraskelatal pathologies associated with RANKL overexpression.

Disclosures

PK, MS, and C-YH are employed by and may own stock or stock options in Amgen, Inc. All other authors state that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank Nikos Karoulias (Amgen Hellas Pharmaceutical E.P.E) for critical discussions and support. We also thank the AniRA facility from SFR Biosciences (UMS3444/US8) for their support and expertise and Dr Rogely Boyce (Amgen, Inc.) for histopathological evaluation of the growth plate structure. This work was funded by the project TheRAlead (09ΣYN-21-784, to ED), which is cofinanced by the European Union (European Regional Development Fund [ERDF]) and Greek national funds through the Operational Program “Competitiveness & Entrepreneurship,” NSRF 2007–2013 in the context of GSRT-National action “Cooperation.” This work was also supported by the Public Benefit Foundation John S. Latsis (grant number 2010–16 to ED), the Initial Training Network (ITN) Osteoimmune (grant 289150 to ED) funded by the EC 7th Framework Program and SNF grant 310030-146294 (to SF). This research has been cofinanced by the European Union (European Social Fund [ESF]) and Greek national funds through the Operational Program “Education and Lifelong Learning” of the National Strategic Reference Framework (NSRF) Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund.

Authors' roles: VR, AN, and ED performed the research. RD and NB performed the micro-CT analysis. NB also performed the biomechanical tests. MS and CYH performed the TRACP-5b in Tg5519-treated mice. PK, PJ, and SF reviewed the intermediate draft. ED designed the study, performed the literature review, prepared the initial and final versions of the paper, and submitted the document.

References

1. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*. 2002;2(4):389–406.
2. Darby AJ. Bone formation and resorption in postmenopausal osteoporosis. *Lancet*. 1981;2(8245):536.
3. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med*. 1998;188(5):997–1001.
4. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann NY Acad Sci*. 2008;1143:123–50.
5. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165–76.
6. Lacey DL, Tan HL, Lu J, et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol*. 2000;157(2):435–48.
7. Luan X, Lu Q, Jiang Y, et al. Crystal structure of human RANKL complexed with its decoy receptor osteoprotegerin. *J Immunol*. 2012;189(1):245–52.
8. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, et al. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskelatal tissues. *Bone*. 1999;25(5):525–34.
9. O'Brien CA. Control of RANKL gene expression. *Bone*. 2010;46(4):911–9.
10. Hanada R, Hanada T, Sigl V, Schramek D, Penninger JM. RANKL/RANK-beyond bones. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89(7):647–56.
11. Lo Iacono N, Pangrazio A, Abinun M, et al. RANKL cytokine: from pioneer of the osteoimmunology era to cure for a rare disease. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:412768.
12. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12(9):1260–8.
13. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1221–30.
14. Li X, Ominsky MS, Stolina M, et al. Increased RANK ligand in bone marrow of orchietomized rats and prevention of their bone loss by the RANK ligand inhibitor osteoprotegerin. *Bone*. 2009;45(4):669–76.
15. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2009;361(8):756–65.
16. Smith MR, Egerdie B, Hernandez Toriz N, et al. Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(8):745–55.
17. Kostenuik PJ, Smith SY, Jollette J, Schroeder J, Pyrah I, Ominsky MS. Decreased bone remodeling and porosity are associated with improved bone strength in ovariectomized cynomolgus monkeys treated with denosumab, a fully human RANKL antibody. *Bone*. 2011;49(2):151–61.
18. Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *J Bone Miner Res*. 2009;24(2):182–95.
19. Mizuno A, Kanno T, Hoshi M, et al. Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2002;20(6):337–44.
20. Douni E, Rintotas V, Makrinou E, et al. A RANKL G278R mutation causing osteopetrosis identifies a functional amino acid essential for trimer assembly in RANKL and TNF. *Hum Mol Genet*. 2012;21(4):784–98.
21. Douni E, Alexiou M, Kollias G. Genetic engineering in the mouse: tuning TNF/TNFR expression. *Methods Mol Med*. 2004;98:137–70.
22. Dacquin R, Davey RA, Laplace C, et al. Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation in vivo. *J Cell Biol*. 2004;164(4):509–14.
23. Mugniery E, Dacquin R, Marty C, et al. An activating Fgfr3 mutation affects trabecular bone formation via a paracrine mechanism during growth. *Hum Mol Genet*. 2012;21(11):2503–13.
24. Boussein ML, Myers KS, Shultz KL, Donahue LR, Rosen CJ, Beamer WG. Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. *J Bone Miner Res*. 2005;20(7):1085–92.
25. O'Brien CA, Nakashima T, Takayanagi H. Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone*. 2013;54(2):258–63.
26. Van Keuren ML, Gavrilina GB, Filipiak WE, Zeidler MG, Saunders TL. Generating transgenic mice from bacterial artificial chromosomes: transgenesis efficiency, integration and expression outcomes. *Transgenic Res*. 2009;18(5):769–85.
27. Cooper DM, Thomas CD, Clement JG, Turinsky AL, Sensen CW, Hallgrímsson B. Age-dependent change in the 3D structure of cortical porosity at the human femoral midshaft. *Bone*. 2007;40(4):957–65.
28. Rosen CJ, Klibanski A. Bone, fat, and body composition: evolving concepts in the pathogenesis of osteoporosis. *Am J Med*. 2009;122(5):409–14.
29. Li X, Kuo D, Schafer AL, et al. Quantification of vertebral bone marrow fat content using 3 Tesla MR spectroscopy: reproducibility, vertebral variation, and applications in osteoporosis. *J Magn Reson Imaging*. 2011;33(4):974–9.
30. Rosen CJ, Boussein ML. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2(1):35–43.
31. Foo C, Frey S, Yang HH, Zellweger R, Filgueira L. Downregulation of beta-catenin and transdifferentiation of human osteoblasts to adipocytes under estrogen deficiency. *Gynecol Endocrinol*. 2007;23(9):535–40.
32. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36(1):57–66.
33. Tseng W, Graham LS, Geng Y, et al. PKA-induced receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) expression in vascular cells mediates osteoclastogenesis but not matrix calcification. *J Biol Chem*. 2010;285(39):29925–31.
34. Helas S, Goettsch C, Schoppet M, et al. Inhibition of receptor activator of NF-kappaB ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. *Am J Pathol*. 2009;175(2):473–8.
35. Lo Iacono N, Blair HC, Poliani PL, et al. Osteopetrosis rescue upon RANKL administration to Rankl(-/-) mice: a new therapy for human RANKL-dependent ARO. *J Bone Miner Res*. 2012;27(12):2501–10.
36. Kim N, Odgren PR, Kim DK, Marks SC Jr, Choi Y. Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE in skeletal physiology revealed by TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(20):10905–10.
37. Ominsky MS, Stouch B, Schroeder J, et al. Denosumab, a fully human RANKL antibody, reduced bone turnover markers and increased trabecular and cortical bone mass, density, and strength in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone*. 2011;49(2):162–73.