

Sistem RANKL/RANK/OPG - nova tarča za zdravila za zdravljenje osteoporoze

RANKL/RANK/OPG system - new target for drugs for osteoporosis treatment

Simona Mencej Bedrač, Janja Marc

Povzetek: Raziskave kažejo, da je sistem RANKL/RANK/OPG pomembna nova tarča za zdravila za zdravljenje osteoporoze. Je eden od lokalnih dejavnikov, ki uravnava kostno remodelacijo oz. kostno razgradnjo. Vpliva na osteoklastogenezo, v kateri nastanejo zreli osteoklasti, in na aktivacijo zrelih osteoklastov. Po vezavi RANKL na receptor RANK se pospešijo procesi diferenciacije in aktivacije osteoklastov ter zlitja do večjedrnih osteoklastov, njihovo preživetje se podaljša, apoptoza osteoklastov pa je upočasnjena. To poveča razgradnjo kostnine, kar vodi do zmanjšanja kostne mase in bolezni npr. osteoporoze. Po drugi strani OPG z vezavo na RANKL prepreči učinke RANKL ter tako zmanjša razgradnjo kostnine in deluje v smeri povečanja kostne mase. Pri preučevanju možnosti terapevtske uporabe zdravilnih učinkovin z delovanjem na sistem RANKL/RANK/OPG sta se kot najboljša pokazala fuzijski protein OPG-Fc in človeško monoklonsko protitelo proti RANKL - denosumab. Zaradi možnih tveganj pri uporabi fuzijskega protein OPG-Fc se je kot mnogo obetavnejša izkazala uporaba denosumaba.

Gljučne besede: RANKL, RANK, OPG, osteoporoza, denosumab

Abstract: Data show that RANKL/RANK/OPG system is an important new target for drugs for osteoporosis treatment. It is one of the local factors that influence bone remodelling or bone resorption. Its primary influence is on the osteoclastogenesis, in which osteoclasts develop, and on mature osteoclast activation. Following RANKL binding to RANK receptor the osteoclast differentiation, activation and fusion are accelerated, their survival is prolonged and the apoptosis is decreased. Bone resorption is increased and followed by bone loss and development of diseases like osteoporosis. On the other hand, OPG binding to RANKL prevents RANKL effects and leads to decreased bone resorption and increased bone mass. Therapeutic implications of active substances, influencing RANKL/RANK/OPG system, have also been studied and the best results were obtained from the use of OPG-Fc fusion protein and human monoclonal RANKL antibody denosumab. Due to possible risks with OPG-Fc fusion protein application, the use of denosumab is far more promising.

Key words: RANKL, RANK, OPG, osteoporosis, denosumab

1 Uvod

V kosteh ves čas poteka kostna remodelacija, v kateri se ciklično izmenjujeta procesa tvorbe kosti, za katero so odgovorni osteoblasti, in resorpcije kosti, ki poteka s pomočjo osteoklastov. Osteoklasti so večjedrne celice, ki nastanejo s celičnim zlitjem enojedrnih osteoklastov in izločajo kisline za razgradnjo kostnine (1). Večino presnovnih bolezni kosti povzročijo spremembe števila ali aktivnosti osteoklastov, kar vodi v povečano resorpcijo kosti, ki pa je osteoblasti ne morejo ustrezno kompenzirati. V procesu nastanka osteoklastov (osteoklastogeneza) imajo pomembno vlogo ligand receptorja za aktivacijo jedrnega dejavnika κB (angl. receptor activator of nuclear factor κB ligand - RANKL), receptor za aktivacijo jedrnega dejavnika κB (angl. receptor activator of nuclear factor κB - RANK) in

osteoprotegerin (OPG), ki so povezani z razvojem pomenopavzne osteoporoze, revmatoidnega artritisa, Pagetove bolezni, peridontalne bolezni, benignih in malignih novotvorb kosti, kostnih metastaz in hiperkalcemije pri malignih boleznih. Kaže, da ima sistem RANKL/RANK/OPG odločilno vlogo pri uravnavanju zunajskeletnega kalcija, saj uravnava tudi kalcifikacijo žil, odgovoren pa je tudi za razvoj mlečnih žlez v času nosečnosti (2).

2 Sistem RANKL/RANK/OPG

Prvi odkriti predstavnik sistema RANKL/RANK/OPG je bil OPG, ki so ga identificirali na podlagi povečanega izražanja gena *OPG* pri transgenih miših, kar se je fenotipsko kazalo kot osteopetroza. Opazili so izrazit padec števila osteoklastov, zato so sklepali, da ima OPG

pomembno vlogo pri regulaciji osteoklastogeneze (3, 4). Odkritje OPG je kasneje vodilo do identifikacije proteina RANKL - dejavnika za diferenciacijo osteoklastov, ki je ključen za njihov razvoj (5, 6). Ob tem se je izkazalo, da gre dejansko za že znani protein, ki pa so ga do tedaj povezovali z aktivacijo T-celičnih receptorjev in stimulacijo dendritičnih celic (7, 8). Ker je bil za protein RANKL tedaj že poznan tudi njegov receptor RANK, so bili vsi trije ključni dejavniki odkriti (8).

RANKL spada v naddružino ligandov tumorje nekrotizirajočih dejavnikov (angl. tumor necrosis factor superfamily - TNFSF), RANK in OPG pa v naddružino receptorjev tumorje nekrotizirajočih dejavnikov (angl. tumor necrosis factor receptor superfamily - TNFRSF).

RANKL

RANKL je protein, sestavljen iz 317 aminokislin (AK), ki ga tvorijo 3 podenote (8, 9). V človeškem telesu se nahaja v treh oblikah: kot transmembranski protein tipa II (40 – 45 kDa), kot zunajcelična topna oblika proteina (31 kDa) in kot primarno izločena topna oblika proteina (2). Človeški RANKL nima signalnega peptida, ki ga običajno tvori 15 do 30 AK, ki predstavljajo signal za izločanje proteina iz celice. Signalni peptid se ob sekreciji proteina iz celice odcepi. Pri človeku je RANKL sestavljen iz N-terminalne citoplazemske domene (48 AK), transmembranske domene (21 AK) in zunajcelične domene (248 AK), kjer je tudi mesto za vezavo liganda (158 – 317) (5, 6, 8). Topna oblika proteina RANKL lahko nastane s proteolitično cepitvijo transmembranske oblike RANKL. Encim, ki je odgovoren za cepitev, še ni znan. V največji meri so preučevali encim TNF- α -konvertazo, nekatere raziskave pa kažejo tudi na morebitno vlogo membranske metaloproteaze MT1-MMP ter disintegrina A in metaloproteaze 19. Topna oblika proteina RANKL lahko nastane tudi neposredno v celici v procesu alternativnega izrezovanja, čemur sledi ekskrecija proteina v zunajceličnino (10). Homologija med mišjim in človeškim proteinom RANKL je 83 % (7). Gen *TNFSF11*, ki kodira protein RANKL, se v največji meri izraža v kostnem tkivu, kostnem mozgu in limfatičnih tkivih, vključno s fetalnimi jetri, limfnih vozlih, vranici in priželjcu. V manjšem obsegu se gen *TNFSF11* izraža tudi v srcu, pljučih, ščitnici in placenti (11).

RANK

RANK je transmembranski protein tipa I, sestavljen iz 616 AK. Na celični površini se poveže v trimer. Vsebuje 4 zunajcelične, s cisteinom bogate psevdoponovitve. RANK protein je sestavljen iz signalnega peptida (28 AK), N-terminalne zunajcelične domene (184 AK), transmembranske domene (21 AK) in C-terminalne citoplazemske domene (383 AK) (8). Gen *TNFRSF11A*, ki kodira protein RANK, se izraža predvsem v osteoklastih, celicah B in T, fibroblastih in dendritičnih celicah, v manjši meri pa tudi v srcu, pljučih, možganih, skeletnih mišicah, ledvicah, jetrih in koži (10, 11).

OPG

OPG je topen protein, dolg 401 AK s 4 s cisteinom bogatimi psevdoponovitvami (2, 3, 4). Vsebuje 21 AK dolg signalni peptid, ki je potreben za homodimerizacijo proteina preko disulfidne vezi na mestu 400 (12). V naslednji fazi pride do odcepitev signalnega peptida, tako da nastane 380 AK velik protein. Predno se OPG

homodimer izloči iz celice, poteče še njegova N-glikozilacija (13). V nasprotju z ostalimi predstavniki naddružine nima hidrofobne transmembranske in citoplazemske domene ter je v obliki dimera (10, 13). Homologija med človeškim in podganjim OPG je 85 % (3). OPG se primarno izraža v stromalnih celicah kostnega mozga, nastaja pa tudi v osteoblastih, limfocitih B, dendritičnih celicah, srcu, pljučih, koži, ledvicah, jetrih, možganih, želodcu, črevesju in kosteh (3, 4, 13).

3 Vloga sistema RANKL/RANK/OPG pri nastanku osteoporoze

Razvoj osteoporoze

Kostna remodelacija je fiziološki proces, ki poteka vse življenje in v katerem se obnavlja kostno tkivo. Sestavlja jo proces razgradnje kostnine z osteoklasti in proces izgradnje nove kostnine z osteoblasti. Neravnovesje med tvorbo in razgradnjo kostnine, ki je posledica vpliva lokalnih ali sistemskih dejavnikov, lahko vodi do razvoja bolezni kosti, med katere spada tudi osteoporoza. Osteoporoza je sistemska bolezen skeleta, za katero sta značilni nizka mineralna kostna gostota (angl. bone mineral density - BMD) in mikroarhitekturne spremembe kostnega tkiva, kar vodi do večje krhkosti kosti in pogostnosti zlomov. Zaradi daljše življenjske dobe postaja osteoporoza vse večji zdravstveni problem, saj bo tekom življenja kar 30 do 50 % žensk in 13 do 30 % moških doživelo zlom kot posledico osteoporoze (14, 15).

Vpliv delovanja sistema

RANKL/RANK/OPG na osteoklastogenezo

Kostna remodelacija je odvisna predvsem od razmerja med RANKL in OPG. Vsaka sprememba razmerja med njima sproži, ali izrazito povečanje kostne resorpcije, ki lahko vodi do osteoporoze, ali zmanjšanje kostne resorpcije, ki lahko privede do osteopetroze (10).

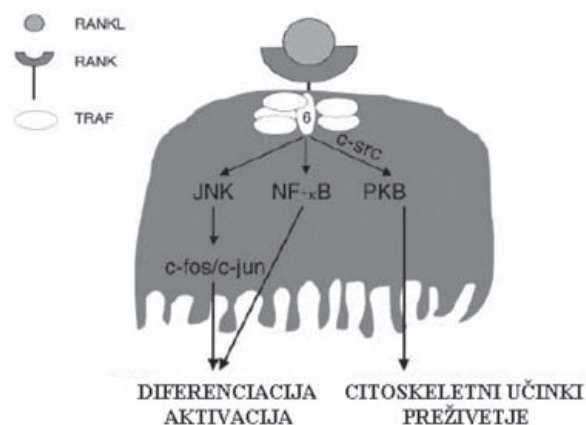
Celice osteoblastne vrste so odgovorne za izražanje tako membransko vezane kot tudi topne oblike proteina RANKL. Poleg tega osteoblasti izločajo tudi OPG (16). RANKL in OPG imata nasprotna učinka na kostno tkivo. Ob prisotnosti zadostne količine makrofagnega kolonijo stimulirajočega dejavnika (angl. macrophage colony-stimulating factor - M-CSF) je RANKL nujen in zadosten dejavnik za diferenciacijo prekurzorov celic do zrelih osteoklastov. Veže se na receptor RANK na površini prekurzorjev osteoklastov in tako inducira diferenciacijo do prefuzijskih osteoklastov. RANKL stimulira tudi preživetje in zlitje do večjedrnih osteoklastov, njihovo aktivacijo ter upočasni apoptozo osteoklastov. Njegovi učinki delujejo v smeri povečanja kostne resorpcije in zmanjšanje kostne mase (12).

OPG se veže na vse oblike RANKL (membransko vezano in topno) in nevtralizira vse njegove biološke učinke. Deluje kot inhibitor kostne resorpcije in vodi v smer povečanja kostne mase. Z vezavo na RANKL OPG prepreči njegovo vezavo na receptor RANK in s tem tudi inhibira osteoklastogenezo (10). OPG lahko z vezavo na za zdaj še neidentificirane receptorje na osteoklastih tudi neposredno inhibira njihovo aktivnost (17). OPG pri kostnih celicah inhibira zadnje faze diferenciacije osteoklastov, zavira aktivacijo zrelih osteoklastov in inducira njihovo apoptozo (10). Delovanje sistema RANKL/RANK/OPG je shematsko predstavljeno na sliki 1.



Slika 1: Uravnavanje delovanja osteoklastov z RANKL, RANK in OPG.
Figure 1: Regulation of osteoclast functions by RANKL, RANK and OPG.

Mehanizmi, ki se sprožijo ob vezavi, so za razumevanje delovanja novih zdravilnih učinkovin, zelo pomembni. Po vezavi RANKL na RANK pride na intracelularni domeni RANK do njegove interakcije z z receptorji TNF povezanih dejavnikov (angl. TNF-receptor associated factor – TRAF) 1, 2, 3, 5 in 6. Od naštetih ima odločilno vlogo TRAF6, ki aktivira mitozo aktivirajoči protein (angl. mitose-activating protein – MAP) kinazne kaskade ter preko aktivacije *c-jun* N-terminalne kinaze (angl. *c-jun* N-terminal kinase – JNK) vodi do povezave protoonkogenov *c-jun* in *c-fos* v transkripcijski faktor AP-1. Protoonkogeni so normalni geni, ki so vključeni v nadzor celične rasti in delitve ter se z mutacijo ali povečanim izražanjem lahko spremenijo v onkogene. TRAF6 stimulira tudi kinazo I κ B, kar vodi do nastanka jedrnega dejavnika κ B, ki prehaja v jedro in se veže na določene gene. Znano je tudi, da TRAF6 preko delovanja na protoonkogen *c-src*, povzroči aktivacijo protein kinaze B (PKB) (slika 2) (18).



Slika 2: Signalna transdukcija v osteoklastih po vezavi RANKL na receptor RANK.
Figure 2: Signal transduction in osteoclasts after RANKL binding to RANK receptor.

Do večje izgube kostne mase lahko pride pri nekaterih avtoimunih boleznih, kroničnih virusnih okužbah (HIV), alergijskih boleznih in nekaterih oblikah malignih novotvorb (13). Molekularna povezava

med imunskim sistemom in kostnim tkivom dolgo ni bila jasna. Z odkritjem sistema RANKL/RANK/OPG, ki ima pomembno vlogo tako pri osteoklastogenezi kot tudi pri regulaciji delovanja imunskih celic, so bili pojasnjeni nekateri mehanizmi izgube kostne mase pri tovrstnih boleznih. Dendritične celice predstavijo antigene ali avtoantigene celicam T ter na ta način neposredno inducirajo izražanje RANKL v aktiviranih celicah T. Poleg tega se v celicah T poveča tudi tvorba citokinov IL-1, IL-6, IL-11 in TNF α , ki posredno povečajo izražanje RANKL v osteoblastih (9, 13). Aktivirane celice T lahko tudi zavirajo osteoklastogenezo preko tvorbe interferona γ . Signalizacija preko interferona γ na osteoklastih ali njegovih prekurzorjih povzroči hitro razgradnjo TRAF6 ter tako zmanjša osteoklastogenezo. Pri akutnem imunskem odzivu je povečana tvorba interferona γ , ki uravna povečano izražanje RANKL ter tako zmanjša tvorbo osteoklastov. Pri kroničnih vnetjih pa je verjetno to ravnovesje pomaknjeno v korist izražanja RANKL (19).

4 Sistem RANKL/RANK/OPG kot nova tarča za zdravila za zdravljenje osteoporoze

RANKL, RANK in OPG predstavljajo nove tarče za zdravila za zdravljenje osteoporoze. V preglednici 1 so navedeni do sedaj uporabljeni terapevtski pristopi.

In vitro in *in vivo* študije so pokazale, da 17 β -estradiol zavira izražanje RANKL, poleg tega pa učinkine RANKL blokirajo tudi sintetični OPG fuzijski proteini, topni RANK fuzijski proteini in protitelesa proti RANKL (20). Aktivacijo RANK lahko preprečimo z vezavo peptidomimetikov, ki preprečijo vezavo RANKL na receptor RANK (21), ali preko zaviranja postreceptorskega signaliziranja s 17 β -estradiolom. *In vitro* podatki kažejo, da lahko tvorbo endogenega OPG stimuliramo s 17 β -estradiolom, raloksifenom in bisfosfonati (20).

Na začetku sta se kot najbolj obetavni pokazali uporabi fuzijskih proteinov OPG-Fc in RANK-Fc. Nastanejo z zlitjem z Fc delom protiteles, ki je odgovoren za vezavo na receptorje na površini celic in aktivacijo imunskega sistema. Pri živalih sta se oba fuzijska proteina izkazala za učinkovita pri zdravljenju osteoporoze (20). Pri ljudeh so do sedaj najintenzivneje preučevali učinke fuzijskega proteina OPG-Fc in protitelesa proti RANKL - denosumaba. V randomiziranem, nadzorovanem preskušanju, v katerem so pri 52 pomenopavznih ženskah z osteoporozo vrednotili kratkotrajne učinke enkratnega odmerka, so ugotovili, da fuzijski protein OPG-Fc pomembno zavira kostno resorpcijo (22). Denosumab je človeško monoklonsko protiteleso, ki se z visoko afiniteto in specifičnostjo veže na RANKL in tako prepreči interakcijo med RANKL in RANK. V študiji 1. faze je po subkutanem injiciranju denosumaba 49 pomenopavznim ženskam prišlo do zmanjšanja kostne resorpcije, ki je bila odvisna od odmerka (23). V študiji 2. faze pri 412 pomenopavznih ženskah z nizko kostno gostoto je bila učinkovitost denosumaba primerljiva z učinkovitostjo alendronata. Tudi profil neželenih učinkov je bil primerljiv s profilom neželenih učinkov placeba in alendronata, edino dispepsija se je značilno pogostejše pojavljala pri zdravljenju z alendronatom (24). Pokazalo se je tudi, da ima denosumab nekatere prednosti pred fuzijskim proteinom OPG-Fc. Pri uporabi fuzijskega proteina OPG-Fc lahko namreč pride do tvorbe protiteles proti OPG, ki lahko nato

Preglednica 1: Sistem RANKL/RANK/OPG kot terapevtska tarča za nova zdravila za zdravljenje osteoporoze.

Table 1: The RANKL/RANK/OPG system as a therapeutic target for new drugs for osteoporosis treatment.

RANKL
• zaviranje endogenega izražanja RANKL • blokada RANKL
RANK
• preprečevanje vezave na RANKL • zaviranje postereceptorskega signaliziranja
OPG
• spodbujanje tvorbe endogenega OPG • aplikacija OPG ali njegovih analogov

navzkrižno reagirajo z endogenim OPG ter tako nevtralizirajo njegovo delovanje. Fuzijski protein OPG-Fc se lahko veže tudi na TNF soroden ligand, ki inducira apoptozo (angl. TNF-related apoptosis-inducing ligand – TRAIL) in je dejavnik preživetja tumorskih celic ter sodeluje pri naravni obrambi telesa proti tumorogenezi. Nasprotno pa je protitelo denosumab specifično le za RANKL, učinkovitejše že pri manjših odmerkih, pri enakem odmerku pa zaviranje resorpcije traja dalj časa (23).

5 Sklep

Sistem RANKL/RANK/OPG je eden od dejavnikov, ki uravnava kostno remodelacijo, in predstavlja novo tarčo za zdravila za zdravljenje osteoporoze. Pri ljudeh so rezultati raziskav najbolj spodbudno za človeško monoklonsko protitelo proti RANKL denosumab, ki pa je trenutno še v fazi razvoja in še ni bil preizkušen na večjem številu bolnic z osteoporozo, kjer bi dobili jasnejšo sliko o njegovi varnosti in učinkovitosti.

6 Literatura

- Miyamoto T, Suda T. Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med* 2003; 52 (1): 1-7.
- Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79: 243-253.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel selected protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology* 1998; 39: 1329-1337.
- Lacey DL, Timms E, Tan H-L et al. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-176.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3597-3602.
- Wong BR, Rho J, Arron J et al. 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* 1997; 272: 25190-25194.
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390: 175-179.
- Holestead Jones D, Kong Y-Y, Penninger. Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. *Ann Rheum Dis* 2002; 6 (Suppl III): ii32-ii39.
- Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S et al. IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 49-60.
- Horowitz MC, Xi Y, Wilson K et al. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 9-18.
- Hofbauer LC, Heufelder AE. The role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(7): 2355-2363.
- Walsh MC, Choi Y. Biology of TRANCE axis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 251-263.
- Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2005; 16 Suppl 2: S3-S7.
- Randell A, Sambrook PN, Nguyen TV et al. Direct clinical and welfare costs of osteoporotic fractures in elderly men and women. *Osteoporos Int* 1996; 5: 427-432.
- Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142(12): 5050-5055.
- Hakeda Y, Kobayashi Y, Yamaguchi K et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 796-801.
- Troen BR. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Experimental Gerontology* 2003; 38: 605-614.
- Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature* 2000; 408: 600-605.
- Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004; 292(4): 490-495.
- Cheng X, Kinoshita M, Takami M et al. Disabling of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) receptor complex by novel osteoprotegerin-like peptidomimetics restores bone loss *in vivo*. *J Biol Chem* 2004; 279: 8269-77.
- Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A et al. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 348-60.
- Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1059-1066.
- McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB et al. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2006; 354: 821-831.