

University of Groningen

Probing the ligand receptor interface of TNF ligand family members RANKL and TRAIL

Wang, Yizhou

DOI:
[10.33612/diss.127959201](https://doi.org/10.33612/diss.127959201)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Wang, Y. (2020). *Probing the ligand receptor interface of TNF ligand family members RANKL and TRAIL*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.127959201>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 8

Summary and future perspectives

During the last two decades, research has shown that the tumor necrosis factor (TNF) superfamily is of importance in numerous biological activities, such as mediating cellular apoptosis, survival, differentiation or proliferation. The binding between the TNF superfamily ligands and receptors regulates normal physiological processes, while the deregulation may cause harmful effects [1]. Therefore, targeting TNF superfamily ligands or receptors with either agonistic or antagonistic molecules may provide novel approaches for therapy. The work described in this thesis is focused on the ligand-receptor interface of TNF super family members Ligand of Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANKL) and TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), to design and characterization novel recombinant RANKL and TRAIL variants for their use as potential therapeutics.

Chapter 2 of this thesis provides a review on the RANKL/RANK pathway as a therapeutic target for bone diseases. This pathway is inhibited by the RANKL-specific monoclonal antibody Denosumab, which is clinically used to treat osteoporosis, but also by the natural, soluble decoy receptor of RANKL, osteoprotegerin (OPG). Alternatively, the receptor RANK can be inhibited by RANKL variants with antagonistic properties. Finally, the possibility to create antagonistic molecules by changing the stoichiometry of the receptor is discussed, which can further break the signal transduction. Taken together, interfering with the RANKL/RANK/OPG pathway is a promising strategy to develop therapeutics for bone diseases.

In **Chapter 3**, antagonistic variants of RANKL have been designed by the introduction of mutations at position I248 in the mRANKL DE-loop, and their effects on the binding to mRANK and subsequent osteoclastogenesis is investigated. Two single mutants, RANKL I248Y and I248K, show increased binding affinity to RANK compared to RANKL WT, which is mainly caused by an increase in the association rate constant (k_a). Competitive ELISA results also show both RANKL I248K and I248Y can efficiently compete with RANKL WT for RANK-Fc binding. Interestingly, although RANKL I248Y and I248K are still able to induce osteoclastogenesis at a 20-30% lower rate than RANKL WT, these two variants are able to reduce RANKL WT-mediated osteoclastogenesis already at low concentrations. Taken together (shown in Figure 1), our data show that the DE-loop of RANKL is of importance for RANK binding and RANKL mutants I248Y and I248K can reduce RANKL WT-induced osteoclastogenesis. These two RANKL mutants may form a starting point for the development of novel therapeutic proteins in osteoporosis treatments.

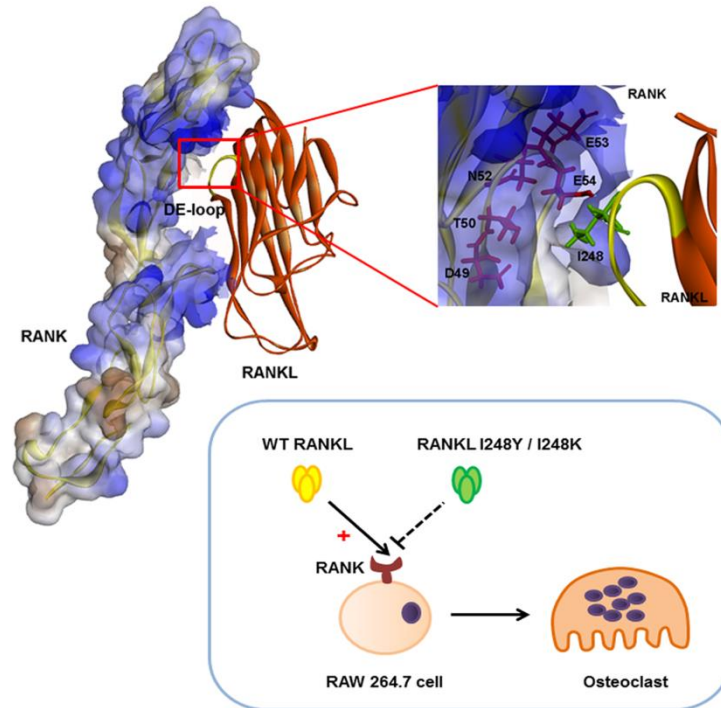


Figure 1. Novel RANKL DE-loop mutants I248Y and I248K reduce RANKL WT-induced osteoclastogenesis.

Recent studies show that the RANKL-RANK pathway has physiological and pathological effects on tissues other than bone. Interestingly, this system may play a role in fibrosis [2]. In **Chapter 4**, we hypothesized that RANKL could stimulate RANK on macrophages and activate the process of extracellular matrix (ECM) degradation in fibrotic tissue, which might be inhibited by highly expressed OPG. Therefore, the aim of this study was to create RANKL mutants that bind to RANK but not to OPG, and thus reduce ECM. We compared the 3D structures of RANKL-RANK and RANKL-OPG and built up a structure-based RANKL mutant library containing 44 RANKL mutants. Our results show that the RANKL Q236 position is of importance for OPG binding. One single mutant RANKL_Q236D has approximately a 30-time decrease in affinity to OPG-Fc compared to RANKL_WT. Pleasingly, RANKL_Q236D is also very effective in activating murine RAW 264.7 macrophages and to escape from the blockade by exogenous OPG (shown in Figure 2). RANKL mutants with reduced binding to OPG show potential anti-fibrosis activity, which offers a promising strategy to explore new therapeutics against fibrosis.

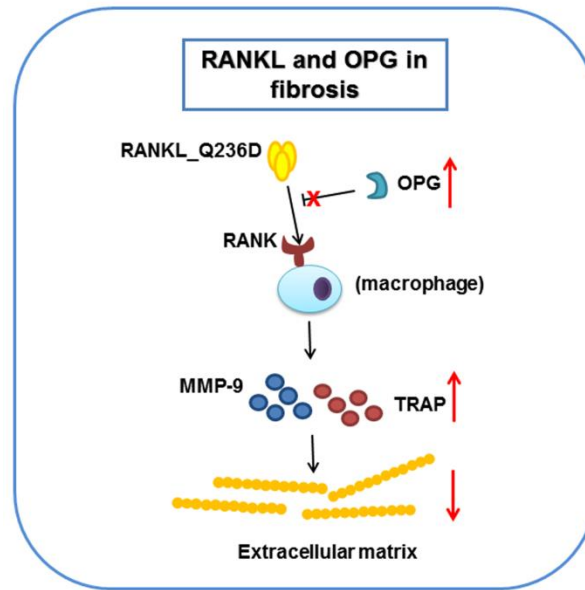


Figure 2. RANKL_Q236D is able to escape from the blockade by exogenous OPG and activate RAW cells to initiate the ECM degradation process.

As a continuation of the study on RANKL mutants with low affinity for OPG and their potential anti-fibrosis activity, in **Chapter 5**, we constructed adenoviruses Ad-RANKL WT and Ad-RANKL Q236D (shown in Figure 3). The aim of this study was to achieve a targeting delivery system by directly produce RANKL_Q236D in the fibrotic tissues without influencing other tissues. We found that by infecting C10 cells with Ad-RANKL WT/Q236D, secreted RANKL protein can be detected up to 19 days with protein levels up to 30 nM, which shows the long-term potential of delivering the proteins via an adenovirus system. Virally produced RANKL_Q236D maintains the activation of RAW 264.7 cells and escapes from the blocking of exogenous OPG-Fc. In a co-incubation system to mimic the process of adenovirus infection *in vivo*, we also found that Ad-RANKL Q236D infected C10 cells were capable of activating MMP9 gene expression in RAW 264.7 cells. Taken together, the generation of Ad-RANKL Q236D could be a powerful new tool for the treatment of fibrosis.

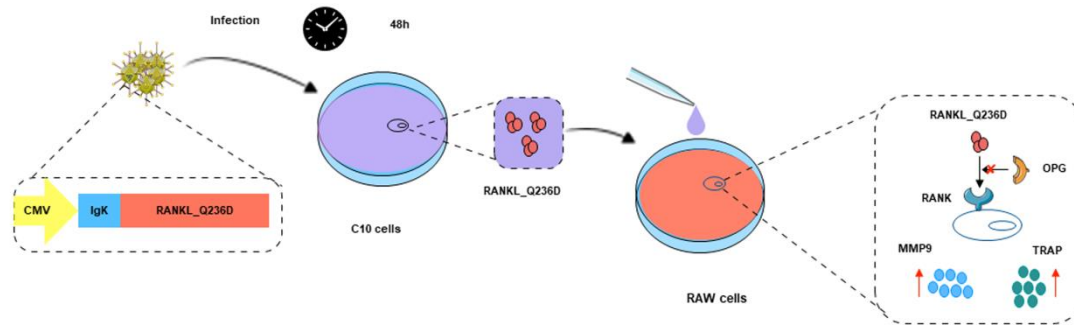


Figure 3. Virally produced RANKL_Q236D can activate RAW 264.7 cells and escape from the blocking of exogenous OPG-Fc.

Since OPG also acts as the decoy receptor of TRAIL, in Chapter 6 and 7 we further investigated the ligand-receptor interface of TRAIL and its receptors, and TRAIL resistance caused by its decoy receptors. In **Chapter 6**, we focused on the extrinsic apoptosis of senescent breast cancer cells caused by TRAIL. We compared the sensitivity to TRAIL of senescent and proliferating cancer cells. It turns out that changes in sensitivity to TRAIL are dependent on the pre-existing resistance observed for each cell line before senescence induction. We also found that therapy-induced senescence, by either doxorubicin treatment or ionizing radiation, results in an increased expression of death receptor 5 (DR5), as well as an increase in TRAIL decoy receptors DcR1, DcR2, and OPG. A DR5-selective TRAIL variant (DHER) is more effective in inducing apoptosis of senescent breast cancer cells compared to wild-type TRAIL, both in 2D and 3D spheroid models (shown in Figure 4). This suggests that targeting DR5 might be a therapeutic strategy for the elimination of therapy-induced senescent cancer cells.

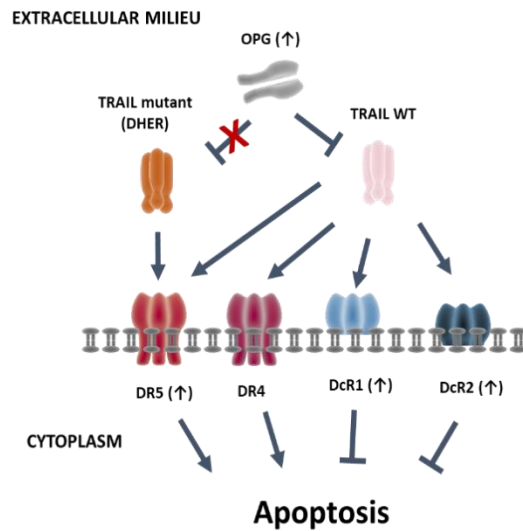


Figure 4. DR5-selective TRAIL variant (DHER) is more effective than wild-type TRAIL in inducing apoptosis in senescent breast cancer cells.

In **Chapter 7**, we focused on resistance of breast cancer cells to TRAIL due to high expression of decoy receptor OPG. The aim was to create TRAIL variants that can efficiently bind to death receptors with decreased binding to OPG. In this study, we built a model of complex TRAIL-OPG through Discovery Studio software and subsequently a TRAIL mutant library was created based on this 3D model. This mutant library is screened by ELISA, and points at TRAIL_D269 residue be of importance for OPG binding. Through a combination strategy, double mutant TRAIL_D269H/Y209M and triple mutant TRAIL_D269H/Y209M/K179P are shown to have lower binding to OPG compared to TRAIL_D269H/E195R. These variants also induce apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 and MDA-MB-436 in the presence of OPG. Thus, the generation of TRAIL mutants with reduced binding to OPG may be promising for targeting breast tumors in high OPG microenvironments.

Conclusion and future perspectives

As described in this thesis, we focused on probing the ligand-receptor interface of TNF superfamily members RANKL and TRAIL. Through the combination of Computational Protein Design (CPD) and targeted mutagenesis with screening and characterization assays,

we obtained receptor-specific, agonistic or antagonistic variants of RANKL and TRAIL, thereby providing novel approaches for the treatment of osteoporosis, fibrosis or cancer.

In **Chapter 3**, two RANK-antagonists, RANKL I248Y and I248K, are described to reduce WT RANKL-induced osteoclastogenesis by competing for binding to RANK. However, the mechanism of RANKL I248Y and I248K showing less osteoclastogenesis is still not clear. Therefore, it is interesting to look into how RANKL I248Y and I248K change the conformation of the RANKL-RANK complex, and subsequently influence the orientation of intracellular domains of RANK and the recruitment of downstream effector proteins. In **Chapter 4 and 5**, we focused on the potential role of the RANKL/RANK/OPG system in fibrosis. RANKL_Q236D maintains activation of RAW 264.7 macrophages and escapes the blockade by exogenous OPG. The adenovirus-mediated expression of RANKL_Q236D is shown to achieve long term targeted delivery. Notably, the antifibrotic effects of Adenovirally-expressed RANKL_Q236D deserve to be evaluated *in vivo*.

In **Chapter 6 and 7**, the ligand-receptor interface of TRAIL and its receptors is investigated, and TRAIL resistance caused by its decoy receptors. The DR5 selective TRAIL variant (DHER) with decreased binding to OPG or DR4 is found to be more effective in inducing apoptosis of senescent breast cancer cells compared to wild-type TRAIL. On the other hand, TRAIL D269H/Y209M and TRAIL D269H/Y209M/K179P show decreased binding to OPG compared to TRAIL DHER. Since TRAIL resistance occurs in approximately half of the tumor cells, there is a need to overcome resistance and sensitize TRAIL-induced apoptosis. Therefore, receptor-specific TRAIL variants, as single treatment or in combination strategies, could become promising for the treatment of cancers.

Overall, our work shows that the combination of CPD and focused mutagenesis with screening is a powerful approach to modify protein-protein interactions. We produced and evaluated recombinant RANKL and TRAIL mutants, which showed improved receptor selectivity and might overcome decoy receptor related resistance. Gene therapy approaches using Adenovirus may result in a sustained level of these recombinant proteins, thereby providing potential approaches for the treatments of osteoporosis, fibrosis or cancer. Additional efficacy and safety studies *in vivo* deserve to be conducted in the future.

References:

Chapter 8

- 1 Aggarwal BB (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745–756.
- 2 Adhyatmika A, Putri KSS, Beljaars L & Melgert BN (2015) The elusive antifibrotic macrophage. *Front. Med.* **2**, 1–11.

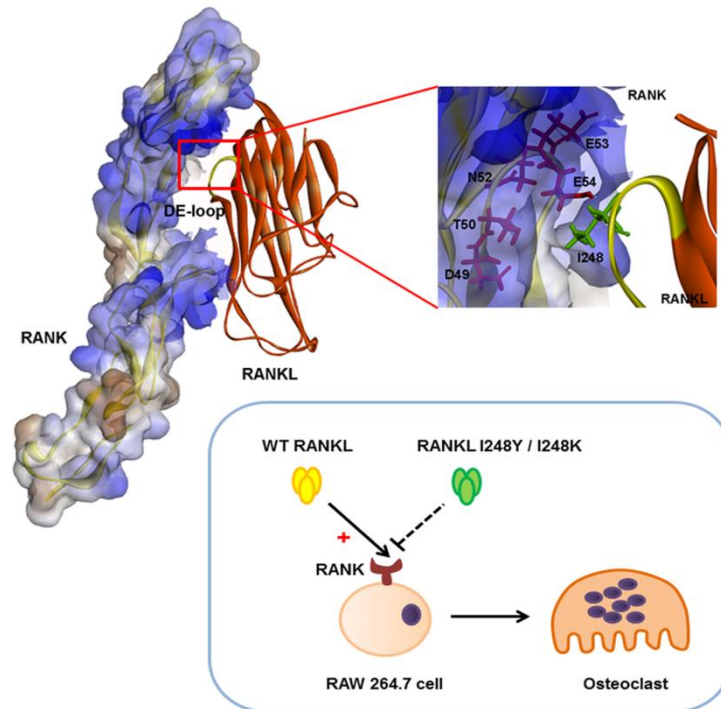
Samenvatting en toekomstperspectieven

In de afgelopen twee decennia is er aangetoond dat de superfamilie van tumornecrosefactor (TNF) van belang is bij tal van biologische activiteiten, zoals het mediëren van cellulaire apoptose, overleving, differentiatie of proliferatie. De binding tussen de liganden van de TNF-superfamilie en hun receptoren reguleert normale fysiologische processen, terwijl de deregulering schadelijke effecten kan veroorzaken [1]. Daarom kan het richten op TNF-superfamilieliganen of -receptoren met agonistische of antagonistische moleculen nieuwe benaderingen voor therapie opleveren. Het werk dat in dit proefschrift wordt beschreven, richt zich op de ligand-receptor-interface van TNF-superfamilieleden Ligand van Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANKL) en TNF-gerelateerde Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), om nieuwe recombinante RANKL en TRAIL varianten te ontwerpen en karakteriseren voor hun gebruik als potentiële therapeutica.

Hoofdstuk 2 van dit proefschrift geeft een overzicht van de RANKL/RANK-route als therapeutisch doelwit voor botziekten. Deze route kan worden geremd door het gebruik van het RANKL-specifieke monoklonale antilichaam Denosumab, dat klinisch wordt gebruikt voor de behandeling van osteoporose, maar ook door de natuurlijke, oplosbare “lokaasreceptor” van RANKL, osteoprotegerin (OPG). Als alternatief kan de receptor RANK worden geremd door RANKL-varianten met antagonistische eigenschappen. Tenslotte wordt de mogelijkheid besproken om antagonistische moleculen te creëren door de stoichiometrie van de receptor te veranderen, en daarmee de signaaltransductie te verbreken. Alles bij elkaar is het interfereren van de RANKL/RANK-route een veelbelovende strategie om therapeutica voor botziekten te ontwikkelen.

In **Hoofdstuk 3** zijn antagonistische varianten van RANKL ontworpen door de introductie van mutaties op positie I248 in de mRANKL DE-loop, en zijn hun effecten op de binding aan mRANK en daaropvolgende osteoclastogenese onderzocht. Twee mutanten, RANKL I248Y en I248K, vertonen een verhoogde bindingsaffiniteit voor RANK in vergelijking met RANKL WT, wat voornamelijk wordt veroorzaakt door een toename in de associatiesnelheidsconstante (k_a). Competitie-ELISA experimenten tonen ook aan dat zowel RANKL I248K als I248Y efficiënt kunnen concurreren met RANKL WT voor RANK-Fc-binding. Interessant is dat hoewel RANKL I248Y en I248K nog steeds in staat zijn osteoclastogenese te induceren met een 20-30% lager percentage dan RANKL_WT, deze twee varianten in staat zijn om RANKL_WT-gemedieerde osteoclastogenese al bij lage concentraties te verminderen. Alles

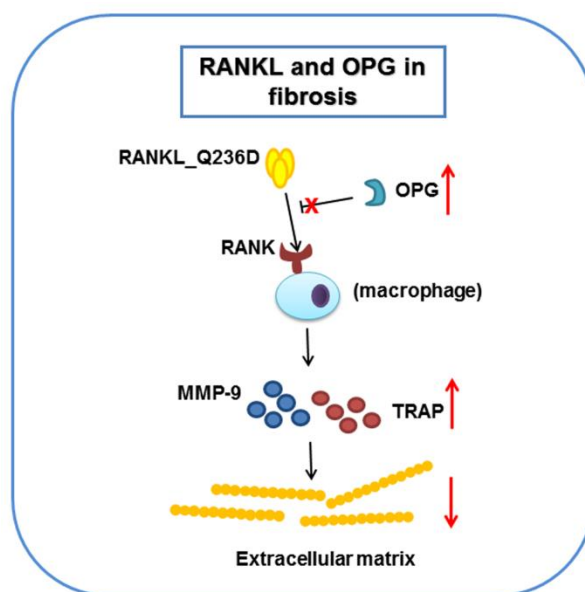
bij elkaar genomen (weergegeven in figuur 1), laten onze gegevens zien dat de DE-lus van RANKL van belang is voor RANK-binding en dat RANKL-mutanten I248Y en I248K in staat zijn de RANKL WT-geïnduceerde osteoclastogenese te verminderen. Deze twee RANKL-mutanten kunnen een startpunt vormen voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische eiwitten bij osteoporosebehandelingen.



Figuur 1. Nieuwe RANKL DE-loop-mutanten I248Y en I248K verminderen RANKL WT-geïnduceerde osteoclastogenese.

Recente studies tonen aan dat de RANKL-RANK-route fysiologische en pathologische effecten heeft op andere weefsels dan bot. Interessant is dat dit systeem een rol kan spelen bij fibrose [2]. In **hoofdstuk 4** veronderstelden we dat RANKL de receptor RANK op macrofagen zou kunnen stimuleren en het proces van afbraak van extracellulaire matrix (ECM) in fibrotisch weefsel zou kunnen activeren, een proces dat zou kunnen worden geremd door sterk tot expressie gebracht OPG. Daarom was het doel van deze studie om RANKL-mutanten te creëren die wel aan RANK binden maar niet aan OPG, en dus ECM kunnen reduceren. We vergeleken de 3D-structuren van RANKL-RANK en RANKL-OPG en bouwden een op structuur gebaseerde RANKL-mutantenbibliotheek met 44 RANKL-mutanten. Onze resultaten laten zien dat de positie van RANKL Q236 van belang is voor

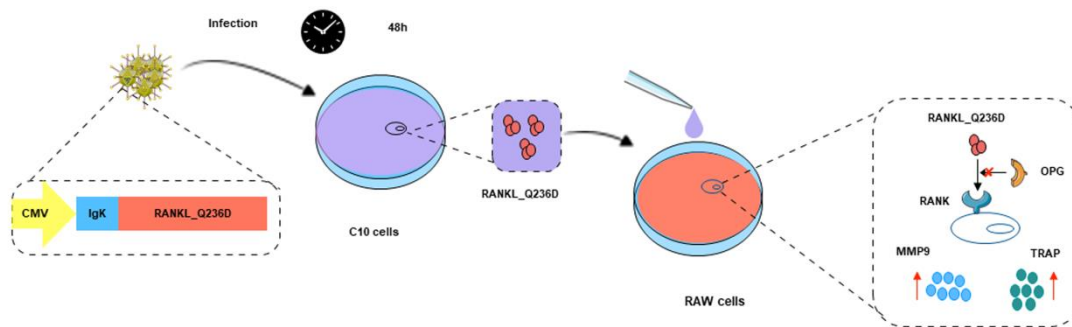
OPG-binding. Eén enkele mutant RANKL_Q236D vertoont een 30-voudige afname in affiniteit met OPG-Fc in vergelijking met RANKL_WT. RANKL_Q236D blijkt ook zeer effectief is bij het activeren van de muis macrofaag RAW 264.7 cellen- en wordt daarbij niet geremd door exogene OPG (weergegeven in figuur 2). RANKL-mutanten met verminderde binding aan OPG vertonen potentiële anti-fibrose-activiteit, wat een veelbelovende strategie biedt om nieuwe therapeutica tegen fibrose te onderzoeken.



Figuur 2. RANKL_Q236D kan uit de blokkade van exogene OPG ontsnappen en RAW-cellen activeren om het ECM-afbraakproces te starten.

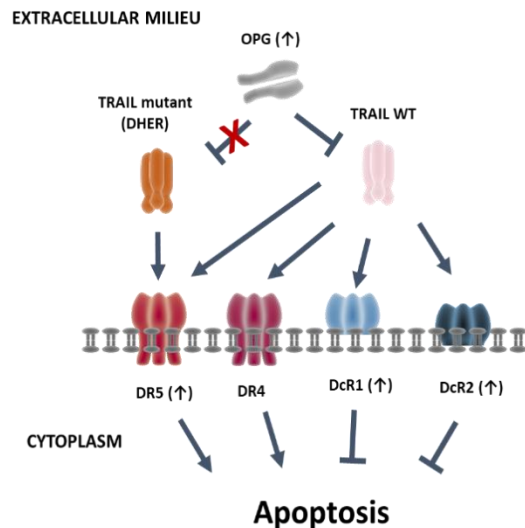
Als vervolg op het onderzoek naar RANKL-mutanten met een lage affiniteit voor OPG en hun potentiële anti-fibrose-activiteit, hebben we in **hoofdstuk 5** adenovirussen Ad-RANKL WT en Ad-RANKL Q236D geconstrueerd (weergegeven in figuur 3). Het doel van deze studie was om een gericht toedieningssysteem te bereiken door RANKL_Q236D rechtstreeks in de fibrotische weefsels te produceren zonder andere weefsels te beïnvloeden. We ontdekten dat door C10-cellen te infecteren met Ad-RANKL WT / Q236D, uitgescheiden RANKL-eiwit tot 19 dagen kan worden gedetecteerd met eiwitniveaus tot 30 nM, wat het langetermijnpotentieel laat zien van het afleveren van de eiwitten via een adenovirussysteem. Viraal geproduceerde RANKL_Q236D handhaaft de activering van RAW 264.7-cellen en ontsnapt uit de blokkering van exogene OPG-Fc. In een co-incubatiesysteem om het proces van adenovirusinfectie in vivo na te bootsen, vonden we ook dat met Ad-RANKL Q236D geïnfekteerde C10-cellen MMP9-genexpressie in RAW 264.7-cellen konden activeren. Alles

bij elkaar genomen kan de generatie van Ad-RANKL Q236D een krachtig nieuw hulpmiddel zijn voor de behandeling van fibrose.



Figuur 3. Viraal geproduceerde RANKL_Q236D kan RAW 264.7-cellen activeren en ontsnappen aan de blokkering van exogene OPG-Fc.

Aangezien OPG ook fungeert als de lokaasreceptor van TRAIL, hebben we in Hoofdstuk 6 en 7 de ligand-receptor interface van TRAIL en zijn receptoren en TRAIL-resistentie veroorzaakt door de lokaasreceptoren verder onderzocht. In **Hoofdstuk 6** hebben we ons gericht op de extrinsieke apoptose van verouderde borstkankercellen veroorzaakt door TRAIL. We vergeleken de gevoeligheid voor TRAIL tussen verouderde en prolifererende kankercellen. Het blijkt dat veranderingen in gevoeligheid voor TRAIL afhankelijk zijn van de reeds bestaande resistentie die voor elke cellijn werd waargenomen vóór inductie van veroudering. We ontdekten ook dat door therapie geïnduceerde veroudering, door behandeling met doxorubicine of ioniserende straling, leidt tot een verhoogde expressie van death receptor 5 (DR5), evenals een toename van TRAIL lokaasreceptoren DcR1, DcR2 en OPG. Een DR5-selectieve TRAIL-variant (DHER) is effectiever in het induceren van apoptose van verouderde borstkankercellen in vergelijking met wildtype TRAIL, zowel in 2D- als 3D-sferoïdemodellen (weergegeven in Figuur 4). Dit suggereert dat het richten op DR5 een therapeutische strategie kan zijn voor de eliminatie van door therapie verouderde kankercellen.



Figuur 4. DR5-selectieve TRAIL-variant (DHER) is effectiever dan wildtype TRAIL bij het induceren van apoptose in verouderde borstkankercellen.

In **hoofdstuk 7** hebben we ons gericht op resistentie van borstkankercellen tegen TRAIL als gevolg van hoge expressie van OPG. Het doel was om TRAIL-varianten te creëren die efficiënt kunnen binden aan pro-apoptosis receptoren, maar met verminderde binding aan OPG.

In deze studie hebben we een model van complex TRAIL-OPG gebouwd via Discovery Studio-software en vervolgens is een op TRAIL-mutantenbibliotheek gemaakt op basis van dit 3D-model. Deze mutantbibliotheek is gescreend middels ELISA, waaruit duidelijk werd dat positie TRAIL_D269 van belang is voor OPG-binding. Door middel van een combinatiestrategie is aangetoond dat dubbele mutant TRAIL_D269H/Y209M en drievoudige mutant TRAIL_D269H/Y209M/K179P een lagere binding met OPG hebben in vergelijking met TRAIL_D269H/E195R. Deze varianten veroorzaken ook apoptose in borstkankercellen MDA-MB-231 en MDA-MB-436 in aanwezigheid van OPG. De generatie van TRAIL-mutanten met verminderde binding aan OPG zou dus veelbelovend kunnen worden voor het aanpakken van borsttumoren in micro-omgevingen met hoge OPG concentraties.

Conclusie en toekomstperspectieven

Zoals beschreven in dit proefschrift, hebben we ons gericht op het onderzoeken van de ligand-receptor interface van TNF superfamilieleden RANKL en TRAIL. Door de combinatie van Computational Protein Design (CPD) en gerichte mutagenese met screening- en karakterisatiebepalingen, hebben we receptorspecifieke, agonistische of antagonistische varianten van RANKL en TRAIL verkregen, waardoor we nieuwe benaderingen hebben geboden voor de behandeling van osteoporose, fibrose of kanker.

In **Hoofdstuk 3** worden twee RANK-antagonisten beschreven, RANKL_I248Y en I248K, die WT RANKL-geïnduceerde osteoclastogenese kunnen verminderen door te strijden om binding aan RANK. Het mechanisme van RANKL_I248Y en I248K dat minder osteoclastogenese vertoont, is echter nog steeds niet duidelijk. Daarom is het interessant om te kijken hoe RANKL_I248Y en I248K de conformatie van het RANKL-RANK-complex veranderen en vervolgens de oriëntatie van intracellulaire domeinen van RANK en de rekrutering van stroomafwaartse effector-eiwitten beïnvloeden. In **hoofdstuk 4 en 5** hebben we ons gericht op de potentiële rol van het RANKL/RANK/OPG-systeem bij fibrose. RANKL_Q236D is in staat tot activering van RAW 264.7-macrofagen en ontsnapt aan de blokkade door exogene OPG. Lange termijn productie van deze mutant is bereikt middels adenovirus gemedieerde expressie van RANKL_Q236D. Met name de antifibrotische effecten van adenoviraal tot expressie gebrachte RANKL_Q236D verdienen het om *in vivo* te worden beoordeeld.

In **Hoofdstuk 6 en 7** wordt de ligand-receptor interface van TRAIL en zijn receptoren onderzocht, en TRAIL-resistentie veroorzaakt door de lokaasreceptoren. De DR5-selectieve TRAIL-variant (DHER) met verminderde binding aan OPG of DR4 blijkt effectiever te zijn bij het induceren van apoptose van verouderde borstkankercellen in vergelijking met wildtype TRAIL. Aan de andere kant vertonen TRAIL D269H/Y209M en TRAIL D269H/Y209M/K179P verminderde binding aan OPG in vergelijking met TRAIL DHER. Aangezien TRAIL-resistentie optreedt in ongeveer de helft van de tumorcellen, is het nodig om resistentie te overwinnen en TRAIL-geïnduceerde apoptose te sensibiliseren. Daarom kunnen receptorspecifieke TRAIL-varianten, ofwel als monotherapie of in combinatiestrategieën, veelbelovend worden voor de behandeling van kanker.

Al met al toont ons werk aan dat de combinatie van CPD en gerichte mutagenese met screening een krachtige benadering is om eiwit-eiwitinteracties te wijzigen. We produceerden en evalueerden recombinante RANKL- en TRAIL-mutanten, die een verbeterde

receptorselectiviteit vertoonden en mogelijk resistentie tegen lokreceptoren konden overwinnen. Gentherapiebenaderingen met behulp van Adenovirus kunnen resulteren in een aanhoudend niveau van deze recombinante eiwitten, waardoor mogelijke benaderingen worden geboden voor de behandeling van osteoporose, fibrose of kanker. Bijkomend aanvullend onderzoek naar de werkzaamheid en veiligheid in vivo verdient het om in de toekomst te worden uitgevoerd

References:

- 1 Aggarwal BB (2003) Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745–756.
- 2 Adhyatmika A, Putri KSS, Beljaars L & Melgert BN (2015) The elusive antifibrotic macrophage. *Front. Med.* **2**, 1–11.

