

Received: 2006.02.13
Accepted: 2006.07.27
Published: 2006.09.04

Rola RANK/RANKL i OPG w szpiczaku plazmocytowym*

The role of RANK/RANKL and OPG in multiple myeloma

Barbara Zdzisińska, Martyna Kandefer-Szerszeń

Zakład Wirusologii i Immunologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Streszczenie

Szpiczak plazmocytowy (MM) rozwija się prawie wyłącznie w szpiku kostnym i prowadzi do znacznej destrukcji kości przez osteoklasty (OCs), których ilość i aktywność zwiększa się w miejscach nagromadzenia komórek szpiczakowych. Nasilenie zmian kostnych koreluje ze stopniem nacieczenia szpiku przez komórki szpiczakowe i klinicznym zaawansowaniem choroby. Wytwarzany przez komórki podścieliska szpiku kostnego/osteoblasty RANKL, główna cząsteczka w regulacji prawidłowej osteoklastogenezy, reagując ze swoim receptorem RANK na prekursorach OCs stymuluje osteoklastogenezę, podczas gdy OPG wydzielana również przez komórki podścieliska/osteoblasty, wiążąc RANKL zapobiega jego interakcji z RANK i hamuje osteoklastogenezę. Komórki szpiczakowe wzmagają miejscowo osteolizę przez zwiększenie ekspresji RANKL i obniżenie ekspresji OPG w szpiku kostnym, a także w wyniku degradacji OPG, wiązanej przez komórki nowotworowe za pośrednictwem syndekanu 1. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na zaburzenie równowagi RANKL/OPG i wzmocnienie osteolizy, jest też prawdopodobnie bezpośrednio wytwarzanie RANKL przez komórki szpiczakowe. Pobudzeniu OCs towarzyszy jednocześnie zahamowanie kościotwórczej czynności osteoblastów, będące wynikiem bezpośredniej reakcji tych komórek z komórkami szpiczakowymi oraz hamującego wpływu różnych czynników wydzielanych przez komórki szpiczakowe.

Słowa kluczowe:

szpiczak plazmocytowy • kość • RANK • RANKL • OPG • komórki szpiczakowe • osteoklasty • osteoblasty • cytokiny

Summary

Multiple myeloma (MM) almost exclusively develops in the bone marrow and generates devastating bone destruction by osteoclasts (OCs) recruited around myeloma cells. The severity of bone disease correlates with tumor burden. The interaction between RANK, expressed on the surface of OCs, and RANKL, a key molecule in the regulation of osteoclastogenesis expressed on bone marrow stromal cells, plays a role in the development and activation of OCs, whereas OPG, a decoy receptor for RANKL secreted from stromal cells, inhibits RANKL/RANK signaling. Myeloma cells stimulate osteoclastogenesis by triggering an increase in RANKL and decrease in OPG in bone marrow cells. They also express syndecan-1, a molecule which binds and stimulates OPG degradation in myeloma cells. MM cells can themselves express RANKL which can interact directly with RANK on OCs to promote osteoclast formation in a stromal cell-independent manner. Moreover, myeloma cells may additionally inhibit osteoblastogenesis directly or indirectly. The mechanisms involved in these coordinated processes are described and discussed.

Key words:

multiple myeloma • bone • RANK • RANKL • OPG • myeloma cells • osteoclasts • osteoblasts • cytokines

* Praca finansowana z grantu KBN Nr 2 P05A 095 28.

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9628.pdf

Word count: 4524

Tables: –

Figures: 1

References: 117

Adres autorki: dr Barbara Zdzisińska, Zakład Wirusologii i Immunologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; e-mail: basiaz@biotop.umcs.lublin.pl

Wykaz skrótów: **ADAM 19** – dezintegryna i metaloproteinaza (A disintegrin and metalloprotease 19); **AP1** – czynnik transkrypcyjny (activator protein-1); **ASK-1** – kinaza MAPKKK, czyli kinaza kinazy fosforylującej MAPK (apoptosis signal-regulating kinase-1); **BMP** – białko morfogenetyczne kości (bone morphogenetic protein); **BRU** – jednostka przebudowy kości (bone remodeling unit); **CD** – kompleks różnicowania (cluster of differentiation); **DDH** – domeny homologiczne do domen śmierci (death domain homologous regions); **DKK-1** – białko hamujące drogę przekazu sygnału Wnt (dickkopf 1 protein); **DR** – receptor śmierci (death receptor); **EBV** – wirus Epsteina-Barr (Epstein Barr virus); **ERK** – kinaza MAPK (extracellular-signal regulated kinase); **FADD** – domena śmierci związana z Fas (Fas-associated death domain); **Fas** – receptor FasL, czyli czynnika indukującego apoptozę; **FDCCR-1** – receptor pochodzący z komórki dendrytycznej grudki, czyli osteoprotegeryna (follicular dendritic cell-derived receptor-1); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); **Gab2** – białko adaptorowe (Grb-2-associated binder); **GH** – hormon wzrostu (growth hormone); **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); **GSK** – kinaza syntazy glikogenu (glycogen synthase kinase); **IKK** – kinaza inhibitora IκB (IκB kinase); **IFN** – interferon; **IGF** – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor); **IL** – interleukina; **ITAM** – motywy immunoreceptorowe aktywujące oparte na tyrozynie (immunoreceptor tyrosine-based activation motif); **JNK** – kinaza MAPK (Jun N-terminal kinase); **LIF** – czynnik hamujący białaczkę (leukemia inhibiting factor); **LRP 5/6** – koreceptor receptora białek Wnt (lipoprotein-related protein 5 and 6); **MAPK** – kinazy białkowe aktywowane przez mitogen (mitogen-activated protein kinases); **M-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (macrophage colony-stimulating factor); **MGUS** – gammopatia monoklonalna o nieustalonym znaczeniu (monoclonal gammopathy of undetermined significance); **MIP** – białko zapalne makrofagów (macrophage inflammatory protein); **MITF** – czynnik transkrypcyjny (microphthalmia transcription factor); **NIK** – kinaza indukująca czynnik NF-κB (NF-κB-inducing kinase); **NF-κB** – czynnik jądrowy κB (nuclear factor κB); **NFAT** – czynnik jądrowy pobudzonych limfocytów T (nuclear factor of activated T cells); **OAFs** – czynniki aktywujące osteoklasty (osteoclast activating factors); **OCIF** – czynnik hamujący osteoklastogenezę, czyli osteoprotegeryna (osteoclastogenesis inhibitory factor); **ODF** – czynnik różnicowania osteoklastów (osteoclast differentiation factor); **OPG** – osteoprotegeryna (osteoprotegerin); **OPGL** – ligand osteoprotegeryny, czyli RANKL (osteoprotegerin ligand); **OSM** – onkostatyna M (oncostatin M); **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor); **PGE2** – prostaglandyna E₂; **PI-3K** – kinaza 3-fosfatydiloinozytolu; **PIPC** – C-końcowy propeptyd prokolagenu typu I (carboxy-terminal propeptide of type I procollagen); **PTH** – parathormon; **RANK** – receptor aktywujący czynnik jądrowy κB (receptor activator of nuclear factor-κB); **RANKL** – ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy κB (receptor activator of nuclear factor-κB ligand); **SDF** – czynnik pochodzący z komórek zrębowych (stromal cell-derived factor); **SCID** – ciężki złożony niedobór odporności (severe combined immunodeficiency disease); **sFRP-2** – rozpuszczalne białko hamujące drogę przekazu sygnału Wnt (soluble Frizzled-related protein-2); **TAB2** – białko wiążące kinazę TAK1 (TAK1 binding protein 2); **TACE** – metaloproteinaza (TNF-alpha converting enzyme-like protease); **TAK1** – kinaza serynowo-treoninowa (TGF-β activating kinase 1); **TCF/LEF** – rodzina czynników transkrypcyjnych specyficznych dla limfocytów T (ternary complex factor/lymphoid-enhancing factor); **TGF** – transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor); **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumor necrosis factor); **TNFR** – receptor czynnika martwicy nowotworu (tumor necrosis factor receptor); **TR-1** – osteoprotegeryna (TNF receptor-like molecule-1); **TRADD** – domena śmierci związana z TNFR1 (TNFR1-associated death domain); **TRAF** – białka adaptorowe (TNF receptor-associated factors); **TRANCE** – RANKL (TNF-related activation induced cytokine); **TRAIL** – zależny

od TNF czynnik indukujący apoptozę (TNF-related apoptosis inducing ligand); **VCAM** – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń (vascular cell adhesion molecule); **VIP** – naczynioaktywny polipeptyd jelitowy (vasoactive intestinal polypeptide); **VLA** – antygen bardzo późny (very late antigen); **Wnt** – białko wydzielnicze typu Wingless (Wingless-type).

WSTĘP

Szpiczak plazmocytowy jest nieuleczalną chorobą nowotworową, charakteryzującą się obecnością w szpiku kostnym monoklonalnych plazmacytów, których niekontrolowany rozrost zaburza proces hematopojezy, a także powoduje powstawanie zmian chorobowych w kościach. U większości pacjentów ze szpiczakiem występują ogniskowe zmiany osteolityczne lub uogólniony ubytek masy kostnej, które są następstwem wzmożonej resorpcji kości i zahamowania procesu kościotworzenia [6,90]. Ten ubytek kości jest zjawiskiem na ogół nieodwracalnym i nawet u pacjentów z całkowitą remisją choroby rzadko następuje odbudowa tkanki kostnej [82].

Resorpcja kości w szpiczaku, będąca wynikiem zwiększonej rekrutacji osteoklastów i ich aktywacji, wiąże się ściśle ze stopniem infiltracji szpiku przez komórki szpiczakowe [22]. Czynniki pobudzające tworzenie i aktywność osteoklastów są wydzielane lokalnie zarówno przez komórki szpiczaka, jak też przez podścielisko szpiku kostnego, do którego przylegają komórki nowotworowe. Oprócz cytokin, takich jak: IL-6, M-CSF, IL-1 β , TNF i IL-11, które od dawna znane są jako czynniki aktywujące osteoklasty – OAFs (osteoclast activating factors), za najważniejszą w patogenezie zmian kostnych w szpiczaku plazmocytowym uważa się chemokinę MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 alpha) oraz cząsteczki z rodziny TNF – RANK, RANKL i OPG [98].

CHARAKTERYSTYKA UKŁADU RANK, RANKL I OPG

W ciągu ostatnich dziesięciu lat nastąpił znaczny postęp wiedzy na temat biologii kości, dzięki odkryciu funkcjonalnego systemu trzech cząsteczek należących do rodziny TNF, tj. receptora aktywującego czynnik jądrowy κ B – RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B), jego liganda – RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) i osteoprotegeryny – OPG (osteoprotegerin), które pełnią główną rolę w procesie osteoklastogenezy.

OPG została odkryta jako pierwszy składnik tej triady w 1997 r, niezależnie przez trzy grupy badaczy, stąd pochodzą różne jej nazwy – OCIF (osteoclastogenesis inhibitory factor), TR-1 (TNF receptor-like molecule-1) czy FDCR-1 (follicular dendritic cell-derived receptor-1), chociaż obecnie używa się nazwy OPG [54,91,115,117].

Sklonowany niezależnie przez cztery grupy badaczy RANKL, znany też pod nazwą TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine), OPGL (osteoprotegerin ligand) czy ODF (osteoclast differentiation factor), wiążąc się ze swoim funkcjonalnym receptorem RANK, stymuluje osteoklastogenezę, podczas gdy OPG hamuje ten proces, działając jako receptor kompetycyjny (decoy receptor) RANKL [2,56,113].

RANK

RANK należy do rodziny receptorów TNF i jest funkcjonalnym receptorem RANKL. Jest on glikoproteiną typu I,

zbudowaną z 616 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 90 kDa, kodowaną u człowieka w chromosomie 18q22.1. W budowie RANK wyróżnia się trzy domeny: N-końcowa domena zewnątrzkomórkowa, krótki fragment śródbłonowy zbudowany z 21 aminokwasów oraz dużą C-końcowa domena cytoplazmatyczną. RANK ma też 28-aminokwasową sekwencję sygnałową. Występuje w tkankach w postaci trimery. Zewnątrzkomórkowy fragment RANK (o ponad 40% homologii z CD40) tworzą 4 domeny z dużą zawartością cysteiny, odpowiedzialne za wiązanie RANKL. Jak dotąd nie opisano w literaturze rozpuszczalnej postaci tego receptora [2,41,112].

RANK ulega ekspresji przede wszystkim w komórkach linii monocytarno-makrofagowej, komórkach preosteoklastów i osteoklastów, limfocytach T i B, komórkach dendrytycznych, fibroblastach, chondrocytach i komórkach śródbłonka naczyniowego. Obecność RANK stwierdzono w następujących tkankach: kościach, szpiku kostnym, mózgu, sercu, nerce, wątrobie, płucach, tkankach sutka, mięśniach szkieletowych i skórze [2,41,65,72]. Czynniki zwiększającymi ekspresję RANK są: witamina D₃, IL-1, OSM, IFN- γ , VIP, MIP-1 α oraz RANKL, natomiast IGF-1, IL-4, FGF2 obniżają ekspresję tego receptora [15,70,73,77,87].

RANKL

RANKL jest cytokiną z rodziny TNF, kodowaną przez pojedynczy gen w chromosomie 13q14 [56,115,116]. U człowieka zidentyfikowano trzy izoformy RANKL [86]. Dwie z nich, RANKL1 i RANKL2 są związane z powierzchnią komórki (postaci błonowe), przy czym RANKL2 nie ma wewnątrzkomórkowej domeny. Są to glikoproteiny typu II zbudowane odpowiednio z 317 i 270 aminokwasów. Błonowe postaci RANKL mogą tworzyć kompleksy na powierzchni komórki, najczęściej trimery. RANKL3 nie ma domeny wewnątrzkomórkowej i śródbłonowej, jest zbudowany z 244 aminokwasów i jest pierwotną rozpuszczalną postacią RANKL (soluble RANKL, sRANKL), która może również powstawać wtórnie, po enzymatycznym odcięciu domeny zewnątrzkomórkowej w pozycji 140 lub 145 aminokwasu przez metaloproteinazę TACE (TNF- α converting enzyme-like protease) lub inne proteazy, np. ADAM19 (A disintegrin and metalloprotease 19) [14,60]. Postać rozpuszczalna RANKL występuje jako monomer. RANKL wykazuje 34% homologii do zależnego od TNF czynnika indukującego apoptozę – TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), 28% homologii z ligandem CD40 i 19% homologii z ligandem Fas [42,58].

RANKL1 i RANKL2 występują w wielu typach komórek, m.in. w aktywowanych limfocytach T (CD4+ i CD8+), podwójnie ujemnych tymocytach, niedojrzałych limfocytach B, osteoblastach, osteoklastach, komórkach podścieliska szpiku kostnego, fibroblastach, komórkach nabłonkowych, śródbłonku naczyniowym. Obecność mRNA dla RANKL stwierdzono w szpiku kostnym, kościach, obwodowych węzłach chłonnych, śledzionie, grasicy, kępkach Peyera, w

trobie płodowej, sercu, mięśniach szkieletowych, płucach, żołądku, jelicie, łożysku, tarczycy, leukocytach krwi obwodowej i mózdzku mysim [2,38,47,100]. Natomiast wytworzenie pierwotnej postaci sRANKL ogranicza się do aktywowanych limfocytów T oraz niektórych linii komórek nowotworowych [51,71].

Wykazano, że niektóre cytokiny mogą modulować ekspresję RANKL, np. IL-13 [73], FGF2 [15] oraz TGF- β [81] obniżają ekspresję, natomiast IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11, IL-17, IFN- γ , TGF- β , IGF-1, LIF, OSM oraz TNF zwiększają ekspresję tego czynnika. Ekspresja RANKL wzrasta też pod wpływem czynników osteotropowych – glukokortykoidów, hormonu przytarczyc (PTH), prostaglandyny E₂ i 1,25(OH)₂ witaminy D₃ [8,15,44,73,77,81,85,100].

RANKL wspólnie z M-CSF bezpośrednio indukuje osteoklastogenezę i hamuje apoptozę osteoklastów poprzez wiązanie się z RANK obecnym na progenitorach osteoklastów i dojrzałych osteoklastach. Oprócz działania osteotropowego, RANKL pełni funkcje immunomodulacyjne. Reguluje organogenezę węzłów chłonnych, rozwój tymocytów, moduluje aktywację limfocytów T [4,52]. Zwiększa też ekspresję RANK na monocytach, reguluje ich funkcję efektorową poprzez indukcję cytokin i wydzielanie chemokin, aktywuje prezentację antygeny przez zwiększenie ekspresji cząsteczek kostymulujących oraz działa jako czynnik przyżyciowy monocytów [87]. RANKL jest również przyżyciowym czynnikiem komórek dendrytycznych, zwiększającym w nich ekspresję Bcl-xL i chroniącym w ten sposób przed apoptozą. Poprzez indukcję cytokin wzmacnia immunostymulujące właściwości komórek dendrytycznych, a wspólnie z GM-CSF uczestniczy także w różnicowaniu i dojrzewaniu tych komórek ze wspólnych dla monocytów/makrofagów komórek prekursorowych [46,67,111]. Wykazano też, że RANKL ma aktywność chemotaktyczną [11,35].

Z najnowszych badań wynika, że RANKL i RANK uczestniczą w funkcji komórek śródbłonna naczyń krwionośnych. RANKL uwalniany przez komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych stymuluje ekspresję RANK w komórkach śródbłonna, co wspólnie z innymi czynnikami wzrostowymi, takimi jak: bFGF czy angiopoetyna 1, chroni je przed apoptozą. Układ RANK/RANKL pomaga więc w utrzymaniu integralności śródbłonna naczyniowego [49].

OPG

OPG jest glikoproteiną należącą do rodziny TNF. Występuje w postaci rozpuszczalnego homodimeru, rzadziej w postaci monomerycznej. Pełni funkcję receptora kompetycyjnego (decoy receptor) RANKL i moduluje powstawanie osteoklastów przez zahamowanie aktywacji RANK. Działanie OPG *in vitro* obejmuje zahamowanie różnicowania, przeżycia i fuzji prekursorów osteoklastów [1,31,103].

OPG jest zbudowana z 401 aminokwasów (łącznie z 21-aminokwasową sekwencją sygnałową), ma masę cząsteczkową 55 kDa i kodowana jest u człowieka w chromosomie 8q24. W cząsteczce OPG można wyróżnić trzy strukturalne domeny swoiście determinujące jej aktywność biologiczną. Od N-końca występują 4 bogate w cysteinę domeny odpowiedzialne za hamowanie osteoklastogenezę (wiążą

RANKL) i za dimeryzację OPG poprzez cysteinę w pozycji 400 (Cys⁴⁰⁰). W dalszej kolejności występują dwie domeny homologiczne do domen śmierci (DDH – death domain homologous regions) uczestniczące w transdukcji sygnału apoptozy, a następnie domena wiążąca heparynę, zdolna do interakcji z proteoglikanami [69,91,114,115,117].

Obecność mRNA dla OPG wykryto w komórkach podścieliska szpiku kostnego, komórkach dendrytycznych, komórkach śródbłonna, limfoidalnych, fibroblastach, monocytach, limfocytach B i T oraz megakariocytach. OPG jest wytwarzana w wielu tkankach i narządach, takich jak: kości, szpik kostny, mięśnie gładkie naczyń krwionośnych, serce, płuca, nerki, żołądek, jelito, łożysko, wątroba, tarczyca, skóra, śledziona, prostata, rdzeń kręgowy i mózg [54,91,97,117]. Wytwarzanie OPG jest modulowane przez różne osteotropowe hormony i cytokiny. Czynnikiami wzmagającymi wydzielanie OPG są: 17 β -estradiol, BMP-2, GH, IL-13, IL-18, LIF, OSM, PDGF, TGF- β , IFN- γ , FGF2, MIP-1 α . Negatywnymi regulatorami wytwarzania OPG są, m.in. PGE₂, glukokortykoidy, PTH, bFGF, IGF-1, IL-17, IL-1, IL-6 oraz IL-11 mogą zwiększać lub obniżać ekspresję OPG [73,94,100].

OPG, oprócz RANKL, może wiązać TRAIL, hamując w ten sposób apoptozę komórek [23,40]. Działa również jako czynnik przeżycia komórek śródbłonna naczyniowego [61].

UDZIAŁ RANK/RANKL W REGULACJI OSTEOKLASTOGENEZY

Kość jest wyspecjalizowaną tkanką łączną, która w warunkach fizjologicznych jest stale przebudowywana. Proces przebudowy kości polega na występowaniu skoordynowanych faz resorpcji starej lub uszkodzonej kości i budowaniu nowej tkanki. Ma on charakter cykliczny i odbywa się w ściśle określonych miejscach szkieletu, zwanych jednostkami przebudowy kości (BRU – bone remodeling unit). W przebudowę kości są zaangażowane głównie dwie grupy komórek: syntetyzujące kość osteoblasty i resorbujące kość osteoklasty [62].

Osteoblasty różnicują się z mezenchymalnych komórek pnia, poprzez wiele stadiów progenitorowych do dojrzałych komórek wytwarzających macierz pozakomórkową, i są stopniowo przekształcane w osteocyty.

Osteoklasty powstają z kolei z hematopoetycznych komórek szpiku kostnego, linii monocytarno-makrofagowej i mają charakterystyczne cechy, takie jak: wielojądrzastość, liczne mitochondria, spolaryzowana morfologia (strefowe rozmieszczenie struktur komórkowych) [83]. Zachowanie równowagi między aktywnością tych dwóch rodzajów komórek warunkuje prawidłową regenerację kości, a jej zaburzenia mogą doprowadzić do stanów chorobowych objawiających się nadmierną resorpcją kości (osteoporoza) lub wzrostem kostnienia (osteopetroza).

RANK/RANKL/OPG oraz M-CSF są najważniejszymi cząsteczkami w procesie różnicowania osteoklastów. Osteoklastogenezę zapoczątkowuje wydzielany przez osteoblasty M-CSF, który indukuje powstawanie prekursorów osteoklastów z komórek hematopoetycznych przez wiązanie się z receptorem c-Fms. Wytwarzane przez osteobla-

sty oraz podścielisko szpiku różne postaci RANKL wiążą się z zewnątrzkomórkową domeną RANK, który występuje na prekursorach osteoklastów. Prowadzi to do ekspresji swoistych genów zaangażowanych w proces przeżycia, różnicowania osteoklastów i resorpcji kości [10]. Niedawno wykazano, że indukowane przez RANKL różnicowanie osteoklastów wymaga kostymulujących sygnałów z motywów ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), czyli motywów immunoreceptorowych aktywujących opartych na tyrozinie [50].

RANKL występujący w postaci trimerów reaguje z trzema cząsteczkami RANK. Powstanie trimery RANK wywołuje zmiany konformacyjne w domenie cytoplazmatycznej receptora i uruchamia kaskadę przekazu sygnału do wnętrza komórki. Transdukcja sygnału odbywa się za pośrednictwem białek adaptorowych TRAF (TNF receptor-associated factors). Każdy cytoplazmatyczny odcinek trimery RANK wiąże jedną molekułę TRAF, co prowadzi do powstania trimery TRAF i aktywacji różnych dróg przekazu sygnału.

Cząsteczki z nadrodziny receptorów TNF podzielono na dwie grupy. Receptory należące do pierwszej z nich, tj. Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5, DR6, mają cytoplazmatyczne domeny śmierci, poprzez które w sposób pośredni (poprzez białka adaptorowe TRADD i FADD) wiążą białka TRAF. W cząsteczkach drugiej grupy, czyli RANK, TNFR2, CD40 i CD30 brak jest domen śmierci i białka TRAF są związane w sposób bezpośredni [19]. Cytoplazmatyczna domena RANK zawiera miejsca dokujące dla TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 i TRAF6. Największe znaczenie w przekazywaniu sygnału mają TRAF2 i TRAF6 [19,48,112]. TRAF2 wspólnie z kinazą ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) pośredniczy w aktywacji czynnika transkrypcyjnego AP1 (activator protein-1) [37]. Z kolei TRAF6 aktywuje czynnik transkrypcyjny NF- κ B poprzez drogę transdukcji sygnału obejmującą aktywację kinazy serynowo-treoninowej TAK1 i białka TAB2 (TAK1 binding protein 2), a następnie kinazy NIK (NF- κ B-inducing kinase) i kinazy IKK (I κ B kinases) [68,100]. NF- κ B może być również aktywowany w wyniku przekazu sygnału przez kinazy białkowe aktywowane przez mitogen – MAPK (mitogen-activated protein kinases) [100].

Druga droga przekazywania sygnału zapoczątkowana przez TRAF6 obejmuje aktywację kinaz ze szlaku MAPK, tj: JNK (Jun N-terminal kinase), p38 oraz ERK (extracellular-signal regulated kinase), a także czynnika transkrypcyjnego AP-1 [107]. Poprzez aktywację kinazy białkowej p38 należącej do MAPK następuje także aktywacja czynnika transkrypcyjnego MITF (microphthalmia transcription factor), niezbędnego do końcowego różnicowania osteoklastów [68].

Na trzeciej drodze transdukcji sygnału TRAF6 tworząc kompleks z białkiem c-Src i c-Cbl aktywują kinazę-3 fosfatydilinozytolu (PI-3K), a następnie kinazę Akt, która poprzez białko mTOR (białko wiążące kompleks rapamcyyna/receptor) pośredniczy w przekazywaniu sygnału antyapoptotycznego i reorganizacji cytoszkieletu [3,30,110].

RANKL tworząc kompleks z RANK indukuje również ekspresję czynnika transkrypcyjnego c-Fos, a poprzez JNK

aktywuje rodzinę czynników transkrypcyjnych c-Jun, regulując w ten sposób aktywność AP-1 (c-Fos i c-Jun są członkami rodziny czynnika transkrypcyjnego AP-1) [63]. RANKL indukuje też czynnik transkrypcyjny NFAT1 (nuclear factor of activated T cells) przez drogę przekazu sygnału rekrutującą c-Fos, jak i TRAF6 [43]. Aktywacja wyżej wymienionych czynników powoduje ekspresję genów warunkujących różnicowanie, aktywację i ochronę osteoklastów przed apoptozą.

W najnowszych badaniach wykazano, że istotną rolę w transdukcji sygnału, oprócz białek TRAF, odgrywa białko adaptorowe Gab2 (Grb-2-associated binder). Po utworzeniu kompleksu RANK/RANKL następuje fosforylacja Gab2 i związanie go z domeną cytoplazmatyczną receptora, co zapoczątkowuje kaskadę sygnałową regulującą osteoklastogenezę, m.in. przez aktywację kinaz JNK/c-Jun, Akt i czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. U myszy inaktywacja genów kodujących Gab2 powoduje osteopetrozę i zmniejszenie procesów resorpcji kości w wyniku zaburzenia różnicowania osteoklastów [106].

Cytokiny, które wpływają na poszczególne składniki wyżej opisanych dróg przekazu sygnału, mogą potencjalnie modulować przekazywanie sygnału zapoczątkowane przez kompleks RANK/RANKL. Na przykład IFN- γ wytwarzany przez aktywowane limfocyty T silnie hamuje osteoklastogenezę poprzez indukcję szybkiej degradacji białek TRAF6 [96]. Indukowana przez RANKL osteoklastogenezę jest też hamowana przez IFN- β . RANKL indukuje wytwarzanie IFN- β w komórkach prekursorowych osteoklastów, a z kolei IFN- β hamuje c-Fos [95].

ROLA RANK/RANKL/OPG W PATOFIZJOLOGII ZMIAN KOSTNYCH INDUKOWANYCH PRZEZ KOMÓRKI SZPICZAKA

Od kilku lat trwają intensywne badania nad rolą i funkcjonowaniem układu RANK/RANKL/OPG u chorych na szpiczaka plazmocytozy. Cechą charakterystyczną szpiczaka jest zwiększona resorpcja kości, wywołana aktywacją osteoklastów i zahamowaniem funkcji osteoblastów. Komórki szpiczaka po adhezji do komórek podścieliska szpiku kostnego, za pośrednictwem wydzielanych mediatorów (cytokin, receptorów, czynników wzrostu) oddziałują na komórki podścieliska w taki sposób, że podtrzymuje ono wzrost i przeżycie komórek szpiczaka w organizmie [36]. Jednocześnie adhezja komórek szpiczaka do podścieliska indukuje zmiany kostne u chorych. Przypuszcza się, że główną przyczyną wzmoczonej osteolizy jest zaburzenie fizjologicznej równowagi układu RANKL/OPG przez komórki nowotworowe.

Komórki nowotworowe zmieniają miejscowo metabolizm kości przez zwiększenie ekspresji RANKL i obniżenie ekspresji OPG w mikrośrodowisku szpiku. Wytwarzane przez komórki szpiczaka chemokiny: MIP-1 α , MIP-1 β oraz SDF-1 α zwiększają aktywność osteoklastów [82]. Klon komórek nowotworowych dodatkowo blokuje funkcjonowanie osteoblastów przez wydzielanie czynników hamujących, takich jak białko DKK-1 (Dickkopf 1 protein) [101] i sFRP-2 (soluble Frizzled-related protein-2), które są inhibitorami drogi przekazu sygnału Wnt (Wingless-type) [75].

Białka Wnt są wydzielniczymi glikoproteinami uczestniczącymi w regulacji rozwoju embrionalnego, a także

w proliferacji i różnicowaniu wielu komórek, w tym osteoblastów [5]. Związanie białek Wnt z receptorem śródbłonkowym Frz (Frizzled) i jego koreceptorem, białkiem LRP-5/6 (lipoprotein-related protein 5 and 6) na powierzchni progenitorów osteoblastów, hamuje degradację β -kateniny, która gromadzi się w cytoplazmie, a następnie przemieszcza do jądra i wiąże z czynnikami transkrypcyjnymi TCF (ternary complex factor)/LEF (lymphoid-enhancing factor) stymulując ekspresję genów (np.: *c-myc*, *c-jun*, *fra-1* i cykliny D1) warunkujących różnicowanie osteoblastów [109]. Przy braku sygnału Wnt, kinaza serynowo-treoninowa GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) fosforyluje β -kateninę, która jest następnie degradowana w proteasomach. Białko DKK-1 wiążąc się z koreceptorem LRP5/6, natomiast sFRP2 łącząc się bezpośrednio z białkiem Wnt, blokują drogę przekazu sygnału Wnt, hamując w ten sposób różnicowanie osteoblastów.

Oprócz opisanej wyżej regulacji parakrynej, komórki szpiczakowe w bezpośrednim kontakcie z progenitorami osteoblastów w szpiku kostnym, blokują w nich aktywność czynnika transkrypcyjnego Runx2/Cbfa1 (co z kolei hamuje powstawanie i różnicowanie osteoblastów), a także indukują apoptozę osteoblastów [27,90].

W wyniku destrukcji kości uwalniane są i aktywowane składniki macierzy, w tym cytokiny, które z kolei są czynnikami wzrostowymi komórek nowotworowych. W rezultacie powstaje cykl wzajemnych interakcji nowotworu z komórkami podścieliska szpiku i tkanką kostną prowadzący do ekspansji komórek szpiczaka i dalszej osteolizy.

WPLYW KOMÓREK SZPICZAKA NA WYTWARZANIE RANKL I OPG

Prawdopodobnie istnieją trzy różne mechanizmy, poprzez które komórki szpiczaka mogą modulować wytwarzanie RANKL w mikrośrodowisku szpiku kostnego. Po pierwsze komórki szpiczaka mogą same wytwarzać RANKL i bezpośrednio stymulować tworzenie osteoklastów i resorpcję kości. Po drugie, komórki nowotworowe mogą zwiększać ekspresję RANKL lokalnie w komórkach podścieliska szpiku i w pośredni sposób wpływać na osteolizę. Po trzecie komórki szpiczaka mogą hamować wytwarzanie OPG [20].

Komórki szpiczaka jako bezpośrednie źródło RANKL

W szpiku kostnym, jak wykazano, głównym źródłem RANKL są komórki podścieliska, osteoblasty oraz komórki śródbłonka. Natomiast wyniki badań dotyczących wytwarzania RANKL przez komórki szpiczakowe są rozbieżne. Ekspresję RANKL badano różnymi metodami zarówno w plazmocytach izolowanych bezpośrednio od pacjentów, jak i w komórkach ludzkich i mysich linii szpiczaka. Na przykład, Pearse i wsp. [79] stwierdzili, że komórki wielu linii szpiczaka: ARP-1, U266, RPMI-8226, H929 i EBV-(+) ARH77 nie wytwarzają RANKL. Podobnie Giuliani i wsp. [25,26,29] nie stwierdzili ekspresji RANKL w komórkach ludzkich linii szpiczakowych zależnych od IL-6, takich jak: XG-1, XG-6 i MDN i niezależnych od IL-6 liniach U266, RPMI-8226, OPM-2, LP-1 i JLN-3, chociaż stwierdzili jego silną ekspresję w jednej EBV-(+) linii szpiczakowej. Zespół ten stosując metodę RT-PCR stwierdził brak eks-

presji RANKL w komórkach CD138+ (plazmocyty) izolowanych od pacjentów ze szpiczakiem. Roux i wsp. [84] stosując metodę immunohistochemiczną wykazali *ex vivo* ekspresję RANKL w komórkach podścieliska szpiku i jej brak w plazmocytach pacjentów ze szpiczakiem. Z kolei Farrugia i wsp. [24] metodą cytometrii przepływowej i RT-PCR wykazali ekspresję RANKL w komórkach plazmatycznych CD38+CD45+ pochodzących od pacjentów ze szpiczakiem i z osteolizą kości. Komórki te *in vitro* indukowały tworzenie osteoklastów. Zespół ten stwierdził także obecność mRNA i białka RANKL w liniach szpiczakowych EBV(-): RPMI8226, U266, WL-2 oraz EBV(+)- ARH-77. Podobnie Sezer i wsp. [32,33,34,88] metodami cytometrii przepływowej, immunocytochemii, a następnie RT-PCR, stwierdzili obecność RANKL w świeżo izolowanych od pacjentów komórkach szpiczakowych (CD138+) oraz dodatnią korelację między stopniem ekspresji RANKL a aktywnością procesu destrukcji kości u chorych na szpiczaka.

Niedawno, metodą RT-PCR, wykryto transkrypty dwu postaci RANKL w komórkach linii szpiczakowych, takich jak: LP-1, NCI-H929, OPM-2, RPMI8226 i U266, a także w komórkach szpiczakowych wyizolowanych bezpośrednio od pacjentów. Stosując metodę immunodetekcji wykryto RANKL na powierzchni tych komórek, co świadczy o aktywnej syntezie tego białka. W komórkach badanych linii stwierdzono także obecność mRNA RANK oraz proteazy TACE. RANKL obecny w komórkach linii RPMI8226 był aktywny biologicznie i stymulował powstawanie osteoklastów w kokulturach wyżej wymienionych komórek z jednodrzazastymi komórkami izolowanymi ze szpiku [57].

W mysim modelu szpiczaka wykazano, że kontakt komórek szpiczakowych z komórkami podścieliska powoduje ekspresję RANKL w obu typach komórek [76]. Ekspresję RANKL wykryto także w komórkach mysiej linii szpiczaka 5T2 [18].

Większość uzyskanych wyników badań sugeruje, że komórki szpiczaka mogą wytwarzać RANKL, a rozbieżności mogą wynikać z niestabilności transkryptu RANKL, a także różnic w sposobie oczyszczania komórek szpiczakowych i rodzaju stosowanych przeciwciał anti-RANKL.

Komórki szpiczaka stymulują ekspresję RANKL w środowisku szpiku kostnego

To, że komórki szpiczaka w bezpośrednim kontakcie z podścieliskiem szpiku indukują w nim ekspresję RANKL, jednocześnie obniżając ekspresję i wydzielanie OPG, nie budzi wątpliwości [25,79,84].

W kokulturach komórek ludzkich linii szpiczakowych z podścieliskiem szpiku kostnego człowieka lub myszy obserwowano zwiększoną ekspresję RANKL zarówno na poziomie mRNA, jak i białka [25,79]. Wykazano, że istotną rolę w indukcji RANKL ma bezpośredni kontakt między komórkami podścieliska i komórkami szpiczaka, ponieważ w kokulturze pośredniej, z użyciem półprzepuszczalnej membrany zapobiegającej bezpośredniemu kontaktowi komórek, a pozwalającej na swobodną dyfuzję płynu hodowlanego (tzw. transwell system), nie stwierdzono zwiększonej ekspresji RANKL. Główną rolę w bezpośred-

nim kontakcie między komórkami szpiczaka i podścieliska przypisuje się cząsteczkom adhezyjnym VLA-4 (very late antigen – 4) i VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), bowiem zastosowanie przeciwciał anti-VLA-4 całkowicie hamowało indukcję RANKL w podścielisku [25]. Także w mysim modelu osteolizy, zablokowanie wiązania między VLA-4 na komórkach szpiczaka a VCAM-1 na komórkach podścieliska hamowało uwalnianie czynników odpowiedzialnych za resorpcję kości i powodowało zmniejszenie osteolizy [64].

Najnowsze badania wykazały, że komórki szpiczaka wpływają również na ekspresję RANKL w limfocytach T, które oprócz komórek podścieliska i osteoblastów mogą być źródłem RANKL w mikrośrodowisku szpiku. Zarówno komórki ludzkich linii szpiczakowych, jak i świeżo izolowane od pacjentów plazmocyty zwiększały ekspresję i wydzielanie RANKL w aktywowanych limfocytach T w warunkach kokultury *in vitro*. Jednocześnie stwierdzono zmniejszenie wytwarzania IFN- γ , cytokiny silnie hamującej osteoklastogenezę [29]. Według niektórych autorów komórki szpiczaka regulują wytwarzanie RANKL w limfocytach T pośrednio z udziałem IL-7 [102,108]. Komórki ludzkich linii szpiczakowych, a także świeżo izolowane od pacjentów plazmocyty, wydzielają IL-7 w obecności IL-6, a przeciwciała przeciwko IL-7 hamują wytwarzanie RANKL w limfocytach T inkubowanych z komórkami szpiczaka. Neutralizacja IL-7 hamuje również proces indukowanej przez komórki szpiczaka osteoklastogenezы *in vitro* [29]. W regulację wytwarzania RANKL jest prawdopodobnie zaangażowana także IL-6, ponieważ IL-7 stymuluje wytwarzanie tej cytokiny przez komórki podścieliska szpiku kostnego, a z kolei IL-6 indukuje wytwarzanie IL-7 w komórkach szpiczaka. W ten sposób tworzy się cykl wzajemnych oddziaływań między IL-6 a IL-7 [29,45]. Duże stężenie IL-6 w środowisku szpiku kostnego może indukować wytwarzanie IL-7 w komórkach szpiczaka, które z kolei wytwarzają IL-6 i stymulują wytwarzanie RANKL przez limfocyty T [28].

Źródłem RANKL w środowisku szpiku kostnego mogą też być komórki śródbłonka naczyniowego, w których wykazano ekspresję RANKL i które *in vitro* podtrzymują tworzenie osteoklastów [16]. Komórki szpiczakowe przez cząsteczkę CD44 stymulują ekspresję RANKL w komórkach śródbłonka szpiku kostnego, które z kolei reagując z prekursorami osteoklastów stymulują ich różnicowanie [74].

Wpływ komórek szpiczaka na poziom OPG w szpiku kostnym

Komórki szpiczaka, co prawda same nie wytwarzają OPG, ale mogą regulować jej wytwarzanie w innych komórkach. Bezpośredni kontakt komórek szpiczaka z komórkami podścieliska szpiku i osteoblastami hamuje ekspresję OPG w komórkach podścieliska [25,79]. OPG jest wytwarzana także przez obecne w mikrośrodowisku szpiku komórki śródbłonka, a komórki szpiczakowe również mogą hamować jej wytwarzanie w tych komórkach [21]. Ponadto, komórki szpiczaka za pomocą obecnej na ich powierzchni cząsteczki CD138 (syndekan 1, śródbłonkowy proteoglikan zawierający boczne łańcuchy siarczanu heparyny) mogą wiązać obecną w środowisku OPG poprzez własną domenę heparynową, a następnie internalizować i degradować OPG w lizosomach [92].

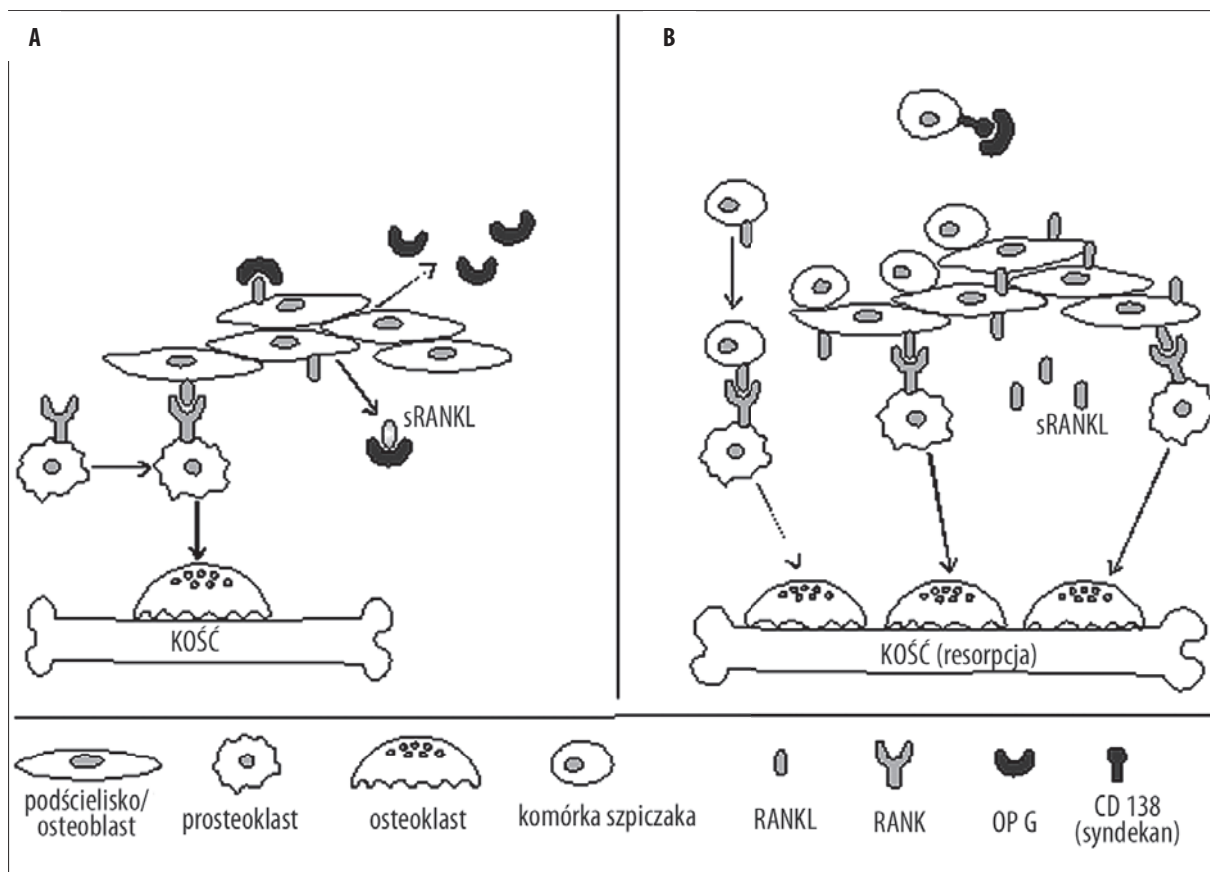
Istnieją dowody na to, że OPG w środowisku szpiku kostnego nie tylko reguluje metabolizm kostny, ale może pełnić inne funkcje, w tym wpływać na apoptozę komórek szpiczaka. Komórki szpiczaka mające receptory z różnymi domenami śmierci (DR4 i DR5) ulegają apoptozie w odpowiedzi na TRAIL [66]. Natomiast OPG rekombinowana oraz wytwarzana przez osteoblasty chroni komórki szpiczaka przed apoptozą indukowaną przez TRAIL [89]. Zbyt skąpe jednak są dane na temat lokalnego stężenia OPG w szpiku kostnym, a także roli, jaką OPG odgrywa w różnych stadiach rozwoju szpiczaka plazmocytoowego. Niezbędne więc są dalsze badania w celu ustalenia, czy OPG wpływa na przeżycie komórek nowotworowych *in vivo* [20].

Podsumowując, w wyniku zahamowania wytwarzania OPG, a także na skutek degradacji OPG przez komórki szpiczaka, w połączeniu ze stymulującym wpływem komórek szpiczaka na ekspresję RANKL w mikrośrodowisku szpiku kostnego oraz prawdopodobnie bezpośredniego wytwarzania RANKL przez komórki szpiczakowe, ulega zaburzeniu równowaga RANKL/OPG w kościach zasiedlonych przez komórki szpiczaka, stwarzając warunki sprzyjające różnicowaniu i aktywacji osteoklastów, a w rezultacie resorpcji kości (ryc. 1).

UKŁAD RANK/RANKL/OPG W BADANIACH PACJENTÓW ZE SZPICZAKIEM

W licznych badaniach *ex vivo* wykazano, że chorzy na szpiczaka wykazują zaburzenia w ekspresji OPG/RANKL w środowisku szpiku kostnego. Metodą immunohistochemii wykazano, że w biopsjach szpiku kostnego pobranych od chorych na szpiczaka podwyższona jest ekspresja RANKL i obniżona OPG w porównaniu z pacjentami z MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) czy osobami zdrowymi. Ekspresję RANKL zaobserwowano w śródkostnej, naczyniach oraz komórkach podścieliska, wykazujących także ekspresję wimentyny [84]. W próbkach szpiku pobranych od chorych na szpiczaka wykazano podwyższoną ekspresję mRNA RANKL w porównaniu z materiałem otrzymanym od zdrowych osób [25]. Również w badaniach *ex vivo* z zastosowaniem techniki immunohistochemicznych i hybrydyzacji *in situ* stwierdzono, że oprócz komórek podścieliska, ekspresję RANKL w materiale biopsyjnym wykazują aktywowane limfocyty T CD3+ [79]. Wyniki te zostały potwierdzone w badaniach Giulianiego i wsp. [29], którzy wykazali, że limfocyty T CD3+ izolowane od pacjentów ze szpiczakiem, u których występują znaczne zmiany destrukcyjne kości, wykazują ekspresję mRNA RANKL, w przeciwieństwie do limfocytów izolowanych od chorych bez zmian kostnych.

Zaburzenia układu RANKL/OPG obserwowane w środowisku szpiku kostnego u chorych na szpiczaka mogą znajdować odbicie w stężeniu tych dwóch cytokin w surowicy. Rozwinięte ostatnio metody badań umożliwiają ilościowe oznaczenie sRANKL oraz OPG [39]. Przy ocenie stężenia OPG w surowicy należy jednak brać pod uwagę to, że OPG wytwarzają także różne tkanki spoza układu kostnego. Poza tym występuje ona w krążeniu zarówno w wolnej postaci, jak i związana z sRANKL. Dostępne zestawy diagnostyczne mogą wykrywać różne jej postaci, co z kolei może powodować rozbieżności wyników różnych autorów [53].



Ryc. 1. Uproszczony schemat roli poszczególnych składników układu RANK/RANKL/OPG w regulacji osteoklastogenezy w warunkach prawidłowych (A) i w szpiczaku plazmocytowym (B); (A) RANKL obecny na komórkach podścieliska szpiku kostnego/osteoblastach, wiążąc się ze swoim receptorem RANK na prekursorach osteoklastów, indukuje tworzenie osteoklastów i resorpcję kości. Z kolei OPG wytwarzana również przez podścielisko/osteoblasty, wiąże zarówno błonowy, jak i rozpuszczalny RANKL, zapobiegając jego wiązaniu z RANK i hamując w ten sposób tworzenie osteoklastów; (B) Adhezja komórek szpiczakowych do podścieliska/osteoblastów zwiększa ekspresję RANKL i obniża ekspresję OPG, przez co wzmacnia się tworzenie osteoklastów. RANKL obecny na komórkach szpiczakowych może bezpośrednio wiązać się z RANK na prekursorach osteoklastów i niezależnie od podścieliska stymulować tworzenie osteoklastów. Obecny na komórkach szpiczakowych i uwalniany do środowiska syndekan 1 (CD138) może wiązać OPG, neutralizując jej działanie, co pośrednio zwiększa tworzenie osteoklastów

Wyniki badań, dotyczące stężenia OPG w surowicy chorych na szpiczaka, są rozbieżne. Seidel i wsp. [86] stwierdzili o 18% niższe stężenie OPG w surowicy chorych, niż w grupie kontrolnej osób zdrowych. Obserwowali przy tym ujemną korelację między poziomem OPG w surowicy chorych a nasileniem zmian osteolitycznych. OPG korelowała natomiast dodatnio z C-końcowym propeptydem prokolagenu typu I (PIPC – carboxy-terminal propeptide of type I procollagen), który jest białkiem uwalnianym w czasie syntezy kolagenu z cząsteczki prokolagenu typu I i jest biochemicznym markerem kościotworzenia. Lipton i wsp. [59] także obserwowali mniejsze o 29% stężenie OPG w surowicy chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Obniżony poziom OPG w surowicy pacjentów ze szpiczakiem stwierdzili też Giuliani i wsp. [25]. Corso i wsp. [17] natomiast, zaobserwowali o 34% wyższe stężenie OPG w surowicy krwi pacjentów ze szpiczakiem w porównaniu ze zdrowymi. Również Kyrtonis i wsp. [55] oraz Kraj i wsp. [12,53] stwierdzili większe stężenie OPG w surowicy krwi chorych w porównaniu z osobami zdrowymi, przy czym w badaniach Kraj i wsp. wykazano brak korelacji między ilością OPG a nasileniem osteolizy czy stadiem choroby. W grupie chorych na szpiczaka najwięk-

sze stężenie OPG występowało u pacjentów z zaburzoną funkcją nerek [53].

Badano także próbki plazmy uzyskane z aspiratów szpiku kostnego pacjentów chorych na szpiczaka i osób zdrowych. W badaniach Standala i wsp. [92] stężenie OPG w plazmie szpiku kostnego chorych było o 27% niższe niż u zdrowych osób, ale stwierdzono dwukrotnie wyższe stężenie tej cytokiny w plazmie szpiku niż w surowicy. W badaniach Kraj i wsp. [53] oraz Seidela i wsp. [86] stężenie OPG w surowicy dodatnio korelowało z ilością tej cytokiny w plazmie szpiku kostnego.

Niewiele jest prac oceniających rolę poziomu sRANKL w surowicy chorych na szpiczaka mnogiego. Terpos i wsp. [99] wykazali w surowicy nowo zdiagnozowanych pacjentów ze szpiczakiem wyższe stężenie sRANKL i niższe OPG w porównaniu z pacjentami kontrolnymi. Zwiększona wartość proporcji sRANKL do OPG w grupie chorych korelowała dodatnio ze stopniem osteolizy i markerami resorpcji kości. Autorzy sugerują, że proporcja sRANKL/OPG, wraz z poziomem β 2-mikroglobuliny i białka C-reaktywnego może być niezależnym czynnikiem prognostycznym

pozwalającym przewidzieć czas przeżycia pacjentów ze szpiczakiem. W kolejnej pracy, ten sam zespół stwierdził wyższe stężenie sRANKL w surowicy oraz zwiększoną wartość proporcji sRANKL/OPG u pacjentów z MGUS w porównaniu z osobami zdrowymi, natomiast niższą wartość sRANKL/OPG w porównaniu z chorymi na szpiczaka w I i II stadium choroby [80].

Odmienne wyniki otrzymała natomiast Kraj i wsp. [13,53], którzy nie stwierdzili statystycznie istotnej różnicy między stężeniem sRANKL w surowicy pacjentów ze szpiczakiem w porównaniu z osobami zdrowymi oraz wykazali podobną wartość proporcji sRANKL/OPG w obu badanych grupach. Stężenie sRANKL w surowicy chorych nie korelowało przy tym ze stadium choroby ani z objawami zmian kostnych, natomiast dodatnio korelowało ze stężeniem tej cytokiny w plazmie szpiku kostnego. Na podstawie wyżej opisanych wyników można przyjąć, że oznaczanie wartości proporcji sRANKL/OPG w szpiku kostnym i surowicy nie ma wartości klinicznej, ale wyniki uzyskane przez innych autorów [80,92] wskazują na potrzebę dalszych badań w tym zakresie.

RANK/RANKL/OPG JAKO UKŁAD DOCELOWY W LECZENIU SZPICZAKA PLAZMOCYTOWEGO

Ścisłe powiązanie między progresją szpiczaka i resorpcją kości stwarza możliwość zatrzymania cyklu wzajemnych oddziaływań. Na przykład zastosowanie inhibitorów osteoklastów we wczesnej fazie rozwoju choroby mogłoby skutecznie zahamować nie tylko destrukcję kości, ale także rozrost nowotworu.

Obecnie leczenie szpiczaka mnogiego polega przede wszystkim na intensywnej terapii cytostatykami, mającej na celu zniszczenie komórek nowotworowych. W leczeniu zmian osteolitycznych oraz hiperkalcemii stosuje się leki wspomagające, hamujące aktywność osteoklastów, takie jak: kortykosteroidy, bifosfoniany oraz kalcytoninę.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Akatsu T., Murakami T., Nishikawa M., Ono K., Shinomiya N., Tsuda E., Mochizuki S. I., Yamaguchi K., Kinosaki M., Higashio K., Yamamoto M., Motoyoshi K., Nagata N.: Osteoclastogenesis-inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 250: 229–234
- [2] 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., Galibert L.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 1997; 390: 175–179
- [3] Arron J.R., Vologodskaja M., Wong B.R., Naramura M., Kim N., Gu H., Choi Y.: A positive regulatory role for Cbl family proteins in tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (trance) and CD40L-mediated Akt activation. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 30011–30017
- [4] Bachmann M.F., Wong B.R., Josien R., Steinman R.M., Oxenius A., Choi Y.: TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J. Exp. Med.*, 1999; 189: 1025–1031
- [5] Bain G., Müller T., Wang X., Papkoff J.: Activated β -catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 301: 84–91
- [6] Bataille R., Manolagas S.C., Berenson J.R.: Pathogenesis and management of bone lesions in multiple myeloma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 1997; 11: 349–361
- [7] Bekker P.J., Holloway D.L., Rasmussen A.S., Murphy R., Martin S.W., Leese P.T., Holmes G.B., Dunstan C.R., DePaoli A.M.: 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
- [8] Bendre M.S., Montague D.C., Peery T., Akel N.S., Gaddy D., Suva L.J.: Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone*, 2003; 33: 28–37
- [9] Body J.J., Greipp P., Coleman R.E., Facon T., Geurs F., Femand J.P., Harousseau J.L., Lipton A., Mariette X., Williams C.D., Nakanishi A., Holloway D., Martin S.W., Dunstan C.R., Bekker P.J.: A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer*, 2003; 97(Suppl.): 887–892
- [10] Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L.: Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003; 423: 337–342
- [11] Breuil V., Schmid-Antomarchi H., Schmid-Alliana A., Rezzonico R., Euler-Ziegler L., Rossi B.: The receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes. *FASEB J.*, 2003; 17: 1751–1753
- [12] Centkowski P., Kraj M., Kruk B.: Serum osteoprotegerin levels are not reduced in multiple myeloma. *Acta Haematol. Pol.*, 2003; 34: 107–114
- [13] Centkowski P., Kraj M., Kruk B., Sokolowska U.: Osteoprotegerin and sRANKL serum levels in multiple myeloma patients. *Central European J. Immunol.*, 2002; 27: 129–135

Bifosfoniany, najczęściej stosowane leki antyresorpcyjne, nie tylko hamują aktywność osteoklastów, ale też stymulują wytwarzanie OPG i hamują ekspresję RANKL w osteoblastach [78,105]. W fazie badań jest natomiast stosowanie antagonistów RANKL w leczeniu chorób resorpcyjnych kości.

W badaniach przeprowadzonych z zastosowaniem mysiego modelu, podanie RANK-Fc, białka powstałego w wyniku fuzji mysiego RANK z fragmentem Fc ludzkiej IgG, całkowicie blokowało destrukcję kości i redukowało liczbę osteoklastów u myszy SCID z przeszczepionym szpiczakiem (linia szpiczakowa ARH-77 lub pierwotne ludzkie komórki szpiczakowe). Następowo również znaczne zahamowanie rozwoju nowotworu [79]. Podobnie rekombinowana OPG hamowała powstawanie zmian osteolitycznych w mysim modelu szpiczaka z użyciem komórek linii 5T2MM, a także obniżała nasilenie zmian osteolitycznych i hamowała rozwój nowotworu w szpiczaku indukowanym przez komórki 5T33MM [18,104].

W fazie I badań klinicznych przeprowadzonych u pacjentów ze szpiczakiem oraz u chorych na nowotwór piersi z przerzutami do kości, podanie rekombinowanej OPG spowodowało obniżenie biochemicznych markerów resorpcji kości [9]. W najnowszych badaniach przeprowadzonych u 49 kobiet po menopauzie z zaawansowaną osteoporozą potwierdzono bezpieczeństwo i antyresorpcyjne działanie podanych podskórnie, w pojedynczej dawce, ludzkich monoklonalnych przeciwciał anti-RANKL [7]. Wyniki te uzasadniają konieczność przeprowadzenia dalszych prób klinicznych, których celem byłaby modulacja układu RANKL/OPG w szpiczaku mnogim.

PODZIĘKOWANIE

Autorki dziękują Pani mgr Annie Tustanowskiej-Stachurze za graficzne opracowanie ryciny.

- [14] Chesneau V., Becherer J.D., Zheng Y., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Blobel C.P.: Catalytic properties of ADAM 19. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 22331–22340
- [15] Chikazu D., Katagiri M., Ogasawara T., Ogata N., Shimoaka T., Takato T., Nakamura K., Kawaguchi H.: Regulation of osteoclast differentiation by fibroblast growth factor 2: stimulation of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor expression in osteoblasts and inhibition of macrophage colony-stimulating factor function in osteoclast precursors. *J. Bone Miner. Res.*, 2001; 16: 2074–2081
- [16] Collin-Osdoby P., Rothe L., Anderson F., Nelson M., Maloney W., Osdoby P.: Receptor activator of NF- κ B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 20659–20672
- [17] Corso A., Dovic A., Rusconi C., Sartori M.L., Klersy C., Varettoni M., Mangiacavalli S., Zappasodi P., Ventura M., Angeli A., Lazzarino M.: Osteoprotegerin serum levels in multiple myeloma and MGUS patients compared with age- and sex-matched healthy controls. *Leukemia*, 2004; 18: 1555–1557
- [18] Croucher P.I., Shipman C.M., Lippitt J., Perry M., Asosingh K., Hijzen A., Brabbs A.C., van Beek E.J., Holen I., Skerry T.M., Dunstan C.R., Russell G.R., Van Camp B., Vanderkerken K.: Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*, 2001; 98: 3534–3540
- [19] Darnay B.G., Haridas V., Ni J., Moore P.A., Aggarwal B.B.: Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappa B (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 20551–20555
- [20] De Leenheer E., Mueller G.S., Vanderkerken K., Croucher P.I.: Evidence of a role for RANKL in the development of myeloma bone disease. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2004; 4: 340–346
- [21] De Leenheer E., Vanderkerken K., Bakkus M., Van Camp B., Shipman C.M., Croucher P.: Bone marrow endothelial cells express the osteoclastogenic factor RANKL and its decoy receptor OPG: evidence for a role in the development of myeloma bone disease [abstract 784]. *Blood*, 2002; 100: 209
- [22] Durie B.G., Salmon S.E., Mundy G.R.: Relation of osteoclast activating factor production to extent of bone disease in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 1981; 47: 21–30
- [23] Emery J.G., McDonnell P., Burke M.B., Deen K.C., Lyn S., Silverman C., Dul E., Appelbaum E.R., Eichman C., DiPrinzio R., Dodds R.A., James I.E., Rosenberg M., Lee J.C., Young P.R.: Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 14363–14367
- [24] Farrugia A.N., Atkins G.J., To L.B., Pan B., Horvath N., Kostakis P., Findlay D.M., Bardy P., Zannettino A.C.: Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation *in vitro* and correlates with bone destruction *in vivo*. *Cancer Res.*, 2003; 63: 5438–5445
- [25] Giuliani N., Bataille R., Mancini C., Lazzaretti M., Barillé S.: Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood*, 2001; 98: 3527–3533
- [26] Giuliani N., Colla S., Morandi F., Barillé-Nion S., Rizzoli V.: Lack of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) expression and functional production by human multiple myeloma cells. *Haematologica* 2005; 90: 275–278
- [27] Giuliani N., Colla S., Morandi F., Lazzaretti M., Sala R., Bonomini S., Grano M., Colucci S., Svaldi M., Rizzoli V.: Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood*, 2005; 106: 2472–2483
- [28] Giuliani N., Colla S., Rizzoli V.: New insight in the mechanism of osteoclast activation and formation in multiple myeloma: focus on the receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). *Exp. Hematol.*, 2004; 32: 685–691
- [29] Giuliani N., Colla S., Sala R., Moroni M., Lazzaretti M., La Monica S., Bonomini S., Hojden M., Sammarelli G., Barillé S., Bataille R., Rizzoli V.: Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood*, 2002; 100: 4615–4621
- [30] Glantschnig H., Fisher J.E., Wesolowski G., Rodan G.A., Reszka A.A.: M-CSF, TNF-alpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ.*, 2003; 10: 1165–1177
- [31] Hakeda Y., Kobayashi Y., Yamaguchi K., Yasuda H., Tsuda E., Higashio K., Miyata T., Kumegawa M.: Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 251: 796–801
- [32] Heider U., Langelotz C., Jakob C., Zavrski I., Fleissner C., Eucker J., Possinger K., Hofbauer L.C., Sezer O.: Expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 1436–1440
- [33] Heider U., Zavrski I., Jakob C., Bänderoth K., Fleissner C., Langelotz C., Possinger K., Hofbauer L.C., Viereck V., Sezer O.: Expression of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) mRNA in human multiple myeloma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2004; 130: 469–474
- [34] Heider U., Zavrski I., Jakob C., Fleissner C., Sezer O.: Identification and clinical relevance of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand expression of myeloma cells. *Cancer Res.*, 2004; 64: 773–774
- [35] Henriksen K., Karsdal M., Delaisse J.M., Engsig M.T.: RANKL and vascular endothelial growth factor (VEGF) induce osteoclast chemotaxis through an ERK2-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 48745–48753
- [36] Hideshima T., Bergsagel W. Kuehl W.M., Anderson K.C.: Advances in biology of multiple myeloma: clinical application. *Blood*, 2004; 104: 607–618
- [37] Hoefflich K.P., Yeh W.C., Yao Z., Mak T.W., Woodgett J.R.: Mediation of TNF receptor-associated factor effector functions by apoptosis signaling-regulating kinase-1 (ASK-1). *Oncogene*, 1999; 18: 5814–5820
- [38] Hofbauer L.C., Heufelder A.E.: Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J. Mol. Med.*, 2001; 79: 243–253
- [39] Hofbauer L.C., Schoppert M.: Serum measurement of osteoprotegerin – clinical relevance and potential applications. *Eur. J. Endocrinol.*, 2001; 145: 681–683
- [40] Holen I., Croucher P.I., Hamdy F.C., Eaton C.L.: Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 2002; 62: 1619–1623
- [41] Hsu H., Lacey D.L., Dunstan C.R., Solovyev I., Colombero A., Timms E., Tan H.L., Elliott G., Kelley M.J., Sarosi I., Wang L., Xia X.Z., Elliott R., Chiu L., Black T., Scully S., Capparelli C., Morony S., Shimamoto G., Bass M.B., Boyle W.J.: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 3540–3545
- [42] Ikeda T., Kasai M., Suzuki J., Kuroyama H., Seki S., Utsuyama M., Hirokawa K.: Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 47217–47222
- [43] Ikeda F., Nishimura R., Matsubara T., Tanaka S., Inoue J., Reddy S. V., Hata K., Yamashita K., Hiraga T., Watanabe T., Kukita T., Yoshioka K., Rao A., Yoneda T.: Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J. Clin. Invest.*, 2004; 114: 475–484
- [44] Ishida A., Fujita N., Kitazawa R., Tsuruo T.: Transforming growth factor-beta induces expression of receptor activator of NF-kappa B ligand in vascular endothelial cells derived from bone. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 26217–26224
- [45] Iwata M., Graf L., Awaya N., Torok-Storb B.: Functional interleukin-7 receptors (IL-7Rs) are expressed by marrow stromal cells: binding of IL-7 increases levels of IL-6 mRNA and secreted protein. *Blood*, 2002; 100: 1318–1325
- [46] Josien R., Wong B.R., Li H.L., Steinman R.M., Choi Y.: TRANCE, a TNF family member, is differentially expressed on T cell subsets and induces cytokine production in dendritic cells. *J. Immunol.*, 1999; 162: 2562–2568
- [47] Kartsogiannis V., Zhou H., Horwood N.J., Thomas R.J., Hards D.K., Quinn J.M., Niforas P., Ng K.W., Martin T.J., Gillespie M.T.: Localization of RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone*, 1999; 25: 525–534
- [48] Kim H.H., Lee D.E., Shin J.N., Lee Y.S., Jeon Y.M., Chung C.H., Ni J., Kwon B.S., Lee Z.H.: Receptor activator of NF-kappa B recruits multiple TRAF family adaptors and activates c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett.*, 1999; 443: 297–302
- [49] Kim H.H., Shin H.S., Kwak H.J., Ahnky K.Y., Kim J.H., Lee H.J., Lee M.S., Lee Z.H., Koh G.Y.: RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *FASEB J.*, 2003; 17: 2163–2165

- [50] Koga T., Inui M., Inoue K., Kim S., Suematsu A., Kobayashi E., Iwata T., Ohnishi H., Matozaki T., Kodama T., Taniguchi T., Takayanagi H., Takai T.: Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature*, 2004; 428: 758–763
- [51] Kong Y.Y., Feige U., Sarosi I., Bolon B., Tafuri A., Morony S., Capparelli C., Li J., Elliott R., McCabe S., Wong T., Campagnuolo G., Moran E., Bogoch E.R., Van G., Nguyen L.T., Ohashi P.S., Lacey D.L., Fish E., Boyle W.J., Penninger J.M.: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 1999; 402: 304–309
- [52] 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., Khoo W., Wakeham A., Dunstan C.R., Lacey D.L., Mak T.W., Boyle W.J., Penninger J.M.: OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 1999; 397: 315–323
- [53] Kraj M., Owczarska K., Sokołowska U., Centkowski P., Poglód R., Kruk B.: Correlation of osteoprotegerin and sRANKL concentrations in serum and bone marrow of multiple myeloma patients. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2005; 53: 454–464
- [54] Kwon B.S., Wang S., Udagawa N., Haridas V., Lee Z.H., Kim K.K., Oh K.O., Greene J., Li Y., Su J., Gentz R., Aggarwal B.B., Ni J.: TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J.*, 1998; 12: 845–854
- [55] Kyrtsonis M.C., Vassilakopoulos T.P., Siakantaris M.P., Kokoris S.I., Gribabis D.A., Dimopoulou M.N., Angelopoulou M.K., Pangalis G.A.: Serum syndecan-1, basic fibroblast growth factor and osteoprotegerin in myeloma patients at diagnosis and during the course of the disease. *Eur. J. Haematol.*, 2004; 72: 252–258
- [56] Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W.J.: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998; 93: 165–176
- [57] Lai F.P., Cole-Sinclair M., Cheng W.J., Quinn J.M.W., Gillespie M.T., Sentry J.W., Schneider H.G.: Myeloma cells can directly contribute to the pool of RANKL in bone bypassing the classic stromal and osteoblast pathway of osteoclast stimulation. *Br. J. Haematol.*, 2004; 126: 192–201
- [58] Lam J., Nelson C.A., Ross F.P., Teitelbaum S.L., Fremont D.H.: Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J. Clin. Invest.*, 2001; 108: 971–979
- [59] Lipton A., Ali S.M., Leitzel K., Chinchilli V., Witters L., Engle L., Holloway D., Bekker P., Dunstan C.R.: Serum osteoprotegerin levels in healthy controls and cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 2306–2310
- [60] Lum L., Wong B.R., Josien R., Becherer J.D., Erdjument-Bromage H., Schlondorff J., Tempst P., Choi Y., Blobel C.P.: Evidence for a role of a tumor necrosis factor- α (TNF- α)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 13613–13618
- [61] Malyankar U.M., Scatena M., Suchland K.L., Yun T.J., Clark E.A., Giachelli C.M.: Osteoprotegerin is an α v β 3-induced, NF- κ B-dependent survival factor for endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 20959–20962
- [62] Martín T.J., Sims N.A.: Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends. Mol. Med.*, 2005; 11: 76–81
- [63] Matsuo K., Owens J.M., Tonko M., Elliott C., Chambers T.J., Wagner E.F.: Fos1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat. Genet.*, 2000; 24: 184–187
- [64] Michigami T., Shimizu N., Williams P.J., Niewolna M., Dallas S.L., Mundy G.R., Yoneda T.: Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and α (4) β (1)-integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood*, 2000; 96: 1953–1960
- [65] Min J.K., Kim Y.M., Kim Y.M., Kim E.C., Gho Y.S., Kang I.J., Lee S.Y., Kong Y.Y., Kwon Y.G.: Vascular endothelial growth factor up-regulates expression of receptor activator of NF- κ B (RANK) in endothelial cells: Concomitant increase of angiogenic responses to RANK ligand. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 39548–39557
- [66] Mitsiades C.S., Treon S.P., Mitsiades N., Shima Y., Richardson P., Schlossman R., Hideshima T., Anderson K.C.: TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood*, 2001; 98: 795–804
- [67] Miyamoto T., Ohneda O., Arai F., Iwamoto K., Okada S., Takagi K., Anderson D.M., Suda T.: Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood*, 2001; 98: 2544–2554
- [68] Mizukami J., Takaesu G., Akatsuka H., Sakurai H., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K., Sakurai N.: Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol. Cell Biol.*, 2002; 22: 992–1000
- [69] Morinaga T., Nakagawa N., Yasuda H., Tsuda E., Higashio K.: Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. *Eur. J. Biochem.*, 1998; 254: 685–691
- [70] Mukohyama H., Ransjo M., Taniguchi H., Ohyama T., Lerner U.H.: The inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylylate cyclase-activating polypeptide on osteoclast formation are associated with upregulation of osteoprotegerin and downregulation of RANKL and RANK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 271: 158–163
- [71] Nagai M., Kyakumoto S., Sato N.: Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 269: 532–536
- [72] Nakagawa N., Kinosaki M., Yamaguchi K., Shima N., Yasuda H., Yano K., Morinaga T., Higashio K.: RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 253: 395–400
- [73] Nakashima T., Kobayashi Y., Yamasaki S., Kawakami A., Eguchi K., Sasaki H., Sakai H.: Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 275: 768–775
- [74] Okada T., Akikusa S., Okuno H., Kodaka M.: Bone marrow metastatic myeloma cells promote osteoclastogenesis through RANKL on endothelial cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 2003; 20: 639–646
- [75] Oshita T., Abe M., Asano J., Hara T., Kitazoe K., Sekimoto E., Tanaka Y., Shibata H., Hashimoto T., Ozaki S., Kido S., Inoue D., Matsumoto T.: Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood*, 2005; 106: 3160–3165
- [76] Oyajobi B.O., Traianedes K., Yoneda T., Mundy G.R.: Expression of Rank ligand (RANKL) by myeloma cells requires binding to bone marrow stromal cells via an α 4 β 1-VCAM-1 interaction. *Bone*, 1998; 23: 180
- [77] Palmqvist P., Persson E., Conaway H.H., Lerner U.H.: IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- κ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- κ B in mouse calvariae. *J. Immunol.*, 2002; 169: 3353–3362
- [78] Pan B., Farrugia A.N., To L.B., Findlay D.M., Green J., Lynch K., Zannettino A.C.: The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF- α converting enzyme (TACE). *J. Bone Miner. Res.*, 2004; 19: 147–154
- [79] Pearce R.N., Sordillo E.M., Yaccoby S., Wong B.R., Liau D.F., Colman N., Michaeli J., Epstein J., Choi Y.: Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 11581–11586
- [80] Politou M., Terpos E., Anagnostopoulos A., Szydło R., Laffan M., Layton M., Apperley J.F., Dimopoulos M.A., Rahemtulla A.: Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin and macrophage protein 1- α (MIP-1 α) in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Br. J. Haematol.*, 2004; 126: 686–689
- [81] Quinn J.M., Itoh K., Udagawa N., Hausler K., Yasuda H., Shima N., Mizuno A., Higashio K., Takahashi N., Suda T., Martín T.J., Gillespie M.T.: Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect action. *J. Bone Miner. Res.*, 2001; 16: 1787–1794
- [82] Roodman G.D.: Pathogenesis of myeloma bone disease. *Blond Cells Mol. Dis.*, 2004; 32: 290–292
- [83] Roodman G.D.: Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr. Rev.*, 1996; 17: 308–332
- [84] Roux S., Meignin V., Quillard J., Meduri G., Guiochon-Mantel A., Ferman J.P., Milgrom E., Mariette X.: RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B) and RANKL expression in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 2002; 117: 86–92
- [85] Rubin J., Ackert-Bicknell C.L., Zhu L., Fan X., Murphy T.C., Nanes M.S., Marcus R., Holloway L., Beamer W.G., Rosen C.J.: IGF-1 regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand *in vitro* and OPG *in vivo*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002; 87: 4273–4279

- [86] Seidel C., Hjertner O., Abildgaard N., Heickendorff L., Hjorth M., Westin J., Nielsen J.L., Hjorth-Hansen H., Waage A., Sundan A., Borset M., Nordic Myeloma Study Group: Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood*, 2001; 98: 2269–2271
- [87] Seshasayee D., Wang H., Lee W.P., Gribling P., Ross J., Van Bruggen N., Carano R., Grewal I.S.: A novel *in vivo* role for osteoprotegerin ligand in activation of monocyte effector function and inflammatory response. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 30202–30209
- [88] Sezer O., Heider U., Jakob C., Zavrski I., Eucker J., Possinger K., Sers C., Krenn V.: Immunocytochemistry reveals RANKL expression of myeloma cells. *Blood*, 2002; 99:4646–4647
- [89] Shipman C.M., Croucher P.I.: Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res.*, 2003; 63: 912–916
- [90] Silvestris F., Cafforio P., Calvani N., Dammacco F.: Impaired osteoblastogenesis in myeloma bone disease: role of upregulated apoptosis by cytokines and malignant plasma cells. *Br. J. Haematol.*, 2004; 126: 475–486
- [91] Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kelley M., Chang M.S., Lüthy R., Nguyen H.Q., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan H.L., Trail G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes T.M., Hill D., Patisson W., Campbell P., Sander S., Van G., Tarpley J., Derby P., Lee R., Boyle W.J.: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997; 89: 309–319
- [92] Standal T., Seidel C., Hjertner O., Plesner T., Sanderson R.D., Waage A., Borset M., Sundan A.: Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*, 2002; 100: 3925–3929
- [93] Suzuki J., Ikeda T., Kuroyama H., Seki S., Kasai M., Utsuyama M., Tatsumi M., Uematsu H., Hirokawa K.: Regulation of osteoclastogenesis by three human RANKL isoforms expressed in NIH3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004; 314: 1021–1027
- [94] Takai H., Kanematsu M., Yano K., Tsuda E., Higashio K., Ikeda K., Watanabe K., Yamada Y.: Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 27091–27096
- [95] Takayanagi H., Kim S., Matsuo K., Suzuki H., Suzuki T., Sato K., Yokochi T., Oda H., Nakamura K., Ida N., Wagner E. F., Taniguchi T.: RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature*, 2002; 416: 744–749
- [96] Takayanagi H., Ogasawara K., Hida S., Chiba T., Murata S., Sato K., Takaoka A., Yokochi T., Oda H., Tanaka K., Nakamura K., Taniguchi T.: T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling crosstalk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*, 2000; 408: 600–605
- [97] Tan K.B., Harrop J., Reddy M., Young P., Terrett J., Emery J., Moore G., Truneh A.: Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene*, 1997; 204: 35–46
- [98] Terpos E., Dimopoulos M.A.: Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Ann. Oncol.*, 2005; 16: 1223–1231
- [99] Terpos E., Szydlo R., Apperley J.F., Hatjiharissi E., Politou M., Meletis J., Viniou N., Yataganas X., Goldman J.M., Rahemtulla A.: Soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand – osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood*, 2003; 102: 1064–1069
- [100] Theoleyre S., Wittrant Y., Kwan Tat S., Fortun Y., Radini F., Heymann D.: The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2004; 15: 457–475
- [101] Tian E., Zhan F., Walker R., Rasmussen E., Ma Y., Barlogie B., Shaughnessy J.D.Jr.: The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.*, 2003; 349: 2483–2496
- [102] Toraldo G., Roggia C., Qian W.P., Pacifici R., Weitzmann M.N.: IL-7 induces bone loss *in vivo* by induction of receptor activator of nuclear factor κ B ligand and tumor necrosis factor α from T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 125–130
- [103] Udagawa N., Takahashi N., Yasuda H., Mizuno A., Itoh K., Ueno Y., Shinki T., Gillespie M.T., Martin T.J., Higashio K., Suda T.: Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 2000; 141:3478–3484
- [104] Vanderkerken K., De Leenheer E., Shipman C.M., Asosingh K., Willems A., Van Camp B., Croucher P.: Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma. *Cancer Res.*, 2003; 63: 287–289
- [105] Viereck V., Emons G., Lauck V., Frosch K.H., Blaschke S., Grundker C., Hofbauer L. C.: Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 291: 680–686
- [106] Wada T., Nakashima T., Oliveira-dos-Santos A.J., Gasser J., Hara H., Schett G., Penninger J.M.: The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis. *Nat. Med.*, 2005; 11: 394–399
- [107] Wei S., Teitelbaum S.L., Wang M.W., Ross F.P.: Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand activates nuclear factor-kappaB in osteoclast precursors. *Endocrinology*, 2001; 142: 1290–1295
- [108] Weitzmann M.N., Cenci S., Rifas L., Brown C., Pacifici R.: Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines. *Blood*, 2000; 96: 1873–1878
- [109] Westendorf J.J., Kahler R.A., Schroeder T.M.: Wnt signalling in osteoblasts and bone disease. *Gene*, 2004; 341: 19–39
- [110] Wong B.R., Besser D., Kim N., Arron J.R., Vologodskaja M., Hanafusa H., Choi Y.: TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol. Cell.*, 1999; 4: 1041–1049
- [111] Wong B.R., Josien R., Lee S.Y., Sauter B., Li H.L., Steinman R.M., Choi Y.: TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 2075–2080
- [112] Wong B.R., Josien R., Lee S.Y., Vologodskaja M., Steinman R.M., Choi Y.: The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 28355–28359
- [113] Wong B.R., Rho J., Arron J., Robinson E., Orlinick J., Chao M., Kalachikov S., Cayani E., Bartlett F.S. III, Frankel W.N., Lee S.Y., Choi Y.: 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
- [114] Yamaguchi K., Kinoshita M., Goto M., Kobayashi F., Tsuda T., Morinaga T., Higashio K.: Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 5117–5123
- [115] Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Mochizuki S.I., Yano K., Fujise N., Sato Y., Goto M., Yamaguchi K., Kuriyama M., Kanno T., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K.: Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology*, 1998; 139: 1329–1337
- [116] Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinoshita M., Mochizuki S.I., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T.: 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
- [117] Yun T.J., Chaudhary P.M., Shu G.L., Frazer J.K., Ewings M.K., Schwartz S.M., Pascual V., Hood L.E., Clark E.A.: OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J. Immunol.*, 1998; 161: 6113–6121