

# Stanični i molekularni posrednici subhondralnoga koštanoga razaranja u artritisu

---

Lukač, Nina

Doctoral thesis / Disertacija

2020

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:300204>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-21**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nina Lukač**

**Stanični i molekularni posrednici  
subhondralnoga koštanoga razaranja u  
artritisu**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2020.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nina Lukač**

**Stanični i molekularni posrednici  
subhondralnoga koštanoga razaranja u  
artritisu**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2020.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga.

Pokusi u sklopu ovog istraživanja omogućeni su sredstvima projekta IP-2014-09-7406 i DOK-2015-10-9897 Hrvatske zaklade za znanost (voditelj prof. dr. sc. Nataša Kovačić).

Voditelj rada: prof. dr. sc. Nataša Kovačić

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nataši Kovačić na stručnom vodstvu, savjetima i pomoći tijekom izrade ovog rada. Hvala Vam na ukazanom povjerenju, strpljenju i potpori u početcima moje znanstvene karijere i prenesenom znanju.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Danki Grčević, prof. dr. sc. Vedranu Kataviću i prof. dr. sc. Tomislavu Kelavi na pomoći i savjetima tijekom izrade ovoga rada, Katerini Zrinski Petrović, med. lab. teh. i Sanji Ivčević, bacc. med. lab. dg. na poučavanju radu u laboratoriju i pomoći pri izvođenju pokusa, dr. sc. Darji Flegar, dr. sc. Alanu Šučuru, Maši Filipović i Dini Šislu, na savjetima i pomoći pri izvođenju pokusa te Martini Fadljević i Igoru Radanoviću za pomoć kod analize.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Slobodanu Vukičeviću i članovima Laboratorija za mineralizirana tkiva Centra za translacijska i klinička istraživanja na pristupu uređaju za mikro-kompjuteriziranu tomografiju, prof. dr. sc. Franu Borovečkom i dr. sc. Kristini Gotovac Jerčić iz Odjela za funkcionalnu genomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za pomoć kod laboratorijske obrade genskih čipova, dr. Nives Zimmermann i njezinoj obitelji na gostoprimstvu i mogućnosti posjete Cincinnatiju, dr. sc. Leah Kottyan iz Cincinnati Children's Hospital Medical Center na savjetima kod bioinformatičke analize, prof. dr. sc. Oliveru Vugreku i Filipu Rokiću iz Laboratoriju za naprednu genomiku na Institutu Ruđer Bošković za pomoć kod sekvencioniranja, te dr. sc. Katarini Ilić i članovima Laboratorija za neurokemiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga za pomoć kod western blot analize.

Na kraju zahvaljujem mojoj obitelji na podršci i Davoru na beskrajnom razumijevanju, strpljenju i potpori.



# SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Reumatoidni artritis.....	1
1.1.1. Kliničke značajke.....	1
1.1.2. Etiologija.....	2
1.1.3. Patogeneza .....	3
1.1.4. Značajke reumatoidne sinovijalne membrane.....	4
1.1.5. Periartikularna koštana srž u reumatoidnom artritisu .....	8
1.1.6. Liječenje reumatoidnog artritisa .....	9
1.2. Životinjski modeli reumatoidnog artritisa.....	10
1.2.1. Artritis potaknut antigenom .....	12
1.3. Gubitak kosti u reumatoidnom artritisu .....	13
1.3.1. Lokalni gubitak kosti .....	14
1.3.2. Sustavni gubitak kosti .....	16
1.4. Sustav Fas/ligand Fas.....	17
1.4.1. Građa, tkivni i stanični izražaj receptora i liganda Fas .....	17
1.4.2. Signalni putevi sustava Fas/ligand Fas .....	18
1.4.3. Uloga sustava Fas/ligand Fas.....	21
1.4.3.1. Imunosni sustav.....	21
1.4.3.2. Koštani sustav .....	25
1.4.3.3. Ostala tkiva .....	26
1.4.4. Uloga sustava Fas/ligand Fas u patogenezi bolesti.....	27
1.4.4.1. Reumatoidni artritis.....	27
2. Hipoteza .....	30
3. Ciljevi rada .....	31
3.1. Opći cilj.....	31
3.2. Specifični ciljevi .....	31
4. Materijali i metode .....	32
4.1. Ustroj pokusa .....	32
4.2. Pokusne životinje .....	35
4.3. Artritis potaknut antigenom .....	36
4.4. Kliničko i histološko praćenje artritisa .....	37

4.5. Mikro-kompjutorizirana tomografija .....	39
4.6. Histomorfometrija .....	39
4.7. Protočna citometrija .....	40
4.8. Razvrstavanje staničnih populacija aktivirano fluorescencijom .....	43
4.9. Analiza genskog izražaja pomoću genskih čipova .....	45
4.10. Analiza genskog izražaja pomoću sekvencioniranja RNA .....	56
4.11. Analiza genskog izražaja postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu .....	59
4.12. <i>In situ</i> hibridizacija RNA .....	62
4.13. Izolacija bjelančevina i western blot analiza .....	63
4.14. <i>In vivo</i> primjena siRNA .....	65
4.15. <i>In vivo</i> primjena metformina .....	66
4.16. Stanična kultura .....	67
4.17. Statistička analiza .....	68
5. Rezultati .....	70
5.1. Klinička i histološka procjena artritisa u miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas .....	70
5.2. Procjena subhondralnog koštanog razaranja u artritisu u miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas .....	72
5.3. Fenotipska analiza staničnih populacija u zglobnom odjeljku i periartikularnoj srži miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas .....	75
5.3.1. Fenotipska analiza hematopoetskih populacija u zglobnom odjeljku miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas .....	75
5.3.2. Fenotipska analiza mezenhimalnih staničnih populacija u zglobnom odjeljku miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas .....	76
5.3.3. Fenotipska analiza hematopoetskih populacija u periartikularnoj koštanoj srži miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas .....	77
5.4. Povezanost udjela staničnih populacija u zglobnom odjeljku sa subhondralnim koštanim volumenom i zglobnom oteklinom .....	81
5.5. Analiza transkriptoma zglobnih mijeloidnih stanica u artritisu miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas .....	84
5.6. Analiza transkriptoma sinovijalnih populacija koštano-hrskavičnih prethodnika miševa divljeg tipa .....	90

5.7. Potvrda rezultata analize genskih čipova .....	97
5.8. Izražaj gena <i>Mid1</i> tijekom artritisa potaknutog antigenom i njegova povezanost s izražajem proupalnih citokina i intenzitetom artritisa .....	102
5.9. Izražaj <i>Mid1</i> u koljenima mužjaka miševa WT u artritisu potaknutom antigenom.....	104
5.10. Učinak inhibicije <i>Mid1</i> na upalna zbivanja <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> .....	105
5.10.1. Učinak inhibicije <i>Mid1</i> na izražaj proupalnih citokina u upalno potaknutim stanicama koštane srži .....	105
5.10.2. Učinak utišavanja gena <i>Mid1 in vivo</i> na tijek artritisa potaknutog antigenom.....	107
5.10.3. Učinak blokiranja bjelančevine <i>Mid1</i> metforminom <i>in vivo</i> na tijek artritisa potaknutog antigenom .....	110
6. Rasprava.....	115
6.1. Ublaženi oblik artritisa potaknutog antigenom u miševa <i>Fas -/-</i> obilježavaju promjene u staničnom sastavu zglobnog odjeljka .....	115
6.1.1. Promjene u hematopoetskim populacijama u artritisu miševa <i>Fas -/-</i>	117
6.1.2. Promjene u mezenhimalnim populacijama u artritisu miševa <i>Fas -/-</i> .	120
6.2. Mijeloidno-specifični geni promijenjeni u neresorptivnom artritisu miševa <i>Fas -/-</i> .....	121
6.3. Inhibicija djelovanja bjelančevine <i>Mid1</i> koči upalna zbivanja.....	126
6.3.1. Inhibicija djelovanja bjelančevine <i>Mid1</i> koči izražaj proupalnih citokina nakon aktivacije stanica koštane srži <i>in vitro</i> .....	126
6.3.2. Inhibicija djelovanja bjelančevine <i>Mid1</i> koči razvoj artritisa potaknutog antigenom <i>in vitro</i> .....	127
7. Zaključci.....	131
8. Sažetak .....	134
9. Summary .....	135
10. Popis literature .....	136
11. Životopis .....	172

## POPIS KRATICA

ACPA - protutijela usmjerena na citrulinirane peptide, prema engl. *anti-citrullinated peptide antibodies*

ACR - Američki reumatološki odbor, prema engl. *American College of Rheumatology*

AIA - artritis potaknut antigenom, prema engl. *antigen-induced arthritis*

AICD - stanična smrt izazvana pobudom, prema engl. *activation-induced cell death*

ALPS - autoimunosni limfoproliferacijski sindrom, prema engl. *autoimmune lymphoproliferative syndrome*

AMPK - proteinska kinaza aktivirana adenozin monofosfatom, prema engl. *AMP-activated protein kinase*

ANOVA - analiza varijance, prema engl. *analysis of variance*

APC - antigen-predočne stanice, prema engl. *antigen presenting cell*

APE1 - apurinska/apirimidinska endonukleaza 1

APP - preteče amiloidnog proteina, prema engl. *amyloid precursor protein*

APS - amonij persulfat

ASK1 - kinaza koja regulira apoptotički signal, prema engl. *apoptosis signal-regulating kinase 1*

BAFF - aktivirajući faktor limfocita B, prema engl. *B cell activating factor*

BAX - BCL-2-asocirajuća bjelančevina x, prema engl. *BCL-2 associated x protein*

bFGF - bazični čimbenik rasta fibroblasta, prema engl. *basic fibroblast growth factor*

BMD - mineralna gustoća kosti, prema engl. *bone mineral density*

BMP - koštana oblikotvorna bjelančevina, prema engl. *bone morphogenetic protein*

BP - koštani prethodnici, prema engl. *bone progenitors*

BV/TV - udio volumena koštanih gredica, prema engl. *bone volume/total volume*

CCL - kemokinski ligand s C-C motivom

CD - stanični biljeg, prema engl. *cluster of differentiation*

CDH11 - kadherin 11

cDNA - komplementarna DNA, prema engl. *complementary DNA*

CFA - potpuni Freundov adjuvans, prema engl. *complete Freund's adjuvant*

CIA - artritis potaknut kolagenom, prema engl. *collagen induced arthritis*

cIAP - stanični inhibitor apoptoze, prema engl. *cellular inhibitor of apoptosis protein*

COMP - artritis potaknut hrskavičnom oligomernom bjelančevinom međustanične tvari, prema engl. *cartilage oligomeric matrix protein*

CRD - domena bogata aminokiselinom cistein, prema engl. *cysteine-rich domain*

cRNA - komplementarna RNA, prema engl. *complementary RNA*

CRP - C reaktivna bjelančevina, prema engl. *C reactive protein*

CT - kritični broj ciklusa, prema engl. *cycle threshold*

CTRL - kontrolna skupina, prema engl. *control*

CXCL- kemokinski ligand s C-X-C motivom

CII - kolagen tipa II

c-FLIP – bjelančevina c-FLIP, prema engl. *cellular FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme inhibitory protein*

DAB - 3,3'-diaminobenzidin

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenil indol

DcR3 – lažni receptor, prema engl. *decoy receptor 3*

DD - smrtonosna domena, prema engl. *death domain*

DED - izvršna smrtonosna domena, prema engl. *death effector domain*

DHT - odgođena preosjetljivost, prema engl. *delayed type hypersensitivity*

DKK – bjelančevina iz obitelji Dickkopf, prema engl. *Dickkopf-related protein*

DISC - signalni sklop koji potiče staničnu smrt, prema engl. *death inducing signaling complex*

DMARD - antireumatski lijekovi koji mijenjaju tijek bolesti, prema engl. *disease modifying antirheumatic drugs*

DR – smrtonosni receptor, prema engl. *death receptor*

dsDNA - dvolančana DNA, prema engl. *double stranded DNA*

dsRNA- dvolančana RNA, prema engl. *double stranded RNA*

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina, prema engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*

EoE – eozinofilni ezofagitis

ERK - kinaza regulirana izvanstaničnim signalom, prema engl. *extracellular signal regulated kinase*

EULAR - Europska liga protiv reumatizma, prema engl. *European League Against Rheumatism*

FACS - fluorescencijom aktivirano razvrstavanje stanica, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*

FADD - smrtonosna domena pridružena receptoru Fas, prema engl. *Fas associated death domain*

Fas  $-/-$  - miševi s izbačenim genom za receptor Fas

Fas<sup>fl/fl</sup> - miševi koji sadrže dva Fas alela *floxed*

FasL - ligand Fas

FasL  $-/-$  - miševi s izbačenim genom za ligand Fas

FBS - fetalni goveđi serum, prema engl. *fetal bovine serum*

FC - omjer promjene, prema engl. *fold change*

FLS - sinovijalni fibroblast, prema engl. *fibroblast-like synoviocyte*

FMO – kombinacija protutijela u kojima nedostaje fluorokrom za kojeg se određuje prag pozitivnosti, prema engl. *fluorescence minus one*

FSC – prednji rasap, prema engl. *forward- scatter*

FSC-A – površina prednjeg rasapa, prema engl. *forward-scatter area*

FSC-H – visina prednjeg rasapa, prema engl. *side-scatter height*

*gld* - opći limfoproliferativni poremećaj, prema engl. *generalized lymphoproliferative disorder*

GM-CSF - čimbenik poticanja rasta kolonija granulocita i makrofaga, prema engl. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*

GO - genska ontologija

GSEA - analiza zastupljenosti genskih setova, prema engl. *gene set enrichment analysis*

GVHD - reakcija presatka protiv primaoca, prema engl. *graft versus host disease*

G6PI - glukoza-6-fosfat izomeraza

G-CSF - čimbenik poticanja rasta granulocitnih kolonija, prema engl. *granulocyte colony stimulating factor*

HIV-1 - virus humane imunodeficijencije tip 1

HLA - ljudski leukocitni antigen, prema engl. *human leukocyte antigen*

HLA-DR $\beta$  - lanac  $\beta$  skupine HLA 2 tipa DR

HPLC - tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti, prema engl. *high-performance liquid chromatography*

HRP - peroksidaza hrena, prema engl. *horseradish peroxidase*

ICAM-1 - međustanična adhezijska molekula 1, prema engl. *intercellular adhesion molecule 1*

IFA – nepotpun Freundov adjuvans, prema engl. *incomplete Freund adjuvans*

IFN – interferon

IGBP1 – bjelančevina IGBP1 ( $\alpha 4$ ), prema engl. *immunoglobulin-binding protein 1*

IKK - kinaza inhibitora jezgrinog čimbenika  $\kappa B$ , prema engl. *I $\kappa$ B kinase*

IL - interleukin

IL-1RA - antagonist receptora IL-1

ISH - *in situ* hibridizacija

IVT - *in vitro* prepisivanje, prema engl. *in vitro transcription*

IQR - interkvartilni raspon, prema engl. *interquartile range*

I $\kappa$ B - inhibitor jezgrinog čimbenika  $\kappa B$ , prema engl. *inhibitor of nuclear factor  $\kappa B$*

i.a. - intra-artikularna injekcija

i.v.- intravenska injekcija

JAK - Janus-kinaza

JNK - kinaza koja fosforilira N-terminalni dio čimbenika c-Jun, prema engl. *c-Jun N-terminal kinase*

LDL - lipoprotein male gustoće, prema engl. *low density lipoprotein*

limma – algoritam limma, prema engl. *linear models for microarray data*

lncRNA - duga nekodirajuća RNA, prema engl. *long non-coding RNA*

log<sub>2</sub>FC - logaritam omjera promjene izražaja gena

loxP - regija lokusa rekombinacije bakteriofaga P, prema engl. *locus of crossover in P1*

*lpr* – limfoproliferacija, prema engl. *lymphoproliferation*

LPS - lipopolisaharid

MAPK - proteinska kinaza aktivirana mitogenom, prema engl. *mitogen-activated protein kinase*

mBSA - metilirani goveđi serumski albumin, prema engl. *methylated bovine serum albumin*

MDSC - supresorske stanice mijeloidnog podrijetla, prema engl. *myeloid derived suppressor cells*

MEKK - kinaza kinaze MAPK, prema engl. *MAPK kinase kinase*

MHC - glavni kompleks tkivne podudarnosti, prema engl. *major histocompatibility complex*

MLS - sinovijalni makrofag, prema engl. *macrophage-like synoviocyte*

MMP - metaloproteinaza međustanične tvari, prema engl. *matrix metalloproteinase*

MR - magnetna rezonanca

mRNA - glasnička RNA, prema engl. *messenger RNA*

mSSC - mišje matične stanice koštanog sustava, prema engl. *murine skeletal stem cell*

mTOR - ciljna molekula rapamicina u sisavaca, prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin*

mTORC1 - sklop 1 ciljne molekule rapamicina u sisavaca, prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1*



MyD88 - čimbenik sazrijevanja stanica mijeloidne loze 88, prema engl. *myeloid differentiation factor 88*

M-CSF - čimbenik poticanja rasta kolonija makrofaga, prema engl. *macrophage colony stimulating factor*

NES - zastupljenost genskog seta normalizirana na broj gena u skupini, prema engl. *normalized enrichment score*

NET – neutrofilne izvanstanične zamke, prema engl. *neutrophil extracellular trap*

NFQ - prigušivač fluorescencije, prema engl. *nonfluorescent quencher*

NF $\kappa$ B - jezgreni čimbenik  $\kappa$ B, prema engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*

NK - prirodno-ubilačka stanica - prema engl. *natural killer*

NI - neimuniziran

NOD – miševi NOD, prema engl. *non-obese diabetic*

NSAID - nesteroidni protu-upalni lijekovi, prema engl. *non-steroid anti-inflammatory drugs*

NUSE - normalizirana standardna pogreška, prema engl. *normalized unscaled standard error*

OCP - prethodničke stanice osteoklasta, prema engl. *osteoclast progenitor cell*

PAD - peptidil arginin deiminaza

PAR - pseudoautosomalna regija

PBS - fiziološka otopina puferirana fosfatom, prema engl. *phosphate buffered saline*

PCA - analiza glavnih komponenti, prema engl. *principal component analysis*

PEI - polietilenimin

PIGF - placentarni čimbenik rasta, prema engl. *placental growth factor*

PP2A - proteinska fosfataza 2A, prema engl. *protein phosphatase 2A*

PP2Ac – katalitička podjedinica proteinske fosfataze 2A

PRD - domena bogata prolinom, prema engl. *proline rich domain*

PRR - receptor za prepoznavanje obrazaca, prema engl. *pattern recognition receptors*

PTH - paratiroidni hormon

PTPN22- tirozinska fosfataza N22, prema engl. *protein tyrosine phosphatase N22*

p(a) – p vrijednost utjecaja artritisa na promatrani parametar

p(g) – p vrijednost utjecaja genotipa na promatrani parametar

p(gxa) – p vrijednost međudjelovanja genotipa i artritisa

RA - reumatoidni artritis

RANKL - ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa B$ , prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa B$  ligand*

RF – reumatoidni faktor

RIN - vrijednost integriteta RNA, prema engl. *RNA integrity number*

RIP - proteinska kinaza povezana s receptorom, prema engl. *receptor-interacting protein kinase*

RLE – omjer vrijednosti izražaja seta proba i srednje vrijednosti izražaja istog seta proba u svim čipovima, prema engl. *relative log expression*

RMA – algoritam za normalizaciju vrijednosti intenziteta signala, zbrajanje setova proba i ispravljanje pozadinskog signala genskih čipova, prema engl. *robust multi-array average*

ROI - područje interesa, prema engl. *region of interest*

ROS - reaktivni spojevi kisika, prema engl. *reactive oxygen species*

rRNA - ribosomalna RNA, prema engl. *ribosomal RNA*

SCID - teška združena imunodeficijencija, prema engl. *severe combined immunodeficiency*

SCWIA - artritis potaknut staničnom stjenkom streptokoka, prema engl. *streptococcal cell wall induced arthritis*

SD - standardna devijacija, prema engl. *standard deviation*

sFas - topljivi receptor Fas, prema engl. *soluble Fas receptor*

sFasL - topljivi ligand Fas, prema engl. *soluble Fas ligand*

sFRP - bjelančevina srodna Frizzled obitelji receptora, prema engl. *secreted frizzled-related protein*

siRNA - mala interferirajuća RNA, prema engl. *small interfering RNA*

SLE - sistemski eritemski lupus

SMART – mehanizam SMART, prema engl. *switching mechanism at 5' end of RNA template*

SSC - postranični rasap, prema engl. *side-scatter*

SSC-A - površina postraničnog rasapa, prema engl. *side-scatter area*

SSC-H - visina postraničnog rasapa, prema engl. *side-scatter height*

ss-cDNA - jednolančana cDNA, prema engl. *single stranded cDNA*

STAT - pretvarač signala i aktivator transkripcije, prema engl. *signal transducer and activator of transcription*

Tat - bjelančevina transaktivatora transkripcije, prema engl. *trans-activator of transcription*

Tb.N - broj koštanih gredica, prema engl. *trabecular number*

Tb.Sp - razdvojenost koštanih gredica, prema engl. *trabecular separation*

Tb.Th - debljina koštanih gredica, prema engl. *trabecular thickness*

TCR - receptor limfocita T, prema engl. *T-cell receptor*

TdT - terminalna deoksinukleotidil transferaza

TEMED - tetrametiletilendiamin

TGF- $\beta$  - transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ , prema engl. *transforming growth factor  $\beta$*

T<sub>h</sub> - pomagački limfocit T

TJC - broj bolnih zglobova, prema engl. *tender joint count*

TLR - receptor nalik Tollu, prema engl. *Toll-like receptor*

T<sub>m</sub> - temperatura tališta, prema engl. *melting temperature*

TMM – algoritam za normalizaciju TMM, prema engl. *trimmed mean of M values*

TNF- $\alpha$  - čimbenik nekroze tumora  $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$*

TRADD - smrtonosna domena pridružena receptoru TNF, prema engl. *TNF receptor associated death domain*

TRAF - čimbenik povezan s receptorom TNF, prema engl. *TNF receptor-associated factor*

TRAIL - TNF-vezani ligand koji inducira apoptozu, prema engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

T<sub>reg</sub> - regulacijski limfocit T

UDG - uracil-DNA glikozilaza

VCAM-1 - vaskularna stanična adhezijska molekula 1, prema engl. *vascular cell adhesion molecule 1*

VEGF - čimbenika rasta krvožilnog endotela, prema engl. *vascular endothelial growth factor*

ZAP-70 - proteinska kinaza povezana sa ζ-lancem-70, prema engl. *zeta-chain-associated protein kinase 70*

qPCR - kvantitativna lančana reakcija polimeraze, prema engl. *quantitative polymerase chain reaction*

WT – divlji tip, prema engl. *wild-type*

α-MEM - minimalni esencijalni medij α, prema engl. *α-minimal essential medium*

μ-CT - mikro-kompjutorizirana tomografija, prema engl. *micro-computerized tomography*

7AAD - 7-amino-actinomycin D

# 1. Uvod

## 1.1. Reumatoidni artritis

### 1.1.1. Kliničke značajke

Reumatoidni artritis (RA) je kronična sustavna autoimuna bolest koja primarno zahvaća sinovijalne zglobove. S prevalencijom 0,5-1% odrasle populacije (1) najčešći je upalni artritis, od kojeg godišnje oboli oko 40 od 100,000 ljudi. Dva do tri puta je češći u žena, a tipično započinje u petom ili šestom desetljeću života. Tijek bolesti je progresivan te zbog razaranja zglobne hrskavice i kosti nastaju zglobne deformacije i razvija se invalidnost te se značajno smanjuje radna sposobnost i kvaliteta života oboljelih. Zbog svega navedenog RA ima značajne socijalne i ekonomske posljedice. Bolest najčešće započinje postupno kao oligoartikularni ili poliartritis, dok se rjeđe manifestira kao akutni migrirajući artritis, povremeni artritis ili monoartritis. Najčešći klinički znakovi su bol, crvenilo, toplina i otok zahvaćenih zglobova te ukočenost, koja je najizrazitija u jutarnjim satima. U potpuno razvijenoj bolesti tipična je simetrična upala metakarpofalangealnih, proksimalnih interfalangealnih zglobova šake, interfalangealnih zglobova palca, radiokarpalnog zgloba ili metatarzofalangealnih zglobova. Mogu biti zahvaćeni i drugi sinovijalni zglobovi, primjerice koljeno, lakat, rame i gležanj. Aksijalni kostur obično je pošteđen, s iznimkom atlantooccipitalnog zgloba. U trećine pacijenata, uz lokalne simptome zglobne upale prisutni su i sustavni simptomi poput mialgije, umora, subfebriliteta, gubitka apetita, mršavljenja te depresije, a rjeđe se pojavljuju potkožni čvorići, najčešće u području lakta, episkleritis, skleritis, pleuritis, perikarditis, oštećenje bubrega, splenomegalija, Sjögrenov sindrom i vaskulitis. Mogu biti prisutne brojne hematološke abnormalnosti, poput anemije kronične bolesti, trombocitopenije, leukocitoze te povišenih proteina akutne faze. Promijenjena je i sinovijalna tekućina u kojoj se nalazi polimorfonuklearni upalni infiltrat. U 75-80% pacijenata artritis je seropozitivan, odnosno karakteriziran prisutnošću protutijela na IgG (reumatoidni faktor, RF) i protutijela usmjerenih na citrulinirane peptide (ACPA, prema engl. *anti-citrullinated peptide antibodies*). Na radiološkim snimkama vidljive su karakteristične koštane erozije, suženje zglobnog prostora te periartikularna osteopenija, a magnetnom rezonancom vidljiv je edem koštane srži uz zahvaćeni zglob. Tijek bolesti je promjenjiv, a sastoji se od razdoblja remisija, najčešće potaknutih terapijom, i relapsa. Spontana remisija je izuzetno rijetka, a strukturne promjene koje se razvijaju u tijeku bolesti su ireverzibilne.

### 1.1.2. Etiologija

Smatra se da se RA razvija u genetski predisponiranih osoba pod djelovanjem okolišnih čimbenika. Genetsku predispoziciju potvrđuju brojni polimorfizmi gena pronađeni u pacijenata s RA te studije provedene na blizancima, koje su pokazale da 15% jednojajčanih te 3,5% dvojajčanih blizanaca razvija RA (2, 3). MacGregor i sur. procjenjuju da je mjera u kojoj se odgovornost za bolest u populaciji može objasniti genetskom varijacijom za RA oko 60% (4). Geni preosjetljivosti mogu se podijeliti u dvije skupine: geni koji kodiraju antigene glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC, prema engl. *major histocompatibility complex*), to jest ljudske leukocitne antigene (HLA, prema engl. *human leukocyte antigen*); te geni izvan sustava HLA. Najčvršća veza između genskog polimorfizma i razvoja RA je genski zapis koji kodira zajednički epitop (prema engl. *shared epitope*), slijed od 5 aminokiselina, QKRAA, QRRAA, ili RRRAA, na 70.-74. mjestu treće hipervarijabilne regije lanca  $\beta$  skupine HLA 2 tipa DR (HLA-DR $\beta$ ) (5, 6). Zajednički epitop prisutan je u 90% pacijenata s RA, a aleli s najvećim rizikom za razvoj bolesti su HLA-DRB\*0401, HLA-DRB\*0404, HLA-DRB\*0101 te HLA-DRB\*1402 (5, 7). Izvan sustava HLA pronađeni su polimorfizmi brojnih gena uključenih u imunosni odgovor, primjerice gena koji kodiraju kemokine (kemokinski ligand s C-C motivom (CCL)4) (8), kaspaze (CASP5) (9) i molekule ključne za aktivaciju limfocita T (tirozinska fosfataza N22 (PTPN22, prema engl. *protein tyrosine phosphatase N22*)) (10), a opisani su i polimorfizmi promotora gena uključenih u imunosni odgovor poput gena koji kodira čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ , prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) (11), interleukin(IL)-1 $\beta$  (12), IL-37 (13) i IL-10 (14). Osim razlika u samom genskom zapisu, na razvoj bolesti utječu i epigenetske promjene poput acetilacije histona te metilacije DNA u područjima HLA (15). Od okolišnih čimbenika najveći rizik za razvoj RA predstavlja pušenje, posebice u pojedinaca koji posjeduju zajednički epitop. Uz povećanje rizika nastanka bolesti, pušenje također pogoršava tijek bolesti (16, 17). Pretpostavlja se da je taj učinak dijelom posredovan promjenom u stvaranju auto-protutijela. Naime, pušenje pojačava izražaj enzima peptidil arginin deiminaze (PAD), koji katalizira pretvorbu arginina u citrulin, u plućnim alveolama (18) te tako potiče nastanak novih citrulinskih epitopa ključnih za stvaranje protutijela ACPA. Uz pušenje, rizičnim čimbenikom se smatra ženski spol, odnosno djelovanje estrogena na imunosni sustav, nuliparnost, izlaganje siliciju te pretilost (19). Također je pokazano da prisutnost određenih patogena i zaraznih bolesti te narušena ravnoteža u crijevnoj flori mogu povećati rizik nastanka bolesti. Primjer toga je periodontalna bolest ili kolonizacija usne šupljine

bakterijama *Porphyromonas gingivalis* (20, 21) ili *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (22) i kolonizacija probavnog sustava bakterijama iz koljena *Actinobacteriae* (23). S razvojem RA već se dugo povezuju virus Epstein–Barr i parvovirus B19, no njihov utjecaj još nije do kraja razjašnjen (24).

### 1.1.3. Patogeneza

Patogenetska zbivanja u različitim stadijima RA detaljno su opisana, a više je teorija o mjestu započinjanja bolesti. Tradicionalni, sinoviocentrični model temelji se na hipotezi da, pod utjecajem okolišnih čimbenika, genetskih faktora te smanjene tolerancije na vlastite antigene dolazi do promjena i razvoja autoimunosti u sinoviji (19, 25, 26). Suprotno tomu, postoje teorije da se pokretanje autoimunosti ne zbiva isključivo u sinovijalnom odjeljku, već na sustavnoj razini, odnosno u limfatičnim organima, a razvoj sinovijalne upale i simptoma artritisa potiče okidač poput zglobne infekcije ili nekog drugog lokalnog čimbenika koji povećava propusnost krvnih žila, potiče stvaranje imunokompleksa, aktivaciju komplementa te privlačenje stanica imunostnog sustava (26). Prema obje teorije zbivanja u sinoviji ključna su za puni razvoj bolesti, a oštećenje okolnih struktura, poput hrskavice i kosti posljedica je širenja i pojačanja upale. Međutim, od nedavno se ispituju i drugi anatomske odjeljci, poput jukstaartikularne ili subhondralne koštane srži, kao mjesta mogućeg započinjanja bolesti iz kojih se upala dalje širi na sinovijalni odjeljak (26).

Tijek RA može se podijeliti u pretklinički i klinički stadij bolesti (19). U pretkliničkom stadiju razvija se autoimunost, a u kliničkom se razvija simptomatski artritis sinovijanih zglobova čijim se daljnjim napredovanjem oštećuju zglobna tkiva i razvijaju strukturne posljedice upale (25). Kombinacijom djelovanja genetskih i okolišnih čimbenika u pretkliničkoj fazi pojavljuju se citrulinirane bjelančevine, primjerice fibrin, fibrinogen, vimentin, kolagen tipa II,  $\alpha$ -enolaza i histoni (27). Citrulinirane bjelančevine predstavljaju nove epitope te potiču stvaranje protutijela ACPA, koja u pojedinih mogu biti prisutna i do 10 godina prije pojave simptoma (28). U daljnjem razvoju bolesti povećava se titar protutijela ACPA, i razvija imunostni odgovor na nove epitope te proširuje spektar epitopa na način da se pojavljuju protutijela na bjelančevine koje su strukturno slične onima za koje već postoje auto-reaktivna protutijela, ili su s tim bjelančevinama usko povezane u tkivu. U ovome stadiju artritisa se još ne pojavljuje, ali razvija se sustavno pro-upalno stanje (25). U kliničkom stadiju bolesti razvija se sinovijalni upalni infiltrat te aktivacija rezidentnih sinovijalnih

stanica, ali i stanica samog infiltrata privučenih visokom lokalnom koncentracijom kemokina. Razvijenu bolest karakterizira hiperplazija sinovijalne ovojnice te u teškim slučajevima bolesti ili pri neučinkovitosti terapije, strukturne posljedice dugotrajne upale, primjerice oštećenje zglobne hrskavice, koštane erozije, gubitak periartikularne kosti i ekstraartikularne manifestacije bolesti.

#### 1.1.4. Značajke reumatoidne sinovijalne membrane

Bez obzira na mjesto početka bolesti, sinovijalna ovojnica je u razvijenoj bolesti glavno mjesto upalnih zbivanja. Sinovijalna membrana je tjelesna membrana koja obavija zglobne šupljine diartroza, odnosno sinovijalnih zglobova, a obavija i mišićne tetive i ekstraartikularne nakupine sinovijalne tekućine, bursae synoviales. Sastoji se od površinskog staničnog sloja, kojeg nazivamo intima, te podležeg vezivnog tkiva, subintime, koje sadrži krvne i limfne žilice, a prema sastavu subintime sinoviju možemo podijeliti na areolarnu, adipoznu i fibroznu (29). Intima sadrži 2-3 reda stanica koje pripadaju jednom od dva tipa: sinoviociti tipa A ili sinovijalni makrofazi (MLS, prema engl. *macrophage-like synoviocyte*) i sinoviociti tipa B ili sinovijalni fibroblasti (FLS, prema engl. *fibroblast-like synoviocyte*). Organizacijom, sinovijalna ovojnica je nalik epitelu, no od njega se razlikuje nedostatkom bazalne membrane i međustaničnih spojeva sinoviocita. Stanice MLS predstavljaju manju populaciju, koja u fiziološkim okolnostima čini do četvrtine sinovijalnih stanica. To su CD(stanični biljeg, prema engl. *cluster of differentiation*)68+ CD163+ stanice monocitne loze, čijim podrijetlom se nekad smatrala koštana srž iz koje dolaze putem krvi, no danas se smatra da potječu od rezidentnih embrionalnih prethodničkih stanica, koje se u sinovijalnom tkivu održavaju sporom kontinuiranom proliferacijom (30). Uloga MLS je uklanjanje otpadnih tvari iz sinovijalne tekućine te održavanje lokalne upalne homeostaze. Stanice FLS su mezenhimnog podrijetla, a izražavaju Thy-1 (CD90), CD55, međustaničnu adhezijsku molekulu 1 (ICAM-1, prema engl. *intercellular adhesion molecule 1*), kolagen tipa 4 i 5, enzim UDP-glukoza 6-dehidrogenazu, vaskularnu staničnu adhezijsku molekulu 1 (VCAM-1, prema engl. *vascular cell adhesion molecule 1*), kadherin 11 (CDH11), CD44 te integrine  $\beta$ 1 (29, 31). Njihova je uloga lučenje hijaluronana i drugih sastojaka izvanstanične tvari sinovijalne tekućine, čime se povećava njezina viskoznost. Za razliku od zdrave sinovijalne ovojnice, reumatoidna sinovijalna ovojnica je hiperplastična i hipervaskularna (32), a u sinovijalnoj tekućini, koja je u fiziološkim okolnostima acelularna, prisutne su stanice imunskog sustava.



Sinovijalna hiperplazija u RA posljedica je nekontrolirane proliferacije i smanjene apoptoze stanica FLS (31), što ima za posljedicu stvaranje invazivnog, dobro vaskulariziranog tkiva (panus), koje oštećuje subkondralnu kost, zglobnu hrskavicu i okolna meka tkiva. Hiperplastični FLS slični su neoplastično transformiranim stanicama, a razlozi navedene promjene još nisu u potpunosti razjašnjeni, no poznato je da nekontroliranoj proliferaciji FLS i njihovoj otpornosti na apoptozu doprinose mutacije u genima poput *p53* (33). Pored stvaranja panusa hipertrofični FLS potiču i podržavaju sinovijalnu upalu, te oštećenje zglobne hrskavice i periartikularne kosti. Upalno potaknuti FLS luče pro-upalne citokine poput IL-6 (34), IL-8 (35) te čimbenik poticanja rasta granulocitnih kolonija (G-CSF, prema engl. *granulocyte colony stimulating factor*) i čimbenik poticanja rasta kolonija granulocita i makrofaga (GM-CSF, prema engl. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*) (36), kojima dodatno aktiviraju stanice upalnog infiltrata i izazivaju upalnu (M1) polarizaciju makrofaga, a luče i čimbenike koji potiču stvaranje novih krvnih žila, poput čimbenika rasta krvožilnog endotela, (VEGF, prema engl. *vascular endothelial growth factor*) (37) i placentarnog čimbenika rasta (PIGF, prema engl. *placental growth factor*) (38). Upalno promijenjeni FLS također sintetiziraju enzime poput metaloproteinaza međustanične tvari (MMP, prema engl. *matrix metalloproteinase*), kolagenaza, agrekanaza, te druge čimbenike, primjerice katepsina i liganda receptora za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa B$  (RANKL, prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa B$  ligand*) koji razaraju izvanstaničnu međustaničnu tvar te posljedično oštećuju zglobnu hrskavicu i subkondralnu kost (30). Izražavanje liganda RANKL glavni je mehanizam poticanja sazrijevanja i aktivnosti osteoklasta i koštane razgradnje. FLS također koče razvoj i sazrijevanje osteoblasta, a time i koštanu izgradnju i cijeljenje, i to izražavanjem bjelančevine iz obitelji Dickkopf (DKK, prema engl. *Dickkopf-related protein*)<sup>1</sup> i sklerostina (39), inhibitora signalnog puta *Wnt*, ključnog za razvoj osteoblasta. Pored hiperplastičnih FLS koji čine glavninu stanica mezenhimne loze u reumatoidnoj sinoviji (39), u sinovijalnoj mezenhimnoj populaciji prisutne su i mezenhimne matične stanice (40) koje imaju sposobnost samoobnavljanja, a prethodnici su stanica masnog tkiva, kosti i hrskavice, te stoga mogu doprinijeti cijeljenju zglobnih tkiva (41). Neke od njih potječu iz koštane srži, dok su druge rezidentna sinovijalna populacija. Nedavno je pokazano da je rezidentna populacija izvor prethodničkih hrskavičnih stanica nužna za regeneraciju hrskavice nakon ozlijeđe (42). Mezenhimne stanice, ovisno o stupnju sazrijevanja izražavaju različite kombinacije površinskih biljega poput Sca-1, CD105, CD90.2, CD140b, CD51 i CD200, međutim niti jedan od navedenih biljega nije specifičan za

ovu populaciju (43). Pored uloge u cijeljenju zglobnih tkiva, dobro je poznata imunomodulacijska sposobnost stanica mezenhimne loze (44).

Uz mezenhimnu lozu, u upaljenom zglobu se nalaze brojne stanice urođene i stečene imunosti, poput mijeloidnih stanica, prirodno-ubilačkih (NK, prema engl. *natural killer*) stanica, limfocita B i T te plazma stanica (45). Mijeloidnu populaciju u sinovijalnom odjeljku bolesnika s RA čine neutrofili, monociti, MLS, makrofazi podrijetlom iz cirkulirajućih monocita, dendritičke stanice, mastociti, supresorske stanice mijeloidnog podrijetla (MDSC, prema engl. *myeloid derived supressor cells*) (46) te prethodničke stanice osteoklasta (OCP, prema engl. *osteoclast progenitor cell*). Broj makrofaga u sinoviji povezan je s kliničkom slikom bolesti (45, 47). Dominantnu populaciju makrofaga u reumatoidnom zglobu predstavljaju makrofazi podrijetlom iz cirkulirajućih monocita privučeni visokom koncentracijom kemokina, a ta je populacija glavni izvor TNF u sinoviji (48). Uloga rezidentnih makrofaga (MLS) u artritisu još nije u potpunosti razjašnjena. Prema nekim istraživanjima u RA dolazi do upalne (M1) polarizacije MLS (49), dok druge studije isključuju sudjelovanje MLS u poticanju upale u RA, koje je prema tome isključivo posljedica djelovanja nerezidentnih makrofaga (50). Opisano je više subpopulacija MLS, od kojih su neki upalno polarizirani, a drugi imaju homeostatsku ulogu te ne potiču upalu u RA (48). Upalno polarizirani (M1) makrofazi i monociti u reumatoidnoj sinoviji luče citokine (TNF- $\alpha$ , IL-15, IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF, transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , prema engl. *transforming growth factor  $\beta$* ) i kemokine (kemokinski ligand s C-X-C motivom (CXCL) 4 i CXCL7) odgovorne za privlačenje monocita i neutrofila, reaktivne spojeve kisika (ROS, prema engl. *reactive oxygen species*), dušikov oksid i njegove derivate te MMP, a svi navedeni čimbenici podržavaju i pojačavaju upalu i nakupljanje stanica imunskog sustava (48, 51). Rijetke dendritičke stanice prisutne su u perivaskularnim subintimalnim područjima normalne sinovijalne ovojnice (52). Broj dendritičkih stanica CD1c<sup>+</sup> povećan je u sinovijalnom odjeljku bolesnika s aktivnim RA, a njihov je broj povećan i u limfnim čvorovima u pretkliničkom stadiju RA (53, 54) i upućuje na njihovu ulogu u razvoju autoimunosti. Njihova pretpostavljena uloga u sinovijalnom odjeljku aktivnog RA je povećanje populacije memorijskih limfocita T te proizvodnja proupalnih citokina i kemokina (50). Glavninu mijeloidne populacije u sinovijalnoj tekućini bolesnika s RA čine neutrofili, koje u sinovijalnom odjeljku aktivira vezivanje imunokompleksa na receptor Fc- $\gamma$  (FcR- $\gamma$ ) (55, 56). Aktivirani neutrofili oslobađaju enzime poput elastaze, gelatinaze, katepsina G, laktoferina, lipokalina povezanog s gelatinazom, proteinaze 3, mijeloperoksidaze i

kolagenaze, čije su visoke koncentracije izmjerene u sinovijalnoj tekućini bolesnika s RA (57, 58), te sintetiziraju i luče ROS (58). Također pojačano izražavaju molekularne posrednike poput pro-osteoklastogeničnog RANKL-a (59), te aktivirajućeg faktora limfocita B (BAFF, prema engl. *B cell activating factor*) (60), a pokazan je i njihov izražaj antigena MHC-II, zbog čega mogu djelovati kao antigen-predočne stanice (APC, prema engl. *antigen presenting cell*) za limfocite T (61). Zbog prisutne hipoksije i visoke koncentracije upalnih posrednika smanjena je apoptoza neutrofila i povećano njihovo preživljavanje u reumatoidnom zglobu (62, 63). Dodatno djelovanje neutrofila u patogenezi RA je stvaranje izvanstaničnih zamki (NET, prema engl. *neutrophil extracellular trap*) koje mogu biti izvor novih auto-antigena i potaknuti stvaranje novih tipova autoreaktivnih protutijela (58, 64). U mišjim modelima RA, pokazano je da deplecija neutrofila sprječava nastanak artritisa u transgeničnom soju K/BxN (65), te artritisu potaknutom protutijelima na kolagen tipa II (CII) i lipopolisaharidom (LPS) (66). Mijeloidnoj lozi pripadaju i OCP, koji su u niskoj frekvenciji normalno prisutni u perifernoj krvi i koštanoj srži, a u upaljenom zglobu se nakupljaju zbog kemokinskog gradijenta. Udio populacije ljudskih OCP, fenotipa CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> u sinoviji i perifernoj krvi bolesnika s RA viši je nego u krvi zdravih osoba (67). Štoviše, subpopulacija OCP pozitivna na RANK, koja predstavlja usmjerene OCP, povezana je s brojem bolnih zglobova (TJC, prema engl. *tender joint count*). Uloga limfocita T u RA široko je istraživana i poznato je da su pomagački limfociti T ključni kako za započinjanje, tako i za održavanje zglobne upale (68). Limfocite T aktiviraju dendritičke stanice, limfociti B i makrofazi. Zbog citokinskog profila u reumatoidnom zglobu dugo se pretpostavljalo se da su T<sub>h</sub>1 stanice ključne za RA jer podržavaju upalu lučenjem pro-upalnih citokina te upalno polariziraju sinovijalne makrofage, međutim novija istraživanja sve više naglašavaju važnost ostalih subpopulacija pomagačkih limfocita T, T<sub>h</sub>2, T<sub>h</sub>17, T<sub>h</sub>9, te regulacijskih limfocita T (T<sub>reg</sub>) (68). Rezultati istraživanja provedenih na mišjim modelima RA, uputili su na važnost uloge stanica T<sub>h</sub>17 u razvoju RA (69), a ona je potvrđena i u studijama na ljudskim ispitanicima, gdje je pokazano da su udio stanica T<sub>h</sub>17 te koncentracija IL-17 povezani s težinom bolesti procijenjenom ljestvicom DAS28 (70) kao i da terapijsko blokiranje TNF dovodi do njihovog sniženja (71). Međutim, rezultati kliničkih studija usmjerenih na blokadu djelovanja limfocita T<sub>h</sub>17 nisu opravdali navedeni pristup. Broj stanica T<sub>h</sub>9 također je povećan u sinovijalnom odjeljku pacijenata s RA i povezan s aktivnošću bolesti. Ove stanice lučenjem IL-9 produljuju životni vijek neutrofila, potiču njihovu sintezu enzima koji razgrađuju međustaničnu tvar te potiču diferencijaciju stanica T<sub>h</sub>17 (72, 73). Stanice T<sub>h</sub>2 luče protu-upalne citokine te aktiviraju limfocite B. Brojna

istraživanja stanica  $T_{reg}$  te njihove uloge u RA imaju proturječne rezultate, što je najvjerojatnije posljedica slabo definiranih metoda za karakterizaciju ove populacije (68, 74). Limfociti T, također izražavaju RANKL i mogu potaknuti sazrijevanje osteoklasta (75). Limfociti B u RA stvaraju auto-reaktivna protutijela, sudjeluju u aktivaciji limfocita T te luče pro-upalne citokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-23 i IL-1 $\alpha$  (68), a memorijski limfociti B izražavanjem liganda RANKL potiču sazrijevanje osteoklasta (76).

### 1.1.5. Periarтикуларна коштана срж у реуматoidном артритису

Iako je upalno zbivanje u sinovijalnom prostoru ključna značajka razvijenog RA, novija istraživanja upućuju na važnost do sada neistraženih, anatomski odvojenih odjeljaka primjerice periarтикуларне коštane сржи. Schett i Firestein 2010. predložili su dvije hipoteze o patogenezi RA. Klasična, sinoviocentrična hipoteza pretpostavlja da upala započinje u sinovijalnoj ovojnici iz koje se potom širi na okolne strukture, dok alternativna hipoteza pretpostavlja da artritis započinje u okolnim strukturama, odnosno u koštanoj сржи (osteitis), iz koje se širi u sinovijalni odjeljak (26). Zbog nedostatka patohistoloških nalaza pretkliničkog ili ranog RA ni jedna od ovih teorija još nije u potpunosti potvrđena. U periarтикуларnoj koštanoj сржи se u tijeku RA nakupljaju stanice imunskog sustava, što je magnetnom rezonancom (MR) vidljivo kao edem koštane сржи. Promjene vidljive na MR posljedica su smanjenja količine masnog tkiva i nakupljanja tekućine. Ova promjena je u literaturi relativno slabo zastupljena u odnosu na zadebljanje, hiperplaziju i hipervaskularizaciju sinovijalne ovojnice, zbog toga što su promjene sinovijalne ovojnice vidljive ultrazvukom, a promjene u koštanoj сржи prikazuju se samo pomoću MR ili histološki, koje se rjeđe koriste u rutinskoj dijagnostici. Pored toga za histološku analizu dostupni su uglavnom uzorci iz kasnijih stadija bolesti koji se kirurški zbrinjavaju. Edem koštane сржи je, osim u RA, prisutan i u nekim drugim upalnim artritima (77, 78) te u osteoartritisu (79, 80). Ulogu subhondralne koštane сржи u patogenezi RA dodatno podupiru rezultati istraživanja koja su pokazala prisutnost edema koštane сржи već u pretkliničkom stadiju RA, koja je povezana s biljezima aktivnosti bolesti, primjerice razinom IL-6 i C reaktivne bjelančevine (CRP, prema engl. *C reactive protein*), kasnijim razvojem agresivnog oblika bolesti (81), te prisutnošću boli (79). U ručnom zglobu je prisutnost edema koštane сржи pokazatelj nastanka lokalnih koštanih erozija (82, 83). U pacijenata s ankilozantnim spondilitisom liječenim protutijelima anti-TNF, smanjenje edema koštane сржи prati olakšanje simptoma bolesti (84). Edem koštane сржи histološki se sastoji od upalnog staničnog infiltrata,

u kojem stanice stvaraju nakupine koje izgledom podsjećaju na germinativne centre sekundarnih limfnih organa (85). Imunohistokemijski je potvrđeno da se dominantno nakupljaju limfociti (85-89), i to prema nekim istraživanjima dominantno limfociti B (87), a prema drugim studijama infiltrat sadrži makrofage, CD8+ limfocite T, limfocite B te plazma stanice (86). Zbog ograničene dostupnosti uzoraka periartikularne koštane srži nema podataka o citološkim nalazima pacijenata s ranim RA, te su navedene populacije periartikularne koštane srži i njihova uloga u patogenezi bolesti još uvijek većinom neistražene. U mišjem modelu CIA, u periartikularnoj koštanoj srži nakupljaju se stanice mijeloidne loze, OCP, F4/80+ makrofazi i Ly6G+ granulociti, a limfociti čine manji relativni udio (90).

#### **1.1.6. Liječenje reumatoidnog artritisa**

Iako uzročno liječenje RA nije moguće razvijeni su različiti terapijski pristupi kojima se smanjuje aktivnost bolesti. Liječenje započeto u ranom stadiju bolesti danas se smatra najvažnijim čimbenikom u sprječavanju nastanka strukturnog oštećenja. Farmakoterapija uključuje lijekove koji ublažavaju simptome bolesti, poput lijekova iz skupine nesteroidnih protu-upalnih lijekova (NSAID, prema engl. *non-steroid anti-inflammatory drugs*) i glukokortikoida, te antireumatske lijekove koji mijenjaju tijek bolesti (DMARD, prema engl. *disease modifying antirheumatic drugs*). Skupina lijekova DMARD dalje se dijeli na konvencionalne lijekove, ciljane sintetičke lijekove i biološke lijekove (91). U prvu skupinu ubrajamo metotreksat, leflunomid, sulfasalazin, klorokin te hidroksiklorokin. Skupini ciljanih sintetičkih antireumatskih lijekova pripadaju inhibitori specifičnih molekularnih posrednika, primjerice Janus-kinaze(JAK)1, JAK2 i JAK3 (baricitinib, tofacitinib). Biološki lijekovi DMARD su monoklonska protutijela ili fuzijske bjelančevine koje inhibiraju TNF- $\alpha$  (infliximab, adalimumab, etanercept, golimumab), uklanjaju (rituximab) ili blokiraju funkciju (belimumab) limfocita B, sprječavaju kostimulaciju limfocita T (abatacept, belatacept), inhibiraju funkciju interleukina te čimbenika rasta (tocilizumab, IL-6; anakinra, rilonacept, canakinumab, IL-1; mavrilimumab, GM-CSF). Primjenu ovih lijekova prate brojne nuspojave, a svima je zajednički povećan rizik razvoja zaraznih bolesti zbog imunosupresije. Cilj liječenja RA je postizanje remisije ili stanja vrlo niske aktivnosti bolesti. Učinkovitim se smatra liječenje koje unutar 3 mjeseca kontinuirane primjene dovodi do minimalno 50% smanjenja simptoma (92). Trenutna je preporuka započinjanje liječenja s metotreksatom, uz davanje glukokortikoida u razdoblju prije početka djelovanja metotreksata (93). U slučaju

postojanja kontraindikacija za primjenu metotreksata, ili njegove neučinkovitosti, liječenje se zamjenjuje drugim konvencionalnim sintetičkim lijekom DMARD. U slučaju neučinkovitosti ovoga pristupa prelazi se na liječenje biološkim ili ciljanim lijekovima DMARD. Usprkos širokoj primjeni lijekova DMARD, u 60-70% bolesnika još uvijek nije moguće postići potpunu remisiju (94). Nadalje, postojeći lijekovi u većoj ili manjoj mjeri koče napredovanje koštanog oštećenja, ali njegovo liječenje trenutno nije moguće.

## 1.2. Životinjski modeli reumatoidnog artritisa

Životinjski modeli RA imaju važnost u istraživanju patogeneze bolesti te u utvrđivanju i procjeni djelotvornosti novih terapijskih pristupa prije provedbe kliničkih studija. Istraživanja na životinjama značajno su pridonijela današnjem poznavanju patogeneze RA te molekularnih i staničnih posrednika i mehanizama koji su u nju uključeni. Za životinjske modele ljudskih bolesti bitne značajke su ponovljivost, jednostavan postupak izazivanja, razumno kratak vremenski tijek bolesti te patohistološke značajke slične ljudskoj bolesti (95). Različiti životinjski modeli RA znatno se razlikuju od ljudske bolesti po vremenu koje je potrebno za njen razvoj i nastanak strukturnog oštećenja, koje je u nekim modelima vrlo kratko, u suprotnosti s dugom pretkliničkom fazom RA te nastankom strukturnog oštećenja tek nakon dugotrajne upale.

Životinjski modeli RA mogu se podijeliti na genske i potaknute. U potaknutim modelima moguće je bolest izazvati u različitim životinja, međutim najčešće se, kao i u genskim modelima, koriste miševi i to zbog niskih troškova održavanja, lakoće rukovanja, brzog razmnožavanja te homogenosti genetske pozadine. U skupinu genskih ili spontanijih modela ubrajaju se miševi soja SKG, K/BxN i transgenični miševi koji izražavaju ljudski TNF (Tg) te IL-1. Artritis se u soju SKG razvija zbog točkaste mutacije u domeni SH2 (prema engl. *Src Homology 2*) proteinske kinaze povezane sa ζ-lancem-70 (ZAP-70, prema engl. *zeta-chain-associated protein kinase 70*), unutarstaničnog enzima koji se aktivira kao posljedica vezanja i aktivacije receptora limfocita T (TCR, prema engl. *T-cell receptor*), te predstavlja ključnu molekulu za prijenos signala putem receptora TCR (96). Promjena signalnog puta nizvodno od TCR dovodi do promjena u negativnom probiru limfocita T i stvaranja autoreaktivnih limfocita T koji uzrokuju artritis, čije histološke značajke te serološki nalazi odgovaraju ljudskom RA, a artritis se razvija u miševa soja BALB/c (97). Soj K/BxN nastao je križanjem transgeničnih miševa koji pojačano izražavaju TCR koji prepoznaje peptide goveđe

ribonukleaze (KRN miševi, na pozadini C57BL/6) te miševa NOD (prema engl. *non-obese diabetic*) (98). Zbog križne reaktivnosti, u prvoj generaciji potomaka, transgenični TCR prepoznaje autoantigen glukoza-6-fosfat izomerazu (G6PI), vezanu na molekulu I-Ag7 sustava MHC II miševa NOD, zbog čega se u dobi od 4-5 tjedana razvija artritis. Prijenos seruma, odnosno molekula IgG tih životinja u zdrave životinje uzrokuje artritis (99). Histopatološki, bolest je slična RA, međutim model je uglavnom posredovan stvaranjem autoreaktivnih protutijela, dok su za razvoj ljudskog RA bitni i drugi posrednici i stanične populacije. Transgenični miševi koji konstitutivno izražavaju ljudski TNF spontano razvijaju erozivni poliartritis (100). Razvoj artritisa se može u potpunosti zapriječiti davanjem protutijela anti-TNF, a budući da se artritis razvija i u miševa SCID (prema engl. *severe combined immunodeficiency*), artritis nije ovisan o limfocitima T i B te stoga nije pogodan za istraživanje terapijskih pristupa koji uključuju djelovanje na te stanice (101). Spontani artritis razvija se i u miševa s pojačanom aktivnošću IL-1, primjerice u transgeničnih miševa koji izražavaju ljudski IL-1 $\alpha$  ili miševa s nedostatkom funkcionalnog antagonista receptora IL-1 (IL-1RA  $-/-$ ). Prvi je model posredovan stanicama urođene imunosti, dok su za razvoj drugog modela ključni limfociti T (102, 103). U potaknutim modelima RA, artritis se najčešće izaziva imunizacijom životinje na vlastiti antigen, injiciranjem peptida sličnog vlastitom antigenu uz adjuvans, najčešće potpuni Freundov adjuvans (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*). CFA se sastoji od mineralnog ulja, emulgatora manid monooleata te bakterije *Mycobacterium tuberculosis* inaktivirane visokom temperaturom. Uloga CFA je produljenje zadržavanja antigena u tkivu i pojačanje njegovog unosa u APC, a zajedno s inaktiviranom bakterijom potiče stanice urođene imunosti, čiji citokini usmjeravaju imunski odgovor prema T<sub>h</sub>1 te se razvija odgođena preosjetljivost (DHT, prema engl. *delayed type hypersensitivity*) na predočeni antigen (104). Imunizacijom na vlastiti antigen izaziva se artritis potaknut kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*), artritis potaknut hrskavičnom oligomernom bjelančevinom međustanične tvari (COMP, prema engl. *cartilage oligomeric matrix protein*), artritis potaknut proteoglikanom te za artritis potaknut enzimom G6PI. Osim vlastitim antigenom, životinje se mogu imunizirati i vanjskim antigenom, primjerice metiliranim goveđim serumskim albuminom (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) koji se po završetku imunizacije injicira izravno u zglobove gdje uzrokuje upalu. Ponekad i sama injekcija adjuvansa ili aktivatora imunskog sustava može izazvati artritis, što je temelj modela artritisa potaknutog adjuvansom nakon injekcije CFA nekim sojevima štakora (105), artritisa potaknutog pristanom u nekim sojevima štakora i miševa (106) te artritisa potaknutom staničnom stjenkom streptokoka (SCWIA, prema engl.

*streptococcal cell wall induced arthritis*) (107). Izazvani artritis dodatno se razlikuju se prema sojevima životinja u kojima ih je moguće izazvati, staničnim i molekularnim posrednicima uključenim u patogenezu, serološkim značajkama (prisutnosti protutijela na vlastite antigene), histopatološkim karakteristikama te broju zahvaćenih zglobova. Najčešće se koristi model CIA, koji se razvija nakon imunizacije podložnih sojeva DBA/1, B10.Q i B10.RIII, čija je značajka haplotip MHC H-2<sup>q</sup> ili H-2<sup>r</sup>, kolagenom tipa II (108). Miševi se imuniziraju injekcijom kokošjeg kolagena tipa II u CFA te 2-3 tjedna nakon toga injekcijom CII u nepotpunom Freundovom adjuvansu (IFA, prema engl. *incomplete Freund adjuvans*). Model posreduju pomagački limfociti T, posebice populacije T<sub>h</sub>1 i T<sub>h</sub>17, a podloga razvoja artritisa je imunosni odgovor na vlastite antigene prisutne u sinovijalnom zglobu. Klinički se, slično ljudskom RA, razvija poliartritis malih zglobova, koji histološki karakterizira upalna infiltracija sinovijalne ovojnice, razaranje zglobne hrskavice, osteitis te razaranje kosti.

### 1.2.1. Artritis potaknut antigenom

Artritis potaknut antigenom (AIA, prema engl *antigen-induced arthritis*) razvija se u zglobovima pokusnih životinja nakon intra-artikularne (i.a) injekcije antigena poput mBSA, ovalbumina ili fibrina, kojim su životinje prethodno imunizirane. Model je nakon imunizacije na fibrin prvi put opisan u zečeva 1962. godine (109), dok je mišji AIA prvi put opisan 1977. godine (110). Antigen kojim se izaziva artritis nabijen je pozitivno, zbog čega se dobro veže na negativno nabijenu površinu zglobne hrskavice te je omogućeno njegovo zadržavanje u zglobu, što produljuje tijek bolesti. Životinja se u AIA imunizira intradermalnom ili potkožnom injekcijom antigena emulgiranog u CFA. Za razliku od ostalih izazvanih modela, AIA je monoartritis koji se razvija samo u injiciranom zglobu, a intenzitet bolesti odgovara količini injiciranog antigena (111). Model se najčešće primjenjuje u miševa, a po potrebi se može izazvati i u zeca, zamorčica i štakora. Za izazivanje mišjeg artritisa najčešće se koristi mBSA, a metilacija naivnog BSA važna je modifikacija jer ga prevodi u kationski antigen (111). U zahvaćenom koljenu razvijaju se promjene koje velikim dijelom odgovaraju ljudskom RA (112), primjerice taloženje imunokompleksa u hrskavici, razvoj hrskavičnih i koštanih erozija te infiltracija sinovijalne ovojnice stanicama imunosnog sustava, što ga čini pogodnim za istraživanje bilo koje od navedenih pojava u RA. Artritis je histopatološki karakteriziran difuznim, perivaskularnim te rjeđe fokalnim nakupljanjem limfocita, plazma stanica i makrofaga u sinovijalnom prostoru. Sinovijalna ovojnica je hiperplastična, a u sinovijalnoj tekućini prisutan je upalni eksudat koji se sastoji od polimorfonuklearnih stanica



te se stvara panus koji invadira zglobnu hrskavicu i subkondralnu kost (110). Iako blaži sinovitis u opisanom modelu može biti prisutan i do 3 mjeseca nakon indukcije (110), zglobna oteklina je najveća 3.-5. dan poslije i.a. injekcije (akutna faza bolesti), a oko 7. dana intenzitet zglobne upale se smanjuje i artritis ulazi u subakutnu fazu (111). Artritis se može ponovno potaknuti sustavnom ili i.a. injekcijom manje količine antigena, što klinički odgovara remisijama i relapsima u tijeku ljudskog RA. Za razliku od ljudskog RA, u ovome modelu limfociti imaju manju tendenciju stvaranja folikula, a u sinoviji se nalazi više makrofaga, zbog činjenice da je za imunski odgovor u AIA važno sudjelovanje stanica urođene imunosti, a tijekom bolesti je akutan za razliku od ljudskog RA (111). Bitna značajka ovoga modela, koja ga čini posebno pogodnim za moje istraživanje je vremenski jasno određen nastup i lokalizacija te učestalost artritisa u 95-100% miševa injiciranih antigenom i.a., što povećava vjerodostojnost usporedbe skupina i omogućuje precizno određivanje vremenske točke uzimanja uzoraka za analizu. Suprotno tomu, CIA se razvija samo u 60-80% injiciranih životinja te nema jasno vremenski definiran tijek. Nadalje, za razliku od CIA, na AIA su osjetljivi miševi soja C57BL/6, koji je ujedno i temeljni soj većine genetski promijenjenih miševa te miševa Fas<sup>-/-</sup> koji su korišteni u istraživanju (113). Zbog iniciranja antigena u koljeno, za razliku od artritisa u modelu CIA, artritis nije ograničen na male zglobove što ga čini pogodnim za istraživanje oštećenja subkondralne kosti i zglobne hrskavice, čija je procjena lakša u većim zglobovima, a prisutnost periartikularnog koštanog razaranja ga čini povoljnim i za istraživanje patogeneze te pojave (114).

### **1.3. Gubitak kosti u reumatoidnom artritisu**

Gubitak kosti općenito je posljedica neuravnotežene koštane pregradnje, ključne za pravilnu mehaničku i metaboličku funkciju kosti, pri čemu nad izgradnjom koštanog tkiva dominira njegova razgradnja. Koštana pregradnja odvija se posredovanjem dva tipa stanica, osteoblasta i osteoklasta. Osteoblasti odlažu koštanu međustaničnu tvar, mezenhimnog su podrijetla, a njihovi prethodnici se najčešće nalaze u koštanoj srži, ali i u drugim tkivima, primjerice u sinoviji. Osteoklasti su multinuklearne stanice hematopoetskog podrijetla odgovorne za koštanu razgradnju. Na koštanu pregradnju djeluju brojni hormoni, citokini, kemokini te drugi čimbenici čija koncentracija može biti promijenjena u različitim patološkim stanjima, a to se posebice odnosi na upalu koja izaziva promjenu aktivnosti, sazrijevanja i proliferacije koštanih stanica. Zbog brojnih međudjelovanja stanica koštanog i imunskog sustava, od 2000. godine je definirano novo interdisciplinarno istraživačko područje, osteoimunologija

(115) koje istražuje međudjelovanje koštanog i imunosnog sustava, a upravo ta vrsta istraživanja doprinijela je razumijevanju gubitka kosti u upalnim bolestima poput RA. Gubitak kosti tijekom RA odvija se na lokalnoj i sustavnoj razini (116). Karakteristične lokalne promjene su pojava koštanih erozija, odnosno fokalni gubitak kostiju i periartikularna osteopenija. Sustavni gubitak kosti očituje se pojavom generalizirane osteopenije. Primjena lijekova poput abatacepta, rituximaba i inhibitora TNF- $\alpha$  i IL-1 smanjuje napredovanje radiografskih promjena u RA. Inhibicija JAK također koči nastanak strukturnog oštećenja (117). Međutim, lijekovi DMARD samo u 10% pacijenata uzrokuju poboljšanje koštanih erozija stvorenih prije početka terapije (118). Primjena paratiroidnog hormona (PTH) u mišjim modelima djelovala je obećavajuće (119), međutim kliničke studije nisu potvrdile njegovu učinkovitost (120). Denosumab, monoklonsko protutijelo koje inhibira RANKL, usporava nastanak erozija, ali njegov je učinak na popravak već nastalih erozija također ograničen (121). S obzirom da koštane erozije nisu reverzibilna promjena, otkrivanje specifičnih posrednika lokalnog koštanog razaranja moglo bi unaprijediti mogućnosti liječenja koštanih posljedica RA.

### 1.3.1. Lokalni gubitak kosti

Lokalni gubitak kosti u RA može se podijeliti u dvije kategorije: fokalni gubitak kosti, koji označava pojavu lokaliziranih koštanih erozija u kortikalnoj kosti te podležućoj spužvastoj kosti, te periartikularni gubitak kosti, koji označava gubitak metafiznih koštanih gredica uz zahvaćeni zglob (116).

Lokalne koštane erozije u RA značajan su prognostički faktor, jer je njihova pojava povezana s lošim kliničkim ishodom i povećanom stopom razvoja invalidnosti (122). Odsutnost koštanih erozija bitan je indikator uspješnosti novouvedene farmakoterapije. Zbog svega navedenog, prisutnost erozivne bolesti u pacijenata s RA se rutinski prati (117), te su 2010. godine koštane erozije uključene u kriterije za klasifikaciju RA Američkog reumatološkog odbora (ACR, prema engl. *American College of Rheumatology*) i Europske lige protiv reumatizma (EULAR, prema engl. *European League Against Rheumatism*) (123). Erozije se razvijaju u područjima izravnog dodira kortikalne kosti s panusom, u kojima je dobro opisana prisutnost osteoklasta (124). Panus sadržava brojne aktivirane stanice imunosnog sustava i upalno aktivirane fibroblaste, koje lučenjem različitih posrednika utječu na koštanu pregadnju. Iako se pretpostavlja da većina posrednika lokalnih koštanih erozija dolazi iz

sinovije, njihovom razvoju značajno doprinose i upalna zbivanja u subhondralnoj koštanoj srži.

Periartikularna osteopenija označava gubitak metafiznih koštanih gredica uz zahvaćeni zglob, značajka je ranog stadija RA i pojavljuje se prije nastanka lokalnih koštanih erozija (116). Gubitak kosti odvija se u području koje nije u izravnom dodiru s upaljenom sinovijom, te je vjerojatno posljedica djelovanja upalnih stanica nakupljenih u koštanoj srži (116). Budući da u razvijenoj erozivnoj bolesti panus može prodrijeti kroz kortikalnu kost (116), a već i prije toga moguća je difuzija citokina iz sinovijalnog odjeljka kroz Volkmanove i Haversove kanale (125), sinovijalni posrednici također su uključeni u patogenezu periartikularnog gubitka kosti. Nadalje, za periartikularnu osteopeniju djelomično su odgovorni sustavna upala praćena visokom razinom citokina u krvi te smanjena pokretljivost bolesnika. Budući da se periartikularna osteopenija razvija znatno prije sustavnog gubitka kosti, doprinos lokalnih posrednika u njenom razvoju smatra se značajnijim od doprinosa sustavnih posrednika.

Osteoklastogenezu u RA mogu potaknuti čimbenici koji djeluju izravno na osteoklaste te potiču njihovu diferencijaciju, poput ACPA i čimbenik poticanja rasta kolonija makrofaga (M-CSF, prema engl. *macrophage colony stimulating factor*), ili čimbenici, primjerice upalni citokini, koji pojačavaju izražaj liganda RANKL u upaljenom zglobu te tako neizravno potiču sazrijevanje i aktivnost osteoklasta. Pokazano je da je prisutnost ACPA i RF povezana s pojavom erozija u pacijenata s RA (126), a i sustavnim gubitkom kosti. ACPA na koštane stanice djeluju izravno ili neizravno. Izravno aktiviraju receptor  $FC\gamma$  na osteoklastima, ili potiču njihovo sazrijevanje vezivanjem za citrulinirane bjelančevine poput vimentina na staničnoj membrani osteoklasta (127). Neizravno potiču lučenje  $TNF-\alpha$  iz makrofaga, koji potom djeluje na sazrijevanje OCP. Budući da su auto-protutijela prisutna već u pretkliničkom stadiju bolesti, smatra se da su uključena u rani gubitak kosti, prije nastupa simptoma. Važnost liganda RANKL u koštanom razaranju potvrđena je u pokusima provedenim na miševima s izbačenim genom za RANKL (RANKL  $-/-$ ), kojima nedostaju zreli osteoklasti te su zaštićeni od koštanih erozija u mišjem modelu RA (128). Citokini  $TNF-\alpha$ , IL-1, IL-6 i IL-17 pojačavaju izražaj RANKL i tako potiču osteoklastogenezu, ali za  $TNF-\alpha$ , IL-17, IL-32, IL-33 pokazan je i izravni učinak na osteoklastne prethodnike (125, 129). U sinovijalnom odjeljku izražaj liganda RANKL je opisan na limfocitima B i T, sinovijalnim fibroblastima, makrofazima i dendritičkim stanicama (125). Limfociti T te sinovijalni fibroblasti dugo su smatrani glavnim izvorom liganda RANKL u upaljenom zglobu, no

nedavno provedene studije na miševima s inaktivacijom gena *RANKL* specifičnom za populaciju pokazale su da je za razvoj koštanog oštećenja ključan izražaj funkcionalnog liganda RANKL na sinovijalnim fibroblastima (130).

Iako se pojačana osteoklastogeneza opisuje kao značajan čimbenik koštanog razaranja u RA, narušenu ravnotežu koštane pregadnje u ovoj bolesti karakterizira i smanjeno sazrijevanje i aktivnost stanica osteoblastne loze, zbog poremećene ravnoteže čimbenika koji reguliraju ta zbivanja u upalnom okolišu. U RA je pojačan izražaj endogenih inhibitora signalnog puta Wnt, poput DKK1, bjelančevine srodne Frizzled obitelji receptora (sFRP, prema engl. *secreted frizzled-related protein*) te sklerostina. Pojačan izražaj sFRP-1 i sFRP-2 opisan je u sinovijalnom tkivu miševa s artritismom (131). Sinovijalni fibroblasti bolesnika s RA izloženi povećanoj koncentraciji TNF- $\alpha$ , pojačano izražavaju DKK-1 (132). Izražaj DKK-1 povećan je i u serumu pacijenata s RA (133) i miševa s artritismom, a inhibicija DKK-1 u mišjem modelu artritisa može zapriječiti nastanak lokalnih erozija (134). Za razliku od bjelančevina sFRP i DKK1, o ulozi sklerostina podatci su nejasni. Povišena razina sklerostina nije potvrđena u ljudskom RA, a u životinjskim modelima njegov je nedostatak ili ublažio, ili pogoršao artritis (135-138). Osim specifičnih učinaka *Wnt* signalnoga puta, sazrijevanje osteoblasta u artritisu kože i proupalni citokini, poput TNF- $\alpha$  (139) i IL-6 (140). Upalno promijenjen koštani mikrookoliš može također smanjiti i broj mezenhimalnih prethodničkih stanica u RA (117, 141). Mezenhimne stanice iz sinovijalne tekućine pacijenata s juvenilnim idiopatskim artritismom (JIA) pojačano izražavaju upalne markere te imaju smanjenu sposobnost sazrijevanja u osteoblaste (142).

### **1.3.2. Sustavni gubitak kosti**

Iako se pri liječenju bolesnika s RA naglasak stavlja na praćenje lokalnog gubitka kosti i to zbog njegove uloge u nastanku deformiteta i razvoju invalidnosti, sustavni gubitak kosti očituje se njenom smanjenjom mineralnom gustoćom (BMD, prema engl. *bone mineral density*) koja povećava rizik od prijeloma (143) čak do 30-40% (144). Za razliku od lokaliziranog, sustavni gubitak kosti nije specifičan za RA. Generalizirana osteopenija prati i druge autoimunosne bolesti (145) kronične infekcije (146) te ostale kronične upalne poremećaje, a doprinosi joj i uporaba kortikosteroida (147). Sustavna osteopenija se u RA pripisuje visokim koncentracijama proupalnih citokina, poput TNF- $\alpha$  te IL-6, koji se iz upaljene sinovije prelijevaju u krvotok i sustavno djeluju na sazrijevanje i funkciju koštanih

stanica te pomiču ravnotežu koštane pregradnje na stranu pojačane razgradnje (125). Dodatni čimbenici koji pogoršavaju sustavnu osteopeniju su visoka dob, nepravilna prehrana i smanjena pokretljivost bolesnika te terapijska primjena glukokortikoida.

## 1.4. Sustav Fas/ligand Fas

### 1.4.1. Građa, tkivni i stanični izražaj receptora i liganda Fas

Receptor Fas (Fas, CD95, Apo-1, TNFRSF6) transmembranska je glikozilirana bjelančevina tipa II, čija je uloga u aktivaciji vanjskog apoptotičkog puta detaljno opisana. Receptor molekulske mase 48 kDa tvori 319 aminokiselina, a član je nadobitelji TNF. Tipičan je predstavnik podskupine smrtonosnih receptora (DR, prema engl. *death receptor*), koje od drugih pripadnika nadobitelji TNF razlikuje prisutnost unutarstanične, 70 aminokiselina duge smrtonosne domene (DD, prema engl. *death domain*) nužne za unutarstanični prijenos signala (148). Pored unutarstaničnog dijela s DD, receptor ima i transmembranski i izvanstanični dio, koji su tipični za članove nadobitelji TNF. Na izvanstaničnom dijelu su 3 domene bogate aminokiselinom cistein (CRD, prema engl. *cysteine-rich domain*). Alternativnim prekrajanjem (prema engl. *alternative splicing*), može se sintetizirati receptor Fas bez transmembranske domene koji se luči kao topljivi receptor (sFas, prema engl. *soluble Fas receptor*), te vjerojatno negativno regulira aktivaciju membranskog receptora natječući se sa njime za vezanje FasL (149, 150). Osim na stanicama imunskog sustava poput limfocita B i T, dendritičkih stanica, timocita, makrofaga, receptor Fas prisutan je na brojnim drugim stanicama zdravog i tumorskog tkiva, primjerice na kardiomiocitima, hepatocitima te stanicama bubrega, gušterače i mozga (151, 152).

Ligand Fas (FasL, CD178, APO1L) transmembranska je bjelančevina tipa II, molekulske mase 40 kDa i član je nadobitelji liganada TNF, a specifično prepoznaje i vezivanjem aktivira receptor Fas. Slično receptoru Fas, sastoji se od izvanstanične, transmembranske i unutarstanične domene, no za razliku od receptora C-terminalni dio nalazi se izvanstanično, dok je N-terminalni dio usmjeren prema citoplazmi. Izvanstanični dio liganda nosi domenu za vezanje s receptorom Fas, dio osjetljiv na metaloproteinaze, te domenu za samonakupljanje, koja uvjetuje homotrimerni oblik FasL na staničnoj membrani (148). Djelovanjem metaloproteinaza na osjetljive sekvence izvanstaničnog dijela nastaje topljivi FasL (sFasL, prema engl. *soluble Fas ligand*) molekulske mase 26 kDa, također prisutan u trimernom obliku (153), a za poticanje apoptoze nužna je njegova heksamerizacija (154,

155). Prema nekim istraživanjima vezanje sFasL koči apoptotička, citotoksična i proupalna zbivanja onemogućujući vezanje membranskog FasL (156-158). Opisana je i pojava funkcionalnog, membranskog oblika FasL na eksosomima, a njegova uloga još nije u potpunosti razjašnjena, iako se pretpostavlja da sudjeluje u regulaciji imunosne homeostaze i predstavlja zaštitni mehanizam koji tumorske stanice štiti od uklanjanja posredstvom stanica imunosnog sustava (159-161). Za razliku od receptora Fas, izražaj FasL ograničen je na citotoksične limfocite T, neke pomagačke limfocite T, stanice NK te stanice imunosno odijeljenih tkiva poput oka, sjemenika i posteljice te neke tumorske stanice (162-164). FasL se, uz receptor Fas, može vezati i za lažni receptor DcR3 (prema engl. *decoy receptor 3*), topljivu bjelančevinu iz nadobitelji receptora TNF, koja kompetitivno inhibira njegovo vezanje za receptor Fas, te vjerojatno ima regulacijsku ulogu (165). Unutarstanični dio FasL sadrži nekoliko konzerviranih signalnih motiva poput mjesta koje može fosforilirati kazeinska kinaza te domene bogate prolinom (PRD, prema engl. *proline rich domain*) koja može vezati adaptorske molekule ili tirozinske kinaze s domenom SH3 (prema engl. *Src Homology 3*), a omogućuju obrnutu signalizaciju liganda u stanici koja ga izražava (166). Prema nekim istraživanjima ovaj način signalizacije djeluje kao kostimulator citotoksičnih limfocita T nakon aktivacije TCR (167), a opisano je i negativno regulacijsko djelovanje na proliferaciju aktiviranih limfocita B i T (168, 169).

#### 1.4.2. Signalni putevi sustava Fas/ligand Fas

Najpoznatiji i najbolje karakterizirani signalni put nakon aktivacije receptora Fas je vanjski apoptotički put. Vezanje FasL za receptor Fas prvo potiče oligomerizaciju membranskih sklopova receptor-ligand, a potom i privlačenje unutarstaničnih adaptorskih molekula i homotipičnih interakcija s njihovim domenama, budući da intracelularni dio receptora Fas nema vlastitih katalitičkih svojstva. Prijenos signala započinje trimerizacijom, a potom oligomerizacijom homotrimeričkog sklopa receptor-ligand, koje međusobno približava unutarstanične DD, i time privlači adaptorske molekule (170, 171). Adaptorske molekule smrtonosnih receptora su smrtonosna domena pridružena receptoru Fas (FADD, prema engl. *Fas associated death domain*) i smrtonosna domena pridružena receptoru TNF (TRADD, prema engl. *TNF receptor associated death domain*), od kojih prva potiče apoptotičke, a druga neapoptotičke signalne puteve (170, 172). Vezivanje odgovarajućeg liganda na receptor Fas, te DR4 i DR5 privlači molekulu FADD, čije se domene DD udruže sa domenama DD receptora. FADD potom svojom drugom domenom, izvršnom smrtonosnom

domenom (DED, prema engl. *death effector domain*), veže domenu DED pro-kaspaze 8 u miša, odnosno kaspaze 8 i 10 u ljudi, čime se stvara signalni sklop koji potiče staničnu smrt (DISC, prema engl. *death inducing signaling complex*) (171). Stvaranje sklopa DISC podložno je negativnoj regulaciji bjelančevinom c-FLIP (prema engl. *cellular FADD-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme inhibitory protein*) koja je strukturno slična pro-kaspazi 8 te veže FADD i tako ga inaktivira (173). Stvaranje sklopa DISC dovodi do dimerizacije i konformacijske promjene pro-kaspaze 8, a to započinje njenu autoproteolitičku aktivaciju i opuštanje u citosol (174). Ovisno o kinetici signalizacije te potrebi za uključenjem mitohondrijskog signalnog puta za postizanje apoptotičkog učinka razlikujemo 2 tipa stanica (175). U stanicama tipa I, primjerice limfocitima, nakon vezanja liganda Fas za receptor Fas stvara se veća količina sklopa DISC te se brzo aktiviraju efektorske kaspaze i nastupa apoptoza (175). U tim stanicama inicijacijska kaspaza 8 proteolitički aktivira efektorske kaspaze 3, 6 i 7, koje potom aktiviraju endonukleaze i proteaze koje razgrađuju sadržaj jezgre i citoplazme. Za razliku od tipa I, u stanicama tipa II, primjerice hepatocitima, stvara se relativno malo aktivirane kaspaze 8, pa je za aktivaciju efektorske kaspaze 3 nužna aktivacija mitohondrijskog (unutarnjeg) apoptotičkog puta (175). U ovim stanicama, pro-kaspaza 8 aktivira smrtonosni agonist BID (prema engl. *Bcl2-homology 3(BH3)-interacting domain death agonist*), bjelančevinu iz obitelji BCL-2 (prema engl. *B-cell lymphoma 2*), i to njene podskupine proapoptičkih čimbenika koji sadrže samo homolognu domenu BH3 (prema engl. *BH3-only proteins*), čije odsijecanje uzrokuje oligomerizaciju antagonista BCL-2 BAK (prema engl. *BCL-2 antagonist killer 1*) te BCL-2-asocirajuće bjelančevine x (BAX, prema engl. *BCL-2 associated x protein*) te posreduje povećanje propusnosti mitohondrijske membrane i opuštanje mitohondrijskih proapoptičkih čimbenika u citoplazmu (176, 177). Citokrom c otpušten u citoplazmu potiče stvaranje apoptosoma koji aktivira prokaspazu 9, a ona potom aktivira nizvodne efektorske kaspaze (176). Osim putem opisanog signalnog puta Fas-FADD-kaspaza 8, poznato je da Fas može pokrenuti staničnu smrt i u odsutnosti kaspaze, alternativnim putem čija važnost još nije do kraja razjašnjena, a potiče ga udruživanje molekule FADD, s proteinskom kinazom povezanom s receptorom (RIP, prema engl. *receptor-interacting protein kinase*)<sup>1</sup> i RIP3, čime se stanica uvodi u nekroptozu (178).

Iako je receptor Fas primarno opisan kao posrednik stanične smrti sve je više istraživanja koja opisuju aktivaciju neapoptičkih signalnih puteva kao posljedicu ligacije receptora Fas, čime se potiče preživljavanje stanica, njihova proliferacija, migracija, lučenje citokina, tumorski rast i metastaziranje. Dok su signalni putevi koji posreduju staničnu smrt detaljno

karakterizirani i opisani, neapoptički signalni putevi još nisu u potpunosti razjašnjeni, ali poznato je da ligacija receptora Fas može aktivirati signalni put jezgrenog čimbenika  $\kappa B$  (NF $\kappa B$ , prema engl. *nuclear factor  $\kappa B$* ) te signalni put proteinske kinaze aktivirane mitogenom (MAPK, prema engl. *mitogen-activated protein kinase*) (173).

Općenito su smrtonosni receptori sposobni potaknuti apoptozu putem opisanog signalnog puta u kojem se za receptor veže adaptorska molekula FADD, što u konačnici dovodi do aktivacije kaspaze 8, te aktivirati NF $\kappa B$  signalni put interakcijom receptora s adaptorskom molekulom TRADD, na koju se vežu RIP i čimbenik povezan s receptorom TNF (TRAF, prema engl. *TNF receptor-associated factor*)<sup>2</sup> te oslobađaju čimbenik NF $\kappa B$  iz sklopa s inhibitorima (170, 173). Ligacija receptora DR4, DR5 i Fas dominantno aktivira apoptički signalni put, dok ligacija receptora DR3 i TNFR1 dominantno aktivira NF $\kappa B$  signalni put. S obzirom da kaspaze cijepaju posrednike signalnog puta NF $\kappa B$ , a posrednici signalnog puta NF $\kappa B$  pojačavaju izražaj anti-apoptičkih čimbenika poput c-FLIP i staničnog inhibitora apoptoze (cIAP, prema engl. *cellular inhibitor of apoptosis protein*)<sup>1</sup>, ovi se signalni putevi međusobno inhibiraju. Pretpostavlja se da se u slučaju inhibicije dominantno aktivnog signalnog puta može aktivirati alternativni signalni put te bi sukladno tome inhibicija apoptoze u stanicama s aktiviranim receptorom Fas mogla pojačati aktivnost signalnog puta NF $\kappa B$  (179-181). Primjerice, ligacija receptora Fas u stanicama tipa II sa visokom koncentracijom anti-apoptičkih faktora, koji koče mitohondrijski put nužan za provedbu apoptoze može dovesti do aktivacije signalnog puta NF $\kappa B$  (173). Nedavno je pokazano da je kod određenih razina aktivacije receptora Fas moguća simultana aktivacija oba signalna puta u istoj stanici, ali se konačni rezultat međusobno isključuje. U tom primjeru odluka o apoptozi ili preživljavanju ovisi o kinetici stvaranja kaspaze 3 u odnosu na količinu NF $\kappa B$ . U slučaju da se stvara dovoljno NF $\kappa B$  prije nastanka kritične količine kaspaze 3 (količina kaspaze 3 nakon koje je stanična smrt jedini mogući ishod) stanica preživi, jer posrednici NF $\kappa B$  uspiju zakočiti pro-apoptičke posrednike, dok u suprotnom primjeru stanica ulazi u apoptozu (182). Predložena su dva načina aktivacije NF $\kappa B$  ligacijom receptora Fas: signalni put u kojem se na sklop FADD-kaspaza 8 pomoću homotipičnih interakcija (posredovanim domenom DD) vežu TRADD, RIP i TRAF-2 te aktiviraju kinazu I $\kappa B$  (IKK, prema engl. *I $\kappa B$  kinase*) i oslobađaju čimbenik NF $\kappa B$  iz sklopa s inhibitorom NF $\kappa B$  (I $\kappa B$ , prema engl. *inhibitor of nuclear factor  $\kappa B$* ); te drugi signalni put neovisan je o RIP i TRAF-2, posredovan kaspazom 3, koja aktivira kinazu kinaze MAPK (MEKK, prema engl. *MAPK kinase kinase*)<sup>1</sup> i potiče aktivaciju signalnog puta MAPK, koji nizvodno aktivira NF $\kappa B$  (173).



Aktivacija receptora Fas može potaknuti sva tri signalna puta MAPK: put posredovan kinazama reguliranim izvanstaničnim signalima (ERK, prema engl. *extracellular signal regulated kinases*), put posredovan kinazama koje fosforiliraju N-terminalni dio čimbenika c-Jun (JNK, prema engl. *c-Jun N-terminal kinases*) i put posredovan kinazom p38 (173, 183, 184). Jedan od načina na koje aktivacija receptora Fas uzrokuje aktivaciju ovih signalnih puteva je aktivacija enzima skupine MEKKK posredovana kaspazom (173). Aktivacija signalnog puta MAPK se u tom slučaju zbiva istovremeno s apoptozom, no pretpostavlja se da se aktivacija signalnog puta MAPK uz malu količinu kaspaza odvija u odsutnosti apoptoze u stanicama tipa II, uz pretpostavku da je mitohondrijski put inhibiran (173). Osim kaspazom-posredovane aktivacije MEKKK, domena DD može vezati bjelančevinu DAXX (prema engl. *death domain-associated protein 6*), koja potom privlači kinazu koja regulira apoptotički signal 1 (ASK1, prema engl. *apoptosis signal-regulating kinase 1*), koja također može aktivirati signalni put MAPK (173, 185). Također se pretpostavlja da Fas može aktivirati MAPK privlačenjem kinaze obitelji Src za unutarstanični dio receptora Fas i aktivacijom signalnog puta fosfatidil-inozitol 3-kinaze (PI3K) (173).

Konačni ishod ligacije receptora Fas u smislu pokretanja apoptotičkog i neapoptotičkih signalnih mehanizama osim o prisutnosti i koncentraciji inhibitora apoptotičkog signalnog puta (c-FLIP, IAP i anti-apoptotički čimbenici obitelji BCL-2), ovisi i o posttranslacijskim preinakama samog receptora, te ravnoteži i međudjelovanju posrednika aktiviranih signalnih puteva (184), a oni dodatno ovise o vrsti stanice i njenom okolišu.

### **1.4.3. Uloga sustava Fas/ligand Fas**

#### **1.4.3.1. Imunosni sustav**

Stanična smrt posredovana međudjelovanjem receptora i liganda Fas opisana je izvorno kao jedan od homeostatskih regulatora imunosnog sustava. Apoptozom višekратно stimuliranih i autoreaktivnih limfocita T, sustav Fas/FasL ograničava stanični imunosni odgovor i održava perifernu toleranciju (186). Ponavljana aktivacija pojačava izražaj FasL na membrani limfocita T, koji vezivanjem na receptor Fas na istoj ili susjednim stanicama potiče njihovu apoptozu, a taj se mehanizam naziva stanična smrt izazvana pobudom (AICD, prema engl. *activation-induced cell death*) (187-189). Uloga sustava Fas/FasL u imunosnoj homeostazi razješnjena je i potvrđena u mišjim modelima nedostatnosti ovoga sustava. U mišjem soju MRL sa spontanom mutacijom receptora Fas, 1977. godine je opisan poremećaj nazvan *lpr*

(limfoproliferacija, prema engl. *lymphoproliferation*) karakteriziran sustavnom limfoproliferacijom i autoimunošću (190). U ovom poremećaju umetanje ranog prijenosnog elementa (prema engl. *early transposable element*) mišjeg retrovirusa u intron 2 receptora Fas na kromosomu 19 uzrokuje poremećeno prekrajanje i prijevremeni završetak transkripcije Fas mRNA (191). Uz klasičnu mutaciju *lpr*, opisan je i alel *lpr<sup>cg</sup>*, u kojem točkasta mutacija u egzonu 9, koji kodira domenu DD, uzrokuje zamjenu izoleucina s asparginom te tako ometa prijenos apoptotičkog signala receptora Fas (192). Spontana mutacija mišjeg liganda FasL prvi put je opisana u mišjem soju C3H, a karakterizirana je splenomegalijom, limfadenopatijom, intersticijskim pneumonitisom i skraćenim životnim vijekom te ponekad, anemijom i leukocitozom (193). Zbog fenotipskih značajki miševi su nazvani *gld* (opći limfoproliferativni poremećaj, prema engl. *generalized lymphoproliferative disorder*). Mutacija se u ovom poremećaju sastoji u zamjeni timidina citozinom blizu 3' kraja gena FasL na kromosomu 1, a dovodi do zamjene fenilalanina leucinom na 273. mjestu konzerviranog izvanstaničnog dijela mišjeg FasL (194). Zamjena aminokiseline ne pogađa izravno vezno mjesto za receptor Fas, ali dovodi do njegovih strukturnih promjena i otežava vezanje receptora Fas (194, 195). Uz razvoj autoimunskog poremećaja čija klinička slika sliči sistemskom eritemskom lupusu (SLE) u miševa *lpr* i *gld* opisano je nakupljanje dvostruko negativnih (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>) limfocita T u limfatičnim tkivima, te pojava autoprotutijela (193, 196, 197). Sličnost fenotipa *lpr* i *gld* u miševa istog temeljnog soja te pokusi presađivanja koštane srži doveli su do zaključka su da se radi o paru receptor–ligand (198). Za mutacije *lpr* i *gld* zbog njihovih karakteristika dugo se pretpostavljalo da ne sprječavaju u potpunosti sintezu glasničke RNA (mRNA, prema engl. *messenger RNA*) receptora i liganda Fas (191, 194), a prisutnost Fas mRNA u miševa *lpr* potvrđena je u nekim tkivima (199). Iako su opisane spontane mutacije značajno doprinijele razumijevanju uloge receptora i liganda Fas, zbog njihove nepotpune penetracije prednost se daje modelima s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ) (200) ili FasL (FasL  $-/-$ ) (201)). U miševa Fas  $-/-$  nedostaje veći dio egzona 9, koji kodira citoplazmatski dio, odnosno domenu DD. Uz simptome koji se pojavljuju u miševa sa spontanim mutacijama, miševi s izbačenim genom za Fas ili FasL razvijaju i hepatomegaliju. Limfoproliferacija je intenzivnija i nastupa ranije, a ne nakupljaju se samo dvostruko negativni limfociti T, nego i normalni limfociti T i B, te se proizvodi veća količina auto-protutijela (200-202). Nadalje, za otkrivanje uloge receptora i liganda Fas u pojedinim subpopulacijama stanica imunskog sustava koriste se miševi u kojima je gen za receptor Fas uvjetno inaktiviran u pojedinačnim lozama pomoću sustava Cre/loxP, u kojem rekombinaza Cre posreduje rekombinaciju između dviju susjednih regija lokusa

rekombinacije bakteriofaga P (loxP, prema engl. *locus of crossover in P1*) i time izrezivanje odsječka genoma koji se nalazi među njima. Funkcionalnost sustava Cre/loxP za lozno-specifičnu inaktivaciju receptora Fas postiže se križanjem miševa koji sadrže dva Fas alela *floxed* (Fas<sup>fl/fl</sup>), gdje su loxP sekvence ubačene oko zapisa za egzon 9, koji kodira smrtonosnu domenu (203), sa sojem koji izražava Cre rekombinazu pod kontrolom lozno-specifičnog promotora. Izrezivanje smrtonosne domene prekida signalizaciju receptora u određenoj lozi. Važnost limfocita T i B za razvoj limfoproliferacije u mišjim modelima s nedostatnostima sustava Fas/FasL je isprva sugerirana u studijama koje pokazuju da timektomija (204, 205), indukcija izražaja Fas na limfocitima T *lpr* miševa (206) te nedostatak limfocita B u *lpr* miševa (207) u nekoj mjeri ublažuju limfoproliferativnu bolest. Kasnije je u miševa soja C57BL/6 s nedostatkom receptora Fas u svim limfocitima T (*lck-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>*, *CD4-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>*) ili u aktiviranim CD8<sup>+</sup> limfocitima T (*GZB-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>*) pokazano, da ovi miševi ne razvijaju limfadenopatiju i splenomegaliju (203, 208). Suprotno tome, nedostatak receptora Fas u tim populacijama u prvoj generaciji potomaka križanja miševa soja C57BL/6 i MRL ((C57BL/6XMRL)F1) uzrokuje blaži oblik limfoproliferacije (203). Bolest je u *lck-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>*, *CD4-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>* i *GZB-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>* miševa soja C57BL/6 praćena smanjenim nakupljanjem autoprotutijela (203, 208), a u miševa *CD4-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>* čak je opisana limfopenija (203). Dok Hao i sur. (203) opisuju da u miševa *CD4-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>* skoro pa izostaje nakupljanje dvostruko negativnih limfocita T karakterističnih za miševe s nedostatkom receptora Fas u sve populacije, Stranges i sur. (208) u sojevima *lck-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>* i *GZB-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>* pokazuju njihovo nakupljanje. Miševi soja C57BL/6 i (C57BL/6XMRL)F1 s nedostatkom receptora Fas u limfocitima B (*CD19-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>*) prema istraživanju Hao i sur. iz 2004. pokazuju isti fenotip kao miševi s nedostatkom u limfocitima T, te također opisuju isti fenotip kad je receptor Fas istovremeno inaktiviran u limfocitima B i T (203). Suprotno tome, Stranges i sur. te Hao i sur. 2008. u miševa *CD19-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>* soja C57BL/6 opisuju splenomegaliju i limfoproliferaciju, no limfoproliferacija se pojavljuje tek u starijoj dobi koju Hao i sur. u prvoj studiji nisu istraživali (208, 209). Specifični nedostatak receptora Fas u dendritičkim stanicama (*CD11c-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>*) uzrokuje splenomegaliju te nakupljanje autoprotutijela (208). Također, dolazi do nakupljanja dendritičkih stanica bez funkcionalnog receptora Fas, što upućuje na njihovo uklanjanje pomoću sustava Fas/FasL. Nedostatak receptora Fas u mijeloidnoj lozi u miševa *LysM-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>* uzrokuje nakupljanje autoprotutijela, te splenomegaliju (210). Slično miševima sa sustavnim nedostatkom receptora Fas, ovi miševi razvijaju glomerulonefritis posredovan taloženjem imunokompleksa. U tom soju su također prisutne brojne promjene u udjelima monocita,

makrofaga, granulocita te određenih subpopulacija limfocita u koštanoj srži, krvi te slezeni. Kao i u miševa *CD11c-Cre Fas<sup>fl/fl</sup>* u tom soju nedostaje nakupljanje dvostruko negativnih limfocita T (208, 210).

Osim najranije i najpodrobnije opisane i uloge u posredovanju AICD, poznato je da je FasL izražen i na citotoksičnim limfocitima T i stanicama NK te je važan posrednik uklanjanja zaraženih i malignih stanica (211-213).

Osim AICD te izvršne uloge limfocita T i stanica NK, u okviru imunskog sustava i upalnih zbivanja opisani su i brojni drugi učinci aktivacije receptora Fas. Primjerice, aktivacija receptora Fas uzrokuje apoptozu MDSC te se pretpostavlja da sustav Fas/FasL nadzire njihov životni vijek (214). Stanice koštane srži u miševa bez funkcionalnog receptora Fas imaju pojačanu sposobnost stvaranja granulocitno-makrofagnih kolonija *in vitro*, što upućuje na ulogu sustava Fas/FasL u regulaciji sazrijevanja mijeloidnih progenitora (215, 216). Zbog izražaja FasL u imunsko odijeljenim tkivima, pretpostavljalo se da će njegov pojačan izražaj spriječiti odbacivanje presatka. Istraživanja provedena na mišjim  $\beta$  stanicama gušterače i srčanom presatku s pojačanim izražajem FasL odbacila su tu teoriju jer su presatci vrlo brzo odbačeni, a reakcija je bila karakterizirana masivnom infiltracijom neutrofila, što je uputilo na moguće kemotaktičko djelovanje FasL (217, 218). Prema nekim istraživanjima, za kemotaksiju neutrofila odgovoran je sFasL (219, 220), dok drugi radovi opisuju izražaj citokina poput IL-8 potaknut aktivacijom receptora Fas (221). Opisano je, da Fas u mijeloidnim stanicama aktivacijom signalnoga puta Syk-Btk/PLC $\gamma$ 2/Rap1 aktivira integrine i potiče njihovu adheziju za vaskularni endotel (222). Na različitim tipovima stanica pokazano je da ligacija receptora Fas može rezultirati proizvodnjom proupalnih citokina poput prije spomenutog IL-8 (221, 223) i IL-1 $\beta$  (224-226), MCP-1 (227), IL-18 (225), TNF- $\alpha$  (224) te IL-6 (228). Također je pokazano da aktivacija sustava Fas/FasL potiče sazrijevanje dendritičkih stanica, pojačava njihov izražaj MHC II te kostimulacijskih molekula i lučenje IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  (224). U zrelim dendritičkim stanicama, aktivacija receptora za prepoznavanje obrazaca (PRR, prema engl. *pattern recognition receptors*) potiče izražaj receptora Fas i njihovo uklanjanje (224). Osim poticanja stanica prirodene imunosti putem stimulacije lučenja citokina i kemotaktičnih čimbenika stanica, sustav Fas/FasL također sudjeluje u aktivaciji i poticanju proliferacije limfocita T. Istovremena ligacija receptora Fas uz aktivaciju TCR može u limfocitima T služiti kao kostimulacijski signal te pojačati njihovu proliferaciju (229). Pokazano je da FasL potiče preživljavanje ljudskih krvotvornih prethodničkih CD34<sup>+</sup> stanica (230).

### 1.4.3.2. Koštani sustav

S obzirom fizičku bliskost, funkcionalnu povezanost i brojne zajedničke prethodnike i molekularne posrednike imunskog i koštanog sustava, uloga sustava Fas/FasL opisana je i u regulaciji homeostaze koštanog sustava. Fas je izražen na stanicama osteoblastne loze (231-235), mezenhimalnim stanicama ljudske pupčane vrpce (236), te na stromalnim linijama podrijetlom iz koštane srži (232, 237). Izražaj receptora Fas u mišjim osteoblastima mogu dodatno potaknuti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  te interferon (IFN)- $\gamma$  (233).

U literaturi postoje različiti podaci o izražaju receptora Fas na stanicama osteoklastne loze, varirajući od visokog izražaja koji je pod nadzorom liganda RANKL (238), do niske razine ili odsutnosti receptora Fas (231, 239, 240). Izvor FasL prema nekim radovima mogu biti same koštane stanice, osteoblasti (241, 242) ili osteoklasti (239, 243), ali i stanice koštane srži, poput aktiviranih limfocita T i B, stanica NK, monocita te makrofaga, koje također mogu uzrokovati aktivaciju Fas signalnih puteva u koštanim stanicama (244). Aktivacija receptora Fas na osteoklastima ili osteoblastima može uzrokovati apoptozu jedne i druge stanične populacije ili djelovati na njihovu diferencijaciju (231, 245, 246). Različiti učinci mogu se objasniti utjecajem drugih okolnih čimbenika na izražaj i funkciju receptora Fas. Primjerice TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  te IFN- $\gamma$  pojačavaju izražaj receptora Fas i osjetljivost mišjih osteoblasta na apoptozu potaknutu protutijelom anti-Fas (233, 245). 1,25-dehidroksi vitamina D3 (1,25(OH) $_2$ D3) smanjuje apoptozu ljudskih osteoblasta potaknutu protutijelom anti-Fas djelovanjem na unutarstanične signalne puteve nizvodno od receptora Fas (247), a estradiol smanjuje izražaj receptora Fas na mišjim osteoblastima (248).

Izražaj receptora Fas ovisi i o razvojnem stadiju osteoklasta (242) ili djelovanju čimbenika iz okoline. IFN- $\gamma$  *in vitro* može zakočiti osteoklastogenezu posredovanu TNF- $\alpha$  te potaknuti apoptozu osteoklasta posredovanu receptorom Fas (249). Estrogen potiče izražaj FasL na osteoblastima i apoptozu osteoklasta (241) iako na nju izravno ne djeluje (248). Osim toga, estrogen povećava izražaj enzima MMP-3, koji cijepanjem membranskog FasL stvara sFasL s apoptotičkim učinkom na osteoklaste (250).

Rezultati provedeni na mišjim modelima s nedostatnostima sustava Fas/FasL potvrdili su ulogu ovoga sustava Fas/FasL u nadzoru nad koštanom homeostazom, a ravnoteža je u tim modelima pomaknuta na stranu izgradnje. Primjerice, miševi *gld* imaju veću mineralnu gustoću kosti, zaštićeni su od gubitka kosti posredovanog nedostatkom estrogena, a u modelu membranskog okoštavanja potaknutom ablacijom koštane srži pokazuju pojačanu osteogenezu (251). Ove promjene nisu posljedica samo smanjenje apoptoze osteoklasta nego

smanjenja omjera RANKL-a i osteoprotegerina (OPG). Nadalje, miševi *gld* usprkos zaostajanju rasta mandibule tijekom razvoja, u postnatalnom periodu imaju povećan mandibularni koštani volumen (252). U modelima endohondralnog okoštavanja potaknutog koštanom oblikotvornom bjelančevinom (BMP, prema engl. *bone morphogenetic protein*) 2, *lpr* i *gld* miševi stvaraju veću količinu kosti, mezenhimalnog tkiva i hrskavice (253, 254). Pri cijeljenju fraktura, nedostatak funkcionalnog receptora Fas u miševa *lpr* produljuje vrijeme potrebno za resorpciju hrskavice (255). Koštani fenotip miševa *gld* je dominantan, jer nakon parabiotkog spajanja s miševima divljega tipa, potonji razvijaju koštani fenotip miševa *gld* karakteriziran smanjenom osteoklastogenezom i povećanom osteoblastogenezom *in vitro* (256). Osim miševa *gld*, i miševi bez funkcionalnog receptora Fas također zaštićeni su od gubitka kosti posredovanog nedostatkom estrogena (248), a izražaj sustava Fas/FasL u postmenopauzalnoj osteoporozi potvrđen je i na ljudskim osteoblastima (257). Postoje i studije koje su opisale povećan broj osteoklasta *in vivo* i smanjenu mineralnu gustoću kostiju u miševa *lpr*, odnosno *gld* (238), odnosno pogoršanje gubitka kosti izazvanog deplecijom estrogena u miševima sa specifičnom inaktivacijom gena FasL u osteoblastima, zbog nemogućnosti njihovog poticanja apoptoze osteoklasta (242). Suprotni rezultati različitih studija mogu se dijelom objasniti razlikama u spolu i dobi pokusnih životinja, koja uvjetuje različitu aktivnost koštanih stanica, odnosno specifičnostima staničnih populacija koštanog sustava u različitim razvojnim stadijima te utjecajem ostalih čimbenika iz mikrookoliša na izražaj sastavnica sustava Fas/FasL te dominantnom signalnom putu koji potakne ligacija receptora Fas.

#### 1.4.3.3. Ostala tkiva

Receptor Fas je, osim na stanicama imunskog te koštanog sustava, izražen i na brojnim drugim tipovima stanica, u kojima učinke posreduje apoptotičkim i neapoptotičkim signalnim putevima. Aktivacija receptora Fas potiče apoptozu hepatocita, te u miševa kojima je intraperitonealno primjenjeno agonističko anti-Fas protutijelo uzrokuje smrt zbog oštećenja jetre (258). Aktivacija receptora Fas u plućima uzrokuje apoptozu bronhiolarnog i alveolarnog epitela, a u slučaju prekomjerne stimulacije izaziva plućnu fibrozu (259). Također je pokazano da je apoptoza posredovana sustavom Fas/ligand Fas važna za uklanjanje keratinocita oštećenih ultraljubičastim zračenjem (260). Receptor Fas opisan je kao posrednik apoptoze motoričkih neurona u mišjem modelu amiotrofične lateralne skleroze (261). Uz brojne apoptotičke učinke, opširno su opisane i neapoptotičke posljedice aktivacije

receptora Fas. Primjerice, sustav sudjeluje u regeneraciji jetre nakon djelomične hepatektomije u miševima, a ovaj učinak nije ovisan o smrtonosnoj domeni (262). Također je opisano sudjelovanje receptora Fas u regeneraciji neurona, odnosno pospješeno oporavka ishijadičnog živca nakon ozljede davanjem agonističkog anti-Fas protutijela (263), i pojačano grananje neurona kao posljedica aktivacije receptora Fas *in vivo* (264). U određenim uvjetima Fas može stimulirati proliferaciju ljudskih fibroblasta (265-267), a pokazano je da vezanje FasL u njima aktivira signalni put ERK (180). Više istraživanja pokazalo je da Fas/FasL sustav potiče migraciju aktivaciju NF $\kappa$ B u tumorskim stanicama i njihovu pojačanu migraciju (268-270). Za brojne uloge sustava Fas/FasL zaslužna je široka tkivna rasprostranjenost receptora Fas, iz čega proizilazi da je sustav uključen u regulaciju velikog broja fizioloških i patoloških zbivanja.

#### **1.4.4. Uloga sustava Fas/ligand Fas u patogenezi bolesti**

Spontane mutacije koje pogađaju različite dijelove molekule receptora i liganda njihovih unutarstaničnih signalnih posrednika u ljudi uzrokuju rijetki autoimunosni limfoproliferacijski sindrom (ALPS, prema engl. *autoimmune lymphoproliferative syndrome*). Bolest karakterizira limfadenopatija, hepatosplenomegalija, nakupljanje dvostruko negativnih limfocita T te autoimuna trombocitopenija i anemija, a najčešće je posljedica točkaste mutacije u domeni DD receptora Fas (271). Sudjelovanje sustava Fas/FasL opisano je i u patogenezi nekoliko ljudskih bolesti, poput virusnog hepatitisa (272), toksične epidermolize (273), multiple skleroze (274), reakcije presatka protiv primaoca (GVHD, prema engl. *graft versus host disease*) (275), malignim tumorima te autoimunosnim bolestima poput tireoiditisa (276) i RA (277).

##### **1.4.4.1. Reumatoidni artritis**

Uloga sustava Fas/FasL istraživana je u patogenezi strukturnog oštećenja u RA i u zbivanjima vezanim uz razvoj i održavanje zglobe upale u RA. Zbog ranije opisane raširenosti receptora Fas djelovanje sustava Fas/FasL na tijek RA može biti ostvareno kroz njegovu aktivnost u bilo kojoj staničnoj populaciji uključenoj u patogenezu.

Sudjelovanje sustava Fas/FasL u patogenezi strukturnog oštećenja u RA može biti rezultat apoptoze koštanih ili hrskavičnih stanica. U mišjim modelima s nedostatnostima sustava

Fas/FasL potvrđena je uloga tog sustava u nadzoru nad koštano homeostazom, te je pokazano da njegova nedostatnost favorizira koštano izgradnju (248, 251-253). Naša istraživačka skupina je pokazala da miševi s izbačenim genom za receptor Fas razvijaju blaži oblik AIA, praćen boljim očuvanjem zglobnih koštano-hrskavičnih prethodnika, koji su osjetljivi na apoptozu posredovanu aktivacijom receptora Fas (141). Povećana apoptoza kondrocita potvrđena je u ljudskim zglobovima bolesnika s RA (278), a potvrđena je i sposobnost receptora Fas da potakne njihovu apoptozu (279).

Osim izravnog apoptotičkog djelovanja na koštane i hrskavične stanice, očekivano je djelovanje sustava Fas/FasL na zglobnu upalu. Nekoliko studija pokazalo je zaštitni učinak inaktivacije sustava Fas/FasL na razvoj artritisa. U mišjem modelu CIA pokazano je, da je u soju DBA/J1 usprkos održanom imunom odgovoru limfocita T i B na kolagen tipa II ublažen tijek eksperimentalnog artritisa (280). Razlog ublažavanja artritisa je poremećen proupalni odgovor makrofaga na aktivaciju receptora za IL-1 i receptora nalik Tollu (TLR, prema engl. *Toll-like receptor*)<sup>4</sup>, u uvjetima nedostatnosti receptora Fas, pri čemu zbog interakcija FADD i čimbenika sazrijevanja stanica mijeloidne loze 88 (MyD88, prema engl. *myeloid differentiation factor 88*) dovodi do smanjenja aktivacije signalnog puta NFκB u makrofazima (281). Proupalna uloga sustava Fas/FasL u mijeloidnoj lozi u artritisu dalje je potvrđena u K/BxN modelu, gdje mijeloidno-specifična inaktivacija receptora Fas skraćuje kroničnu fazu artritisa (282). Ublažavajući učinak nedostatka sustava Fas/FasL opisan je i u nekim drugim modelima autoimunih bolesti, poput autoimunog encefalomijelitisa (283) te dijabetesa tipa I (284). Navedeni učinci posljedica su interferencije s neapoptotičnim signalnim putevima koji posreduju proupalne učinke receptora Fas.

Suprotno tome, neka istraživanja upućuju na mogući zaštitni učinak aktivacije receptora Fas u artritisu, zbog pojačane apoptoze stanica imunskog sustava i sinovijalnih fibroblasta, aktivacijom vanjskog apoptotičnog puta u tim stanicama. Također, nedostatak sustava Fas/FasL može potaknuti autoimunost zbog narušene periferne tolerancije. Međutim, iako sinoviociti, sinovijalni makrofazi i limfociti T pojačano izražavaju receptor Fas i FasL, njihova je apoptoza u sinovijalnom odjeljku pacijenata s RA smanjena (285). Štoviše, izdvojene i uzgajane *in vitro*, ove su stanice jako osjetljive na apoptozu potaknutu receptorom Fas (285). Prisutnost brojnih anti-apoptotičkih faktora u sinovijalnom odjeljku, poput TGF-β, bazičnog čimbenika rasta fibroblasta (bFGF, prema engl. *basic fibroblast growth factor*), c-FLIP te MMP-3, koja otejepljuje membranski ligand Fas ključan za prijenos apoptotičkog signala (285), upućuje na anti-apoptotično djelovanje zglobnog mikrookoliša u RA.



Pokazano je da prijenos gena koji kodira FasL izravno u upaljeni zglob ili injekcijom dendritičkih stanica transfeciranih genom koji kodira FasL ublažava mišji model artritisa (286, 287).

Zbog tkivne rasprostranjenosti i složene regulacije aktivnosti i signalizacije receptora Fas, jasno definiranje njegove uloge u RA iznimno je teško, a specifični učinci u RA još uvijek nisu dovoljno razjašnjeni. Stoga je ključno istražiti specifičnosti sustava Fas/FasL u pojedinim staničnim populacijama uključenim u patogenezu RA, te precizno definirati lozno-specifične signalne puteve i molekularne posrednike uključene u prijenos signala, s ciljem otkrivanja novih pristupa za sprječavanje, ublažavanje i liječenje RA.

## **2. Hipoteza**

Resorptivni i neresorptivni artritis imaju različit stanični sastav sinovijalnog odjeljka i subhondralne koštane srži, pri čemu specifične stanične populacije posreduju koštano razaranje, a te su populacije karakterizirane izražajem gena koji su posrednici koštanog razaranja.

### **3. Ciljevi rada**

#### **3.1. Opći cilj**

Procijeniti udjele različitih staničnih populacija u sinovijalnom odjeljku i periartikularnoj koštanoj srži miševa s artritismom, te u populaciji čiji je udio jasno povezan s lokalnim koštanim razaranjem otkriti nove, ložno-specifične molekularne posrednike koštane resorpcije u artritisu.

#### **3.2. Specifični ciljevi**

1. Definirati fenotip staničnih populacija u sinovijalnom odjeljku i periartikularnoj koštanoj srži, promijenjenih u artritisu praćenom koštanim razaranjem (AIA u WT miševa) u odnosu na artritisa bez koštanog razaranja (AIA u miševa Fas  $-/-$ ).
2. Izdvojiti odabranu staničnu populaciju te usporedbom transkriptoma stanica izdvojenih iz miševa s koštanim razaranjem i bez koštanog razaranja, odrediti gene koji izravno doprinose koštanom oštećenju.
3. Potvrditi promjene u izražaju odabranih gena analizom izražaja pojedinačnih gena u populacijama izdvojenim iz sinovijalnog tkiva miševa s artritismom.
4. Potvrditi ulogu odabranog posrednika funkcijskim testovima *in vitro*.

## 4. Materijali i metode

Pokusi su napravljeni u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Mikro-kompjuterizirana tomografija napravljena je u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Centra za translacijska i klinička istraživanja. Genski čipovi su hibridizirani na Odjelu za funkcionalnu genomiku Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Western blot napravljen je u Laboratoriju za neurokemiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. RNA sekvencioniranje je napravljeno u Laboratoriju za naprednu genomiku na Institutu Ruđer Bošković.

### 4.1. Ustroj pokusa

Istraživanje je provedeno na modelu AIA, mišjem modelu reumatoidnog artritisa. Za izazivanje artritisa korištene su ženke miševa divljeg tipa (WT, prema engl. *wild-type*) visokosrođenog soja C57BL/6, te miševa Fas  $-/-$  istog temeljnog soja. Miševi su imunizirani s dvije doze antigena mBSA u CFA injicirane potkožno u razmaku od tjedan dana. Tri tjedna nakon imunizacije, i.a. je injiciran mBSA u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) ili samo PBS, ovisno o tome radi li se o kontrolnoj skupini ili skupini miševa s artritidom. U kasnijim fazama istraživanja korištena je i skupina neimuniziranih (NI) miševa, koji su u svim točkama injicirani puferom PBS. Miševi su žrtvovani 10. dan, a iznimno u nekim pokusima, 3. ili 7. dan poslije izazivanja artritisa, a procijenjeni su intenzitet artritisa i lokalnog gubitka kosti te su uzeti uzorci za analizu. Intenzitet artritisa procijenjen je makroskopski pri žrtvovanju, potom je kaliperom izmjeren promjer koljena. Koljeni zglobovi su potom uzeti za histološku procjenu artritisa i procjenu lokalnog gubitka kosti histomorfometrijom i/ili mikro-kompjutoriziranom tomografijom ( $\mu$ -CT).

Istraživanje je provedeno kroz četiri skupine pokusa, u skladu sa specifičnim ciljevima:

1. Fenotipska analiza staničnih populacija u sinoviji i periartikularnoj koštanoj srži miševa WT i Fas  $-/-$  s AIA i kontrolnih imuniziranih miševa.
2. Izdvajanje i analiza transkriptoma sinovijalne mijeloidne populacije miševa WT i Fas  $-/-$  s AIA i kontrolnih imuniziranih miševa.

3. Potvrda razlika u genskom izražaju (*Mid1*, *Erdrl* i *Thbs1*) postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR, prema engl. quantitative polymerase chain reaction).
4. Funkcionalna potvrda uloge *Mid1* u razvoju artritisa i lokalnog gubitka kosti.

U prvoj fazi istraživanja protočnom citometrijom su analizirani udjeli glavnih staničnih populacija u zglobnom odjeljku i periartikularnoj koštanoj srži miševa WT, u kojih se razvija tipičan resorptivni oblik AIA i uspoređeni s njihovim udjelima u neresorptivnom AIA miševa Fas  $-/-$ . Također je procjena povezanost udjela pojedinih populacija s intenzitetom artritisa te volumenom subkondralnih koštanih gredica.

Pokusi su u ovoj fazi provedeni na četiri pokusne skupine:

- skupina miševa WT imuniziranih s mBSA, injiciranih i.a. s mBSA (WT AIA),
- skupina miševa WT imuniziranih s mBSA, injiciranih i.a. s puferom PBS (WT ctrl),
- skupina miševa Fas  $-/-$  imuniziranih sa mBSA, injiciranih i.a. s mBSA (Fas AIA) te
- skupina miševa Fas  $-/-$  imuniziranih sa mBSA i injiciranih i.a. s puferom PBS (Fas ctrl).

Miševi su žrtvovani 10. dan poslije i.a. injekcije te je prvo izmjeren promjer koljena, a potom uzet jedan koljeni zglob za histološku i histomorfometrijsku procjenu artritisa te  $\mu$ -CT, a drugi zglob za protočno-citometrijsku analizu, s ciljem da se dobiju podaci o oštećenju subhondralne kosti i udjelima staničnih populacija u iste životinje. Na temelju rezultata ove faze istraživanja, za analizu genskog izražaja odabrana je zglobna mijeloidna populacija CD11<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>, čiji je udio bio najizrazitije promijenjen, a porast udjela u artritisu značajno povezan s gubitkom subhondralne kosti.

U drugoj fazi istraživanja populacija zglobnih mijeloidnih stanica CD11<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> izdvojena je razvrstavanjem aktiviranom fluorescencijom (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*), i to iz pojedinačnih miševa u sve četiri pokusne skupine navedene u opisu prve faze istraživanja. Miševi su žrtvovani 10. dan poslije i.a. injekcije, izmjereni su promjeri koljena te uzeta oba koljena zgloba za izdvajanje stanica. Dva dana prije žrtvovanja miševi su snimljeni uređajem  $\mu$ -CT *in vivo*, sa svrhom procjene stanja subhondralne kosti u zglobovima koji će se kasnije koristiti za izdvajanje stanica. Iz izdvojenih populacija potom je izolirana ukupna stanična RNA, a po 4 pojedinačna uzorka zadovoljavajuće kvalitete iz svake pokusne skupine korištena su za analizu transkriptoma korištenjem genskih čipova Mouse ST 2.0 Array (ThermoFisher, Waltham, MA, SAD). Također je u ovoj fazi postupkom sekvencioniranja sljedeće generacije (prema engl. *next generation sequencing*) analiziran

transkriptom populacija potencijalnih koštano-hrskavičnih prethodnika (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> i CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>), u miševa WT s artritismom, s ciljem potvrde njihovog identiteta temeljem transkripcijskog profila te utvrdilo mijenjaju li se najraniji koštani prethodnici u artritisu.

U početnim fazama istraživanja su kao kontrola korišteni imunizirani miševi (ctrl), jer je primarni cilj istraživanja bio utvrditi posrednike koji uvjetuju razvoj autoimunosno-posredovanog zglobnog oštećenja. Međutim, po završetku analize transkriptoma izdvojenih mijeloidnih stanica utvrdili smo podudarnost transkriptoma mijeloidnih stanica miševa ctrl i AIA skupina te da već i sama imunizacija potiče aktivaciju i nakupljanje stanica mijeloidne loze u zglobovima, koje izostaju u miševa Fas <sup>-/-</sup>. Stoga smo se u postupku potvrde promjena u genskom izražaju te funkcionalnim studijama (treća i četvrta faza istraživanja) usmjerili na promjene mijeloidne loze potaknute imunizacijom te smo kao kontrolnu skupinu koristili neimunizirane miševe (NI).

U trećoj fazi istraživanja potvrđene su razlike u izražaju odabranih gena *Mid1*, *Erdr1* i *Thbs1* postupkom qPCR u izdvojenim sinovijalnim mijeloidnim stanicama pojedinačnih miševa, u uzorcima združenih izdvojenih mijeloidnih stanica miševa iste skupine te u tkivnim ekstraktima koljena. Razlike u izražaju *Mid1* ispitane su i na razini bjelančevine. S obzirom na rezultate nekoliko studija koje potvrđuju važnu ulogu *Mid1* u posredovanju alergijske upale dišnih puteva i eksperimentalnog eozinofilnog ezofagitisa (288, 289), u nastavku istraživanja usmjerili smo se na *Mid1* i njegovu ulogu u posredovanju lokalnog upalnog oštećenja u AIA. Odredili smo vremenski obrazac izražaja *Mid1* tijekom AIA, te procijenili povezanost izražaja gena *Mid1* u koljenom zglobu s izražajem proupalnih citokina te intenzitetom artritisa. Budući da se gen *Mid1* nalazi na X kromosomu, spolni dimorfizam isključili smo u setu pokusa na mužjacima.

U četvrtoj fazi istražili smo ulogu *Mid1* u razvoju artritisa te lokalne koštane resorpcije *in vivo*, te u upalnoj aktivaciji mijeloidnih stanica *in vitro*. S obzirom na dosadašnja istraživanja vezana uz izražaj *Mid1* u upalnim bolestima te činjenicu da se izražaj *Mid1* gena u koljenu pojačava neposredno nakon indukcije artritisa, očekivali smo da će inhibicija *Mid1* dovesti do ublažavanja artritisa. U ovoj fazi istraživanja, korišteni su miševi WT. Za inhibiciju *Mid1* *in vivo* na razini mRNA odabrali smo malu interferirajuću RNA (siRNA, prema engl. *small interfering RNA*), koju smo primijenili neposredno nakon indukcije artritisa, putem i.a. injekcije i sustavno, putem intravenske (i.v.) injekcije. Na razini bjelančevine, aktivnost *Mid1* smo blokirali *in vivo* peroralnom primjenom metformina tijekom cijelog indukcijskog

protokola. Metformin priječi ubikvitinilaciju i proteasomsku razgradnju protu-upalne proteinske fosfataze 2A (PP2A, prema engl. *protein phosphatase 2A*), koja je posredovana vezivanjem Mid1 (290). U pokusima *in vitro* uz metformin smo primijenili i peptid GSK'364A, koji kompetitivno priječi vezanje Mid1 za PP2A kompleks (291). Da bi utvrdili ulogu PP2A u poticanju upale posredovane Mid1, u pokusima *in vitro* primijenjen je i inhibitor aktivnosti PP2A, LB-100.

## 4.2. Pokusne životinje

U istraživanju su korištene ženke miševa visokosrođenog soja C57BL/6 (WT), te miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ) (200) temeljnog soja C57BL/6, u dobi od 12 tjedana. Miševi Fas  $-/-$  poklon su laboratorija dr. Markusa M. Simona (Max Planck Institute for Immunobiology, Freiburg, Njemačka). Pokusne životinje su uzgojene u nastambi Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme istraživanja, miševi su držani u standardnim laboratorijskim uvjetima, po 3-6 životinja u kavezu, uz režim 14 sati svjetla i 10 sati tame dnevno, temperaturu prostorije 23 °C, vlažnost zraka 50- 60% te standardu prehranu (4RR25; Mucedola, Settimo Milanese, Italija) i vodu ad libitum. Istraživanje je vođeno načelima “3R” (prema engl. *reduction, replacement, refinement*). Pokusi su predviđeni radnim planom istraživačkog projekta HRZZ 7406 za koji je izdana dopusnica Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te odobrenje Ministarstva poljoprivrede RH (UP/I-322-02/15-01/155).

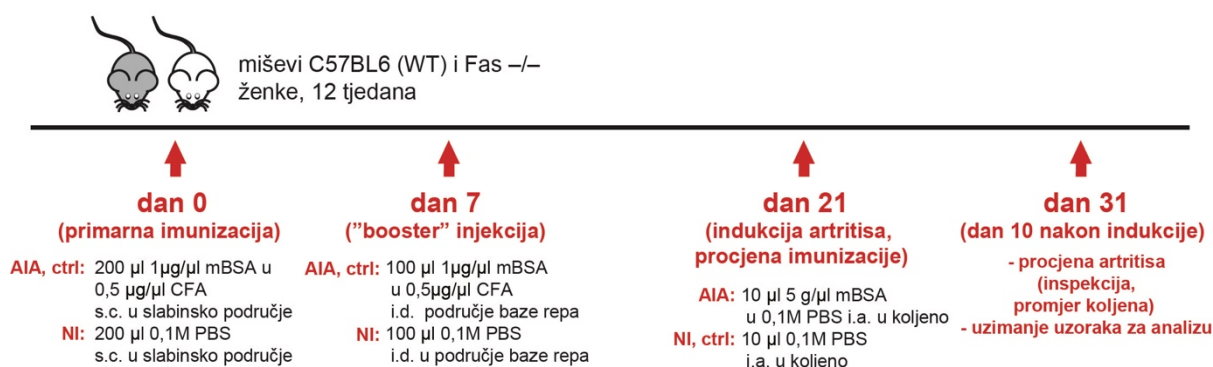
Ukupan broj životinja za svaki pojedinačni pokus izračunat je prema snazi studije (80%) te odabranoj razini statističke značajnosti, na temelju prethodnih pokusa u našem laboratoriju, koristeći program G\*power (292). Svaki set pokusa ponovljen je najmanje tri puta. Za anesteziju je tijekom imunizacijskog postupka, i.a. injekcija te prilikom *in vivo* snimanja  $\mu$ -CT primijenjen tribromoetanol (2,2,2-Tribromoethanol, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) injiciran intraperitonealno u dozi 0,25 mg/g ili inhalacijska anestezija 2% izofluranom (Forane, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, SAD) u slučaju više uzastopnih i.a. injekcija tijekom primjene siRNA. Analgetik buprenorfin bio je primijenjen intraperitonealno, u dozi 0,05 mg/kg u slučaju pojave simptoma boli u tijeku artritisa. Eutanazija je u pokusnim životinjama izvođena cervikalnom dislokacijom.

### 4.3. Artritis potaknut antigenom

Artritis potaknut antigenom izazvan je i.a. injekcijom mBSA nakon prethodne imunizacije miševa na taj antigen (Slika 1). Imunizacija je provedena s dvije doze mBSA koncentracije 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Sigma-Aldrich) emulgiranom u CFA koncentracije 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Sigma-Aldrich) u razmaku od tjedan dana. Da bi se postigla konačna koncentracija 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  mBSA, pripremljena je otopina koncentracije 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  u 0,1M puferu PBS, otapajući 10 mg mBSA u 4,5 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , uz naknadno dodavanje 0,5 ml 1M pufera PBS, budući da mBSA nije topljiv u fiziološkoj otopini. Ova otopina uvučena je u štrcaljku volumena 5mL, kroz koju je snažno potisnuta u jednaki volumen otopine CFA koncentracije 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Mješavina je više puta proštrcana kroz iglu i vorteksirana, dok nije dobivena homogena emulzija bijele boje. Emulzija je pohranjena na 2-8 °C, i korištena unutar 7 dana od pripreme. Za primarnu imunizaciju životinjama je potkožno injicirano po 100  $\mu\text{l}$  emulzije obostrano u slabinsko područje. Zbog gustoće je emulzija mBSA u CFA polako navučena u štrcaljku volumena 1 ml kroz iglu šireg promjera (18G), koja je nakon toga zamijenjena tanjom iglom (27G) za injiciranje životinja. Miševi su prije injiciranja anestetizirani 2,5% tribromoetanolom, a područje injekcije je dezinficirano 70% etanolom. Druga doza emulzije (*booster*), ukupno 100  $\mu\text{l}$  mBSA u CFA, injicirana je 7 dana poslije primarne imunizacije, intradermalno u bazu repa. Za ovaj korak nije primijenjena anestezija jer je postupak izveden na miševima u napravi za obuzdavanje (engl. *restrainer*, Plas-Labs Inc, Lansing, MI, SAD, model 553-BSRR). Područje baze repa je prije injekcije dezinficirano 70% etanolom. Kontrolna skupina miševa (ctrl) imunizirana je na jednak način kao i miševi s artritismom, a skupini neimuniziranih miševa (NI) je u oba navrata istovjetno injiciran 0,1M PBS. Uspješnost imunizacije po potrebi je provjerena 18. dan nakon primarne imunizacije injekcijom 5  $\mu\text{l}$  mBSA u 0,1M pufera PBS u lijevu ušku. Kontrolnoj skupini injicirano je 5  $\mu\text{l}$  0,1 M pufera PBS u desnu ušku. Područje injicirano mBSA otopinom pregledavano je svakih 12 sati kroz slijedeća dva dana i bilježilo se pojavljivanje otoka i crvenila uške. Tri tjedna poslije primarne imunizacije skupini miševa s artritismom injicirano je 10  $\mu\text{l}$  otopine mBSA koncentracije 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  u 0,1M puferu PBS, a kontrolnoj skupini i skupini neimuniziranih miševa injicirano je 10  $\mu\text{l}$  0,1M pufera PBS u oba koljena. Otopina je pripremljena otapanjem 5 mg mBSA u 0,9 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , uz naknadno dodavanje 0,1 ml 1M pufera PBS. Miševi su tijekom i.a. injekcija anestetizirani 2,5% tribromoethanolom. Nakon dezinfekcije područja koljena, škaričama ili skalpelom je učinjen mali rez (<2mm) kojim je prikazana patelarna tetiva. Za precizno injiciranje 10  $\mu\text{l}$  otopine korištene su štrcaljke Hamilton (Sigma-Aldrich),



čija igla je postavljena u zglobovu šupljinu lateralno ili medijalno od patelarne tetive te nakon injiciranja pažljivo i polako izvučena. Kožna incizija je po potrebi zatvorena šavom.



**Slika 1. Shematski prikaz postupka izazivanja artritisa potaknutog antigenom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) u miševa divljeg tipa (WT) i miševa bez funkcionalnog receptora Fas (Fas -/-).** AIA je izazvan intra-artikularnom (i.a) injekcijom metilirane goveđe serumske bjelančevine (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*), nakon prethodne imunizacije s dvije doze mBSA u potpunom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*) u razmaku od tjedan dana. Primarna imunizacija je provedena potkožnom injekcijom (s.c.) 100 µl emulzije mBSA koncentracije 1 µg/µl u CFA koncentracije 0,5 µg/µl obostrano u slabinsko područje životinjama s artritism (AIA) i kontrolnim imuniziranim (ctrl) životinjama. Sedam dana poslije primarne imunizacije (7. dan), u „booster“ dozi injicirano je 100 µl emulzije mBSA koncentracije 1 µg/µl u CFA koncentracije 0,5 µg/µl intradermalno (i.d.) u bazu repa. Neimunizirane (NI) životinje su u oba navrata primile 0,1M otopinu fosfatnog pufera (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) istog volumena. Artritis je izazvan 21. dan, pri čemu je skupini miševa s artritism injicirano 10 µl otopine mBSA koncentracije 5 µg/µl u 0,1M puferu PBS, a kontrolnoj skupini i skupini neimuniziranih miševa 10 µl 0,1M pufera PBS u oba koljena. Miševi su žrtvovani 31. dan nakon primarne imunizacije (10. dan nakon izazivanja artritisa) pri čemu je procijenjen intenzitet artritisa i uzeti uzorci za analizu.

#### 4.4. Kliničko i histološko praćenje artritisa

Pokusne životinje žrtvovane su 10. dan poslije i.a. injekcije, odnosno 31. dan poslije primarne imunizacije. Nakon odizanja kože inspekcijom je procijenjen intenzitet zglobne upale te izmjeren promjer koljena kaliperom. Mjerenje je za svaki zglob ponovljeno tri puta, a za analizu je korištena srednja vrijednost. Procjena artritisa inspekcijom provedena je prema sljedećem sustavu bodovanja: 0, nema upale; 1, blago lokalizirano zamućenje zglobne ovojnice; 2, blaža oteklina zgloba, gubitak konture patelarnog ligamenta; 3, jasna oteklina, difuzno zamućenje zglobne ovojnice, 4, jaka oteklina zgloba s deformacijom vidljivom kroz krzno. Histološka procjena artritisa provedena je na frontalnim rezovima koljena. Koljeni zglobovi su izolirani presijecanjem kroz sredinu femoralne i tibijalne dijafize, očišćeni od mekih tkiva te fiksirani u otopini 4% paraformaldehida u puferu PBS 24 sata na 4 °C, a potom demineralizirani u otopini 14% etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA, prema engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) i 3% paraformaldehida tijekom 7 do 14 dana. Potom su dehidrirani rastućim koncentracijama etanola te uklopljeni u parafinske blokove. Serijski

rezovi debljine 6  $\mu\text{m}$  pripremljeni su pomoću rotacijskog mikrotoma (Leica SM 2000 R, Leica, Nussloch, Njemačka) i potom obojeni postupkom Goldner Masson trikrom za histološku procjenu artritisa i histomorfometriju te toluidinskim plavilom za procjenu stanja zglobne hrskavice. Histološka analiza provedena je pomoću mikroskopa Axio Imager (Carl Zeiss Microimaging Inc., AG, Oberkochen, Njemačka) priključenog na računalo. Prema ljestvici od 0-3 boda (Tablica 1) (293) procijenjena su četiri parametra: celularnost sinovije (upalni infiltrat) (294), eksudat u zglobnom prostoru, oštećenje zglobne hrskavice te invazija sukondralne kosti panusom, pri čemu maksimalni broj bodova iznosi 12.

**Tablica 1. Ljestvica bodovanja pri histološkoj procjeni intenziteta artritisa.**

Celularnost sinovije*	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 – normalna sinovija</li> <li>1 – blagi upalni infiltrat, sinovijalna ovojnica se sastoji od 2-4 reda stanica</li> <li>2 – umjereni upalni infiltrat, sinovijalna ovojnica se sastoji od 5-9 redova stanica</li> <li>3 – zadebljana hipercelularna sinovija, ovojnica se sastoji od više od 10 redova stanica, vidljivo je stvaranje panusa</li> </ul>
Eksudat u zglobnom prostoru*	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 – nema stanica</li> <li>1 – nekoliko stanica u zglobnom prostoru</li> <li>2 – rijetke stanične nakupine</li> <li>3 – brojne stanične nakupine/mnoštvo stanica u zglobnom prostoru</li> </ul>
Razaranje zglobne hrskavice**	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 – normalno bojanje</li> <li>1 – 50-100% obojenja</li> <li>2 – manje od 50% obojenja</li> <li>3 – potpuni izostanak bojanja</li> </ul>
Invazija panusa u subhondralnu kost*	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 – bez invazije</li> <li>1 – invazija panusa u kortikalnu kost, u koju ne prodire</li> <li>2 – panus prodire kroz kortikalnu kost</li> <li>3 – panus prodire kroz kortikalnu kost i narušava arhitekturu podležće trabekularne kosti i koštane srži ili panus na više mjesta prodire kroz kortikalnu kost</li> </ul>

\*procijenjeno na rezovima obojenim Goldner-Mason-trikrom

\*\*procijenjeno na rezovima obojenim toluidinskim plavilom

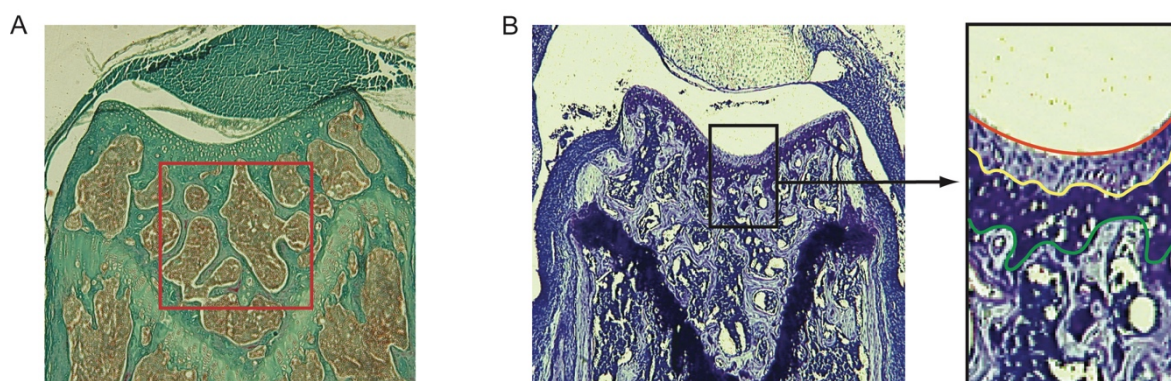
#### 4.5. Mikro-kompjutorizirana tomografija

Stanje subhondralne kosti procijenjeno je mjerenjem koštanih gredica distalnih femoralnih epifiza. Koljeni zglobovi izolirani su 10. dan poslije i.a. injekcije na isti način kao što je opisano za histološku analizu, fiksirani kroz 24 sata u 4% paraformaldehidu na 4°C. Potom su pohranjeni u 70% etanol do snimanja pomoću  $\mu$ -CT. Koljena su snimljena pomoću uređaja SkyScan 1076 (Bruker, Kontich, Belgija) *ex vivo* na svakih 0.4°, te *in vivo*, na svakih 1.2° rotacije izvora, uz rezoluciju 9  $\mu$ m, i aluminijski filter debljine 0.5 mm, napon 50 kV te jakost struje 200  $\mu$ A. Pri snimanju *in vivo*, miševi su anestetizirani 2,5% tribromoetanolom (Avertin, Sigma). Snimke su rekonstruirane pomoću programa NRecon (Bruker) te analizirane pomoću programa CTAn (Bruker), a trodimenzionalne rekonstrukcije napravljene u programu CTVox (Bruker). Područje interesa (ROI, prema engl. *region of interest*) u epifizama je definirano kao odsječak duljine 300  $\mu$ m, između epifizne crte i razine razdvajanja femoralnih kondila na transverzalnim presjecima kroz kost. U ROI su određeni udio volumena koštanih gredica (BV/TV, prema engl. *bone volume/total volume*, %) te broj (Tb.N, prema engl. *trabecular number*, /mm), debljina (Tb.Th, prema engl. *trabecular thickness*, mm) i razdvojenost (Tb.Sp, prema engl. *trabecular separation*, mm) koštanih gredica.

#### 4.6. Histomorfometrija

Koljeni zglobovi su prvo snimljeni pomoću uređaja  $\mu$ -CT, a potom demineralizirani i pripremljeni kako je opisano u postupku histološke procjene artritisa. Za analizu je korišten mikroskop Axio Imager (Carl Zeiss Microimaging Inc.) opremljen video kamerom spojenom na računalo s programom OsteoMeasure (OsteoMetrics, Decatur, GA, SAD) namijenjenom kvantifikaciji koštanog tkiva. ROI je u femoralnim epifizama definirano kao vidno polje dimenzija 500x500  $\mu$ m smješteno u sredini frontalnog presjeka kroz epifizu, a gredice su mjerene pri povećanju 100x, na četiri presjeka iz različitih dubina preparata (Slika 2A). Na preparatima obojenim postupkom Goldner Masson trikrom mjereni su udio volumena (BV/TV, %), broj (Tb.N, /mm), debljina (Tb.Th, mm) i razdvojenost (Tb.Sp, mm) koštanih gredica. Oštećenje hrskavice mjereno je na preparatima obojenim toluidinskim plavilom, koji zdravu hrskavicu boji intenzivno plavo, a oštećena hrskavica je, zbog gubitka proteoglikana i glikozaminoglikana, slabo obojena ili neobojena. Mjereni su ukupna debljina hrskavice te debljina zdrave hrskavice, a rezultat je izražen kao udio zdrave hrskavice u ukupnoj debljini

(Slika 2B). Izmjerena je ukupna duljina femoralne zglobne hrskavice pri povećanju 200X, na četiri frontalna presjeka iz različitih dubina koljenog zgloba.



**Slika 2. Histomorfometrija.** (A) Preparati obojeni postupkom Goldner Masson trikom korišteni su za kvantitativnu procjenu subkondralne kosti. Pri povećanju 100X u distalnim femoralnim epifizama izmjereni su udio volumena (BV/TV, prema engl. bone volume/total volume, %), broj (Tb.N, prema engl. trabecular number, /mm), debljina (Tb.Th, prema engl. trabecular thickness, mm) i razdvojenost (Tb.Sp, prema engl. trabecular separation, mm) koštanih gredica. Područje interesa definirano je kao vidno polje dimenzija 500x500  $\mu\text{m}$ , smješteno u sredini frontalnog presjeka kroz femoralnu epifiznu pri povećanju 100x (crveni kvadrat). (B) Na preparatima obojenim toluidinskim plavilom pri povećanju 200X izmjerena je ukupna debljina hrskavice, debljina zdrave hrskavice (obojena tamno plavo; područje između žute i zelene crte) te debljina oštećene hrskavice (obojena svjetlije plavo; područje između crvene i žute crte) na cijeloj duljini femoralne zglobne hrskavice. Rezultat mjerenja izražen je kao udio zdrave hrskavice u ukupnoj debljini.

#### 4.7. Protočna citometrija

Protočnom citometrijom su u prvoj fazi istraživanja procijenjeni udjeli limfoidnih, mijeloidnih te mezenhimalnih staničnih populacija u zglobnom odjeljku i periartikularnoj koštanoj srži miševa Fas  $-/-$  i WT s artritismom i kontrolnih miševa, a u četvrtoj fazi istraživanja udjeli limfoidnih i mijeloidnih populacija u miševa podvrgnutih terapiji metforminom. Jednostanična suspenzija stanica periartikularne koštane srži pripremljena je nakon žrtvovanja i izolacije koljenih zglobova, ispuhivanjem medularnih šupljina distalnih femoralnih i tibijalnih metafiza puferom PBS, pomoću igle provrta 23G, protiskivanjem nekoliko puta kroz iglu i potom propuštanjem kroz najlonsku mrežicu promjera okana 70  $\mu\text{m}$ . Eritrociti su uklonjeni dodavanjem pufera za lizu eritrocita (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; pH=7,4) tijekom 5 minuta, nakon čega je osmotska reakcija zaustavljena dodavanjem deseterostrukog volumena pufera PBS. Za pripremu suspenzije stanica zglobnog odjeljka, tibia i femur prerezani su skalpelom kroz epifizne hrskavice te su pažljivo odstranjeni mišići oko koljena, pri tom pazeći da se ne ozlijedi zglobna ovojnica. Periartikularna koštana srž iz epifiza potom je isprana puferom PBS te je pomoću igle provrta 30G u zglobnu šupljinu pažljivo uštrcana otopina kolagenaze tipa IV (Collagenase From

*Clostridium Histolyticum*, Type IV, Sigma-Aldrich) koncentracije 1 mg/ml i koljena su inkubirana sat vremena na 37 °C. Potom je meko zglobno tkivo odstranjeno i usitnjeno, te je uzastopnim protiskivanjem kroz iglu provrta 23G i propuštanjem kroz najlonsku mrežicu promjera okna 70 µm dobivena jednostanična suspenzija. Broj stanica u suspenzijama periartikularne koštane srži i zglobnog odjeljka određen je brojenjem živih stanica u Bürker-Türkovoj komorici. Mrtve stanice isključene su bojenjem suspenzije 0,05 % tripanskim modrilom koje prolazi kroz oštećenu staničnu membranu i stoga obilježava mrtve stanice. Po 10<sup>6</sup> stanica je poslije blokiranja nespecifičnog vezanja pomoću 0,5 µl anti-mišjeg protutijela CD16/CD32 tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi, obilježeno protutijelima konjugiranim fluorescentnim bojama usmjerenim na biljege limfoidnih (CD3, B220), mijeloidnih (CD11b, Gr-1, F4/80) te mezenhimalnih populacija (CD44, CD51, CD105, CD200, Sca-1, CD90.2, CD140b). Kombinacije protutijela korištenih za obilježavanje pojedinačnih uzoraka su prikazane u Tablici 2, a detaljni podatci o pojedinačnim protutijelima u Tablici 3. Obilježavanje je provedeno tijekom 30 minuta u tami, pri temperaturi 2-8 °C. Potom je suvišak protutijela uklonjen ispiranjem puferom PBS s dodatkom 2% fetalnog govedeg seruma (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*), a uzorcima obilježenim protutijelima koja su vezana na biotin dodan je streptavidin konjugiran s fluorescentnom bojom te su suspenzije inkubirane dodatnih 25 minuta u tami na 2-8 °C, a suvišak streptavidina je potom uklonjen ispiranjem u puferu PBS. Stanice su nakon centrifugiranja resuspendirane u 250 µl pufera PBS s 2% FBS. Svakom uzorku dodano je 2,5 µl 7AAD (7-amino-actinomycin), koji ulazi u citoplazmu kroz oštećenu staničnu membranu i obilježava mrtve stanice vežući se na DNA. Suspenzija je unutar 5-10 min propuštena na protočnom citometru Attune (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) s dva lasera koji omogućuju istovremenu analizu 6 fluorescentnih boja, a dobiveni podatci analizirani su pomoću programa FlowJo (FlowJo, Ashland, Oregon, SAD). Neobilježene stanice i stanice obojane kombinacijom protutijela u kojima nedostaje fluorokrom za kojeg se određuje prag pozitivnosti (FMO, prema engl. *fluorescence minus one*) te stanice obojanje samo jednim fluorokromom korištene su za korekciju preklapanja signala emisijskih spektara različitih fluorokroma te za određivanje okvira za analizu. Okviri korišteni za analizu su prikazani uz rezultate. U svim pokusima stanice su prvo izdvojene iz svih snimljenih događaja na prikazu prednjeg (FSC, prema engl. *forward-scatter*) u odnosu na postranični (SSC, prema engl. *side-scatter*) rasap, a potom su pojedinačne stanice izdvojene na prikazima površine SSC (SSC-A, prema engl. *side-scatter area*) u odnosu na visinu SSC (SCC-H, prema engl. *side-scatter height*) te površine FSC (FSC-A, prema engl. *forward-scatter area*) i u odnosu na

visinu FSC (FSC-H, prema engl. *side-scatter height*). Udjeli ciljnih populacija potom su određeni u u populaciji živih, 7AAD<sup>-</sup> stanica.

**Tablica 2. Kombinacije protutijela korištene za obilježavanje pojedinačnih uzoraka.**

Stanice subkondralne koštane srži	Zglobne stanice I	Zglobne stanice II	Zglobne stanice III
B220 FITC	B220 FITC	Sca-1 FITC	CD90.2 FITC
Gr-1 PE	Gr1 PE	CD140b biotin-PE	CD200 PE
7AAD	7AAD	7AAD	7AAD
CD11b PECy7	CD11b PECy7		CD105 PE Cy7
CD3 APC	CD3 APC	CD31/CD45/TER119 APC	CD31/CD45/TER119 APC
F480 APCeF780	F480 APCeF780	CD44 APC eF780	CD51 biotin-APCeF780

**Tablica 3. Protutijela korištena u istraživanju.**

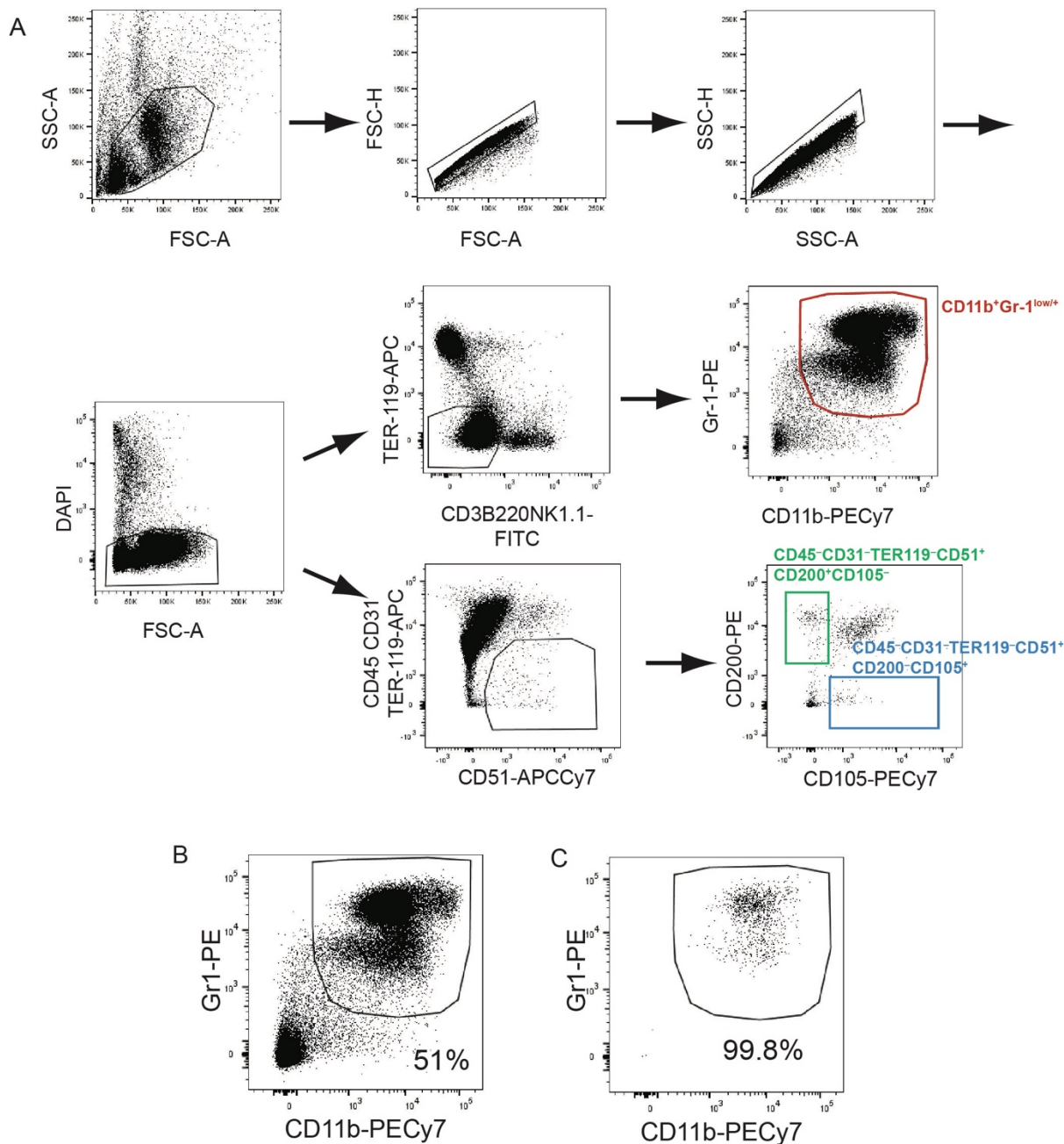
Protutijelo	Kataloški broj (proizvođač)	Klon	Razrjeđenje	Inkubacija
7AAD	559925 (BD Pharmingen™)			<10min/25 °C
Protu-mišji B220 FITC	11-0452 (eBioscience)	RA3-6B2	1:200	30min/2-8 °C
Protu-mišji Ly-6G (Gr-1) PE	12-5931-82 (eBioscience)	RB6-8C5	1:400	
Protu-mišji CD11b APC	17-0112 (eBioscience)	M1/70	1:800	
Protu-mišji CD3e APC	17-0031 (eBioscience)	145-2C11	1:200	
Protu-mišji F4/80 APC-eF780	47-4801-82 (eBioscience)	BM8	1:400	
Protu-mišji Sca-1 FITC	11-5981 (eBioscience)	D7	1:200	
Protu-mišji CD140b (PDGFRb) Biotin	13-1402-82 (eBioscience)	APB5	1:100	
Protu-mišji CD31 (PECAM-1) APC	17-0311 (eBioscience)	390	1:400	
Protu-mišji CD45 APC	17-0451-83 (eBioscience)	30-F11	1:400	
Protu-mišji TER-119 APC	17-5921-82 (eBioscience)	TER-119	1:200	
Protu-ljudski/mišji CD44 APC-eFluor® 780	47-0441 (eBioscience)	IM7	1:200	
Protu-mišji CD90.2 (Thy-1.2) FITC	11-0903-82 (eBioscience)	30-H12	1:100	
Protu-mišji CD200 PE	12-5200-82 (eBioscience)	OX90	1:200	
Protu-mišji CD105 (Endoglin) PE-Cy7	25-1051-82 (eBioscience)	MJ7/18	1:200	
Protu-mišji CD51 (alphaV) biotin	13-0512	RMV-	1:200	
Protu-mišji CD3 FITC	561089 (BD Bioscience)	145-2C11	1:200	
Protu-mišji CD11b PE-Cy7	25-0112-82 (eBioscience)	M1/70	1:400	
Protu-mišji CD117 APC	561074 (BD Pharmingen™)	2B8	1:200	
Protu-mišji NK1.1 FITC	11-5941-82 (eBioscience)	PK136	1:200	
Streptavidin APC-eFluor® 780	47-4317 (eBioscience)	-	1:400	25 min/4 °C
Streptavidin PE	12-4317-87 (eBioscience)	-	1:200	
Protu-mišji CD16/CD32	14-0161-85 (eBioscience)	93	1:100	5 min/25 °C

#### 4.8. Razvrstavanje staničnih populacija aktivirano fluorescencijom

Razvrstavanjem stanica postupkom FACS izdvojene su mijeloidna populacija te populacija koštano-hrskavičnih prethodnika iz populacije ukupnih stanica izoliranih iz zglobnog odjeljka. Mijeloidna populacija izdvojena je u drugoj fazi istraživanja iz miševa Fas<sup>-/-</sup> i WT s artritisom te imuniziranih kontrolnih miševa, sa svrhom izolacije RNA i analize transkriptoma mijeloidnih stanica pomoću genskih čipova, a u trećoj fazi istraživanja izdvojeni su dodatni uzorci sinovijalnih mijeloidnih stanica Fas<sup>-/-</sup> i WT miševa s artritisom, kontrolnih miševa te neimuniziranih miševa u svrhu potvrde rezultata dobivenih analizom genskih čipova postupkom qPCR. U svrhu analize transkriptoma koštano-hrskavičnih prethodnika je u odvojenom setu pokusa izdvojena CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> populacija iz miševa WT s artritisom te CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> populacija iz neimuniziranih miševa WT te miševa WT s artritisom. Razvrstavanje je provedeno pomoću uređaja BD FACSAria I (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD), opremljenog s tri lasera. Miševi su žrtvovani 10. dan nakon i.a. injekcije nakon čega je pripravljena jednostanična suspenzija postupkom opisanom kod pripreme suspenzija za protočnu citometriju. Zbog ograničenog broja stanica za razvrstavanje korištene su suspenzije dobivene iz oba koljena, a da bi procijenili stanje epifizne kosti miševi su dva dana prije žrtvovanja za izdvajanje mijeloidnih stanica snimljeni *in vivo* uređajem  $\mu$ -CT. Stanične suspenzije izolirane su na isti način kao što je opisano za protočno-citometrijsku analizu. Za izdvajanje mijeloidnih stanica su one obilježene sljedećim protutijelima: CD3-FITC, B220-FITC, NK1.1-FITC, TER119-APC, CD11b- PEcy7 te Gr1-PE. Mrtve stanice isključene su obilježavanjem s pomoću 4',6-diamidino-2-fenil indola (DAPI, Sigma). Izdvojeno je do  $5 \times 10^5$  pojedinačnih, živih (DAPI<sup>-</sup>) neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), nelimfoidnih (CD3B220NK1.1<sup>-</sup>) stanica (Slika 3A), koje izražavaju biljege CD11b i Gr-1 (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low/+</sup>) epruvetu volumena 2 mL, s 300  $\mu$ L pufera PBS s 2% FBS. Za izdvajanje koštano-hrskavičnih prethodnika korišteni su: CD90.2-FITC, CD200-PE, CD105-PEcy7, CD31-APC, CD45-APC, TER119-APC, CD51-biotin, streptavidin-APCeF780 i DAPI. Izdvojeno je do 200-500 pojedinačnih, živih (DAPI<sup>-</sup>), CD51<sup>+</sup>, neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), neendotelnih (CD31<sup>-</sup>), neleukoidnih (CD45<sup>-</sup>) CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> i CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> stanica epruvetu volumena 2 mL, izravno u pufer za lizu stanica koji je sastavni dio seta kemikalija za obrnuto prepisivanje i amplifikaciju transkriptoma uzoraka s malom količinom RNA (Smartseq v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing, TakaRa). Čistoća izdvojenih stanica procijenjena je ponovnom analizom, a zadovoljavajućom čistoćom smatran je udio ciljne populacije  $\geq 99.5\%$



(Slika 3B). Po završetku izdvajanja stanice su centrifugiranjem spuštene na dno epruvete i resuspendirane u 1 mL reagens TRIZol (Applied Biosystems), te je potom izolirana RNA.



**Slika 3. Razvrstavanje mijeloidne populacije i populacije koštano hrskavičnih progenitora pomoću uređaja FACS (prema engl. *fluorescence activated cell sorter*).** (A) Izdvojeno je do  $5 \times 10^5$  pojedinačnih, živih (DAPI<sup>-</sup>) neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), nelimfoidnih (CD3B220NK1.1<sup>-</sup>) stanica, koje izražavaju biljege CD11b i Gr-1 (CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>low/+</sup>) odnosno 200-500 pojedinačnih, živih (DAPI<sup>-</sup>) neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), neleukocitnih (CD45<sup>-</sup>), neendotelinih (CD31<sup>-</sup>) stanica, koje izražavaju biljege CD51 i CD200, a ne izražavaju CD105 (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup>) ili CD51 i CD105, a ne izražavaju CD200 (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>) (B, C) Čistoća dobivenog uzorka procijenjena je ponovnom analizom, a zadovoljavajućom čistoćom smatran je udio ciljne populacije  $\geq 99,5$ . U prikazanome uzorku je udio mijeloidnih stanica u izvornom uzorku 51% (B), a nakon izdvajanja 99,8% (C).

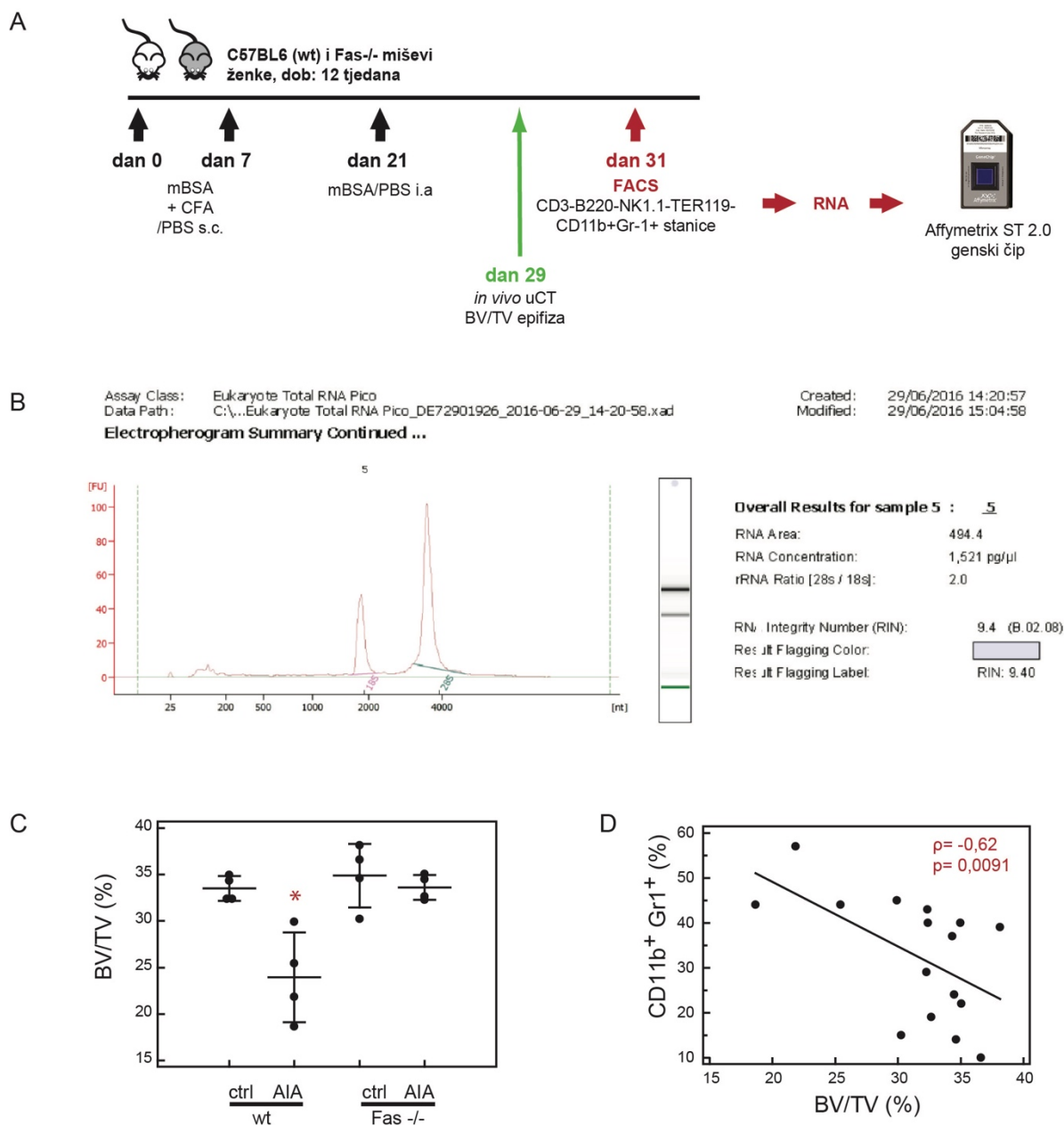


#### 4.9. Analiza genskog izražaja pomoću genskih čipova

Analiza transkriptoma mijeloidnih stanica provedena je pomoću genskih čipova GeneChip™ Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific), koji sadrže probe za otkrivanje 28000 kodirajućih transkripata mRNA, te 5000 nekodirajućih transkripata, od čega je 2000 dugih nekodirajućih RNA (lncRNA, prema engl. *long non-coding RNA*). Genskim čipovima analizirano je po 4 uzorka svake od sljedećih eksperimentalnih skupina:

- WT miševi imunizirani s mBSA, injicirani i.a. s mBSA (WT AIA)
- WT miševi imunizirani s mBSA, injicirani i.a. s puferom PBS (WT ctrl),
- miševi Fas *-/-* imunizirani s mBSA, injicirani i.a. s mBSA (Fas AIA),
- miševi Fas *-/-* imunizirani s mBSA, injicirani i.a. s puferom PBS (Fas ctrl) .

Miševi su žrtvovani 10. dan artritisa, a dan prije žrtvovanja snimljeni su uređajem  $\mu$ -CT u svrhu procjene stanja epifizne subkondralne kosti. Potom su iz oba koljena zgloba izdvojene mijeloidne stanice pomoću uređaja FACS te pohranjene u reagens TRIzol za izolaciju RNA. Ovim postupkom obrađeno je ukupno 16 uzoraka prikupljenih iz oba koljena pojedinačnih miševa odabranih prema sljedećim kriterijima: postotak mijeloidne populacije u zglobu, epifizni koštani volumen, zadovoljavajuća količina dobivene RNA u uzorku (>20 ng), zadovoljavajuća kvaliteta te integritet izolirane RNA (RIN > 8,5).



**Slika 4. Ustroj pokusa i odabir uzoraka za analizu genskog izražaja sinovijalne mijeloidne populacije pomoću genskih čipova.** (A) Miševi su žrtvovani 10. dan artritisa odnosno 31. dan poslije primarne imunizacije. Dva dana prije žrtvovanja, oba koljena su snimljena in vivo uređajem za mikro-komputoriziranu tomografiju ( $\mu$ -CT). Iz staničnih suspenzija stanica zglobnog odjeljka izdvojene su mijeloidne stanice pomoću uređaja FACS (prema engl. *fluorescence activated cell sorter*), a potom izolirana RNA, koja je nakon kontrole kvalitete, umnožavanja i obilježavanja hibridizirana na genske čipove. (B) Primjer uzorka dobre kvalitete RNA procijenjene pomoću uređaja Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.). (C, D) Analizirano je ukupno 16 uzoraka izdvojenih mijeloidnih stanica iz oba koljena pojedinačnih miševapo 4 iz svake pokusne skupine: miševi divljeg tipa s artritism (WT AIA), kontrolni miševi divljeg tipa (WT ctrl), miševi Fas<sup>-/-</sup> s artritism (Fas<sup>-/-</sup>AIA) te kontrolni miševi Fas<sup>-/-</sup>(Fas<sup>-/-</sup>ctrl). Prikazan je (C) udio koštanih gređica (%), BV/TV, prema engl. bone volume/total volume) u distalnim femoralnim epifizama te (D) povezanost udjela mijeloidnih stanica u sinovijalnom odjeljku s udjelom volumena epifiznih koštanih gređica ( $\rho$  = Spearmanov korelacijski koeficijent) u uzorcima odabranim za analizu.

Za izolaciju RNA, uzorci su u reagensu TRIzol inkubirani tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom je svakom uzorku dodano 200  $\mu$ l kloroforma te je uzorak dobro promiješan jačim potresanjem epruvete i dodatne 2 minute ostavljen na sobnoj temperaturi. Centrifugiranje mješavine nukleinskih kiselina i bjelančevina u reagensu TRIzol i kloroformu tijekom 15 minuta na 12000 g pri temperaturi 4 °C rezultira razdvajanjem triju faza, od kojih organska, donja faza sadrži bjelančevine, srednja faza sadrži DNA, a gornja, vodena faza sadrži RNA. Vodena faza potom je prebačena je u čistu epruvetu volumena 1,5 ml te je dodano 500  $\mu$ l izopropanola koji precipitira RNA. Uzorci su ostavljeni u izopropanolu na -20 °C preko noći te su sljedeći dan centrifugirani 15 minuta, brzinom 12000 g, na 4 °C. Izliven je izopropanol, a tubice sa talogom RNA oprane su dodavanjem 75% etanola, laganim miješanjem te centrifugiranjem 5 minuta brzinom 7500 g pri temperaturi 4 °C. Nakon odlijevanja etanola talog RNA je 10 minuta osušen na sobnoj temperaturi uz otvorenu epruvetu. RNA je potom resuspendirana u prikladnom volumenu dH<sub>2</sub>O (da konačna koncentracija RNA bude između 100-500ng/ $\mu$ l) i po potrebi inkubirana na 55 °C tijekom 10 minuta da se olakša otapanje. Izolirana RNA pročišćena je pomoću MagMAX™-96 for Microarrays Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) seta kemikalija koji sadrži enzim DNazu, koja iz uzoraka uklanja potencijalno prisutnu genomsku DNA. Ukratko, na 10  $\mu$ l RNA uzoraka dodano je 25  $\mu$ l otopine enzima DNaze. Uzorak potom dva puta ispran odgovarajućom otopinom, a RNA je iz otopine ponovo izdvojena vezanjem na magnetske kuglice te resuspendirana u 10  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Ovisno o očekivanoj koncentraciji RNA količina i kvaliteta dobivene RNA procjenjena je: mjerenjem apsorbancija kod 230, 260 i 280 nm na UV-VIS spektrofotometru (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, SAD) za uzorke koncentracija 100-3000 ng/ $\mu$ l, mjerenjem emisije fluorescentnog signala nakon vezanja RNA setom kemikalija Qubit® RNA HS Assay Kit (Invitrogen) i fluorometrom Qubit 2.0 (Invitrogen) za uzorke koncentracije od 250 pg/ $\mu$ L do 100 ng/ $\mu$ L. Kvaliteta RNA također je procijenjena pomoću seta kemikalija Agilent™ RNA 6000 Pico Kit te uređaja Agilent™ 2100 Bioanalyzer™ Instrument (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, SAD). Postupak se temelji na kapilarnoj elektroforezi pri čemu razdvajanje podjedinica ribosomalne RNA (rRNA, prema engl. *ribosomal RNA*) daje uvid u očuvanost molekule RNA. Promjena omjera između podjedinica 18S i 28S ili njihov nedostatak upućuje na razgradnju RNA, a Bioanalyzer taj omjer koristi u algoritmu za izračun vrijednosti integriteta RNA (RIN, prema engl. *RNA integrity number*). Pored toga, Bioanalyzer ima mogućnost određivanja niskih koncentracija RNA između 50 – 5000 pg/ $\mu$ L. Nakon procjene količine i kvalitete RNA, odabrano je 16 uzoraka za analizu genskim čipom

prema gore opisanim kriterijima te su pripremljeni za hibridizaciju na genski čip. RNA je pomoću GeneChip™ WT Pico Reagent Kit seta kemikalija (Affymetrix) prema uputama proizvođača u više koraka prepisana u komplementarnu DNA (cDNA, prema engl. *complementary DNA*) obilježenu biotinom, koja se hibridizira na genski čip. U prvoj reakciji, RNA je metodom reverzne transkripcije prepisana u cDNA prvog lanca. U 5 µl RNA dodan je First-Strand Master Mix pripremljen mješanjem 4 µl pufera WT Pico First-Strand te enzima WT Pico First-Strand. Mješavina sadrži početnice sa sekvencom promotora T7, a rezultat reakcije je jednolančana cDNA sa sekvencom promotora T7 na 5' kraju. Reakcija je provedena pri sljedećim uvjetima: 5 minuta na 25 °C, 60 minuta na 42 °C, 2 minute na 4 °C, 30 minuta na 37 °C, 10 minuta na 80 °C, te najmanje 2 minute na 4 °C. Ostatak početnica uklonjen je dodavanjem 2 µl otopine WT Pico Cleanup. U sljedećem koraku su na 3' kraj cDNA dodane adaptorske sekvence, koje će poslužiti kao kalup za sintezu dvolančane DNA (dsDNA, prema engl. *double stranded DNA*). U 12 µl cDNA dodan je 3' Adaptor Master Mix pripremljen mješanjem 7 µl pufera WT Pico 3' Adaptor i 1 µl enzima WT Pico 3' Adaptor, koji sadrži DNA polimerazu te RNazu H, nakon čega je sinteza lanca cDNA s adaptorskom sekvencom provedena pri sljedećim uvjetima: 15 minuta na 15 °C, 15 minuta na 35 °C, 10 minuta na 70 °C, te potom najmanje 2 minute na 4 °C. Potom je sintetizirana i umnožena dsDNA. Pre-IVT Master Mix pripremljen je miješanjem 29 µl pufera WT Pico PCR, koji sadrži početnice specifične za adaptore na 3' kraju cDNA te 1 µl enzima WT Pico PCR, Taq DNA polimeraze I. Reakcija se provodi 2 minute na 95 °C, te potom na 6, 9 ili 12 uzastopnih ciklusa od 30 sekundi na 94 °C i 5 minuta na 70 °C, te na kraju najmanje 2 minute na 4 °C. Novostvorena dsDNA prepisuje se *in vitro* (IVT, prema engl. *in vitro transcription*) u komplementarnu RNA (cRNA, prema engl. *complementary RNA*) koristeći RNA polimerazu T7, koja prepisuje samo sekvence nizvodno od promotora T7, dodanog na krajeve cDNA u prvoj reakciji. Metoda se temelji na Eberwine ili RT-IVT metodi (295). IVT Master Mix pripremljen je od 24 µl pufera WT Pico IVT te 6 µl enzima WT Pico IVT, dodan u uzorak dsDNA i inkubiran 14 sati na 40 °C, a potom na 4 °C. Novostvorena cRNA je pročišćena pomoću magnetnih čestica i etanola. Količina dobivene cRNA izmjerena je pomoću UV-VIS spektrofotometra, dok je distribucija veličine cRNA fragmenta provjerena pomoću instrumenta Agilent™ 2100 Bioanalyzer™ i seta kemikalija RNA 6000 Nano Kit. Potom je 20 µg cRNA u volumenu 24 µl korišteno je kao predložak za sintezu drugog lanca jednolančane cDNA (ss-cDNA, prema engl. *single stranded cDNA*) obrnutim prepisivanjem koristeći 4µl početnica 2<sup>nd</sup>-cycle ss-cDNA, 8 µl pufera te 4 µl enzima, tijekom 10 minuta na

25 °C, 90 minuta na 42 °C, te 10 minuta na 70 °C, a potom najmanje 2 minute na 4 °C. Predložak cRNA hidroliziran je dodavanjem 4 µl enzima RNaze H te inkubiranjem 45 minuta na 37 °C, 5 minuta na 95 °C, i najmanje 2 minute na 4 °C. ss-cDNA razrijeđena je dodavanjem 11 µl vode bez nukleaza te nakon toga pročišćena pomoću magnetnih čestica i etanola, da bi se uklonili enzimi, soli te ostatak deoksiribonukleotida, resuspendirana u 30 µl vode bez nukleaza temperature 65 °C te kvantificirana pomoću UV-VIS spektrofotometra i pohranjena na -20 °C do upotrebe. Pročišćena ss-cDNA je fragmentirana pomoću enzima uracil-DNA glikozilaze (UDG) i apurinske/apirimidinske endonuklease 1 (APE 1) te označena reagensom za obilježavanje DNA kovalentno vezanim uz biotin pomoću enzima terminalne deoksinukleotidil transferaze (TdT). Reakcija je provedena miješanjem 5,5 µg ss-cDNA u volumenu od 46 µl te mješavine za fragmentaciju i označavanje (12 µL pufera WT Pico Fragmentation and Labeling i 2 µL enzima WT Pico Fragmentation and Labeling) te inkubacijom 1 sat na 37 °C, 2 minute na 93 °C, te najmanje 2 minute na 4 °C. Genski čipovi su prije hibridizacije ekvilibrirani na sobnu temperaturu. Pripremljena je mješavina kemikalija za hibridizaciju koja se sastoji od vode, dimetilsulfoksida (DMSO), kontrolnih B2 oligonukleotida koji se koriste za određivanje položaja signala kod očitavanja, biotinom označene hibridizacijske kontrole te komercijalno dostupne mješavine kemikalija za hibridizaciju (Hybridization Master Mix, GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit, Applied Biosystems). U mješavinu je potom dodana fragmentirana i označena ss-cDNA te je mješavina inkubirana 5 minuta na 99 °C te 5 minuta na 45 °C. Mješavina za hibridizaciju pažljivo je ubrizgana u genski čip, koji je tijekom 16 sati inkubiran u hibridizacijskoj pećnici (GeneChip™ Hybridization Oven 645) pri temperaturi 45 °C i uz miješanje na 60 rpm. Potom je iz genskih čipova uklonjena mješavina kemikalija za hibridizaciju, nakon čega su napujeni puferom za ispiranje (Hybridization Master Mix, GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit, Applied Biosystems) koje se izvodi u uređaju za pranje genskih čipova. Ovaj uređaj može istodobno ispirati samo 4 čipa, te su stoga genski čipovi hibridizirani u više navrata. Čipovi su nakon ispiranja očitani pomoću uređaja GeneChip™ Scanner 3000 System (Applied Biosystems), a datoteke tipa .CEL dobivene očitavanjem analizirane su bioinformatičkim postupcima.

Bioinformatička analiza sastoji se od sljedećih koraka:

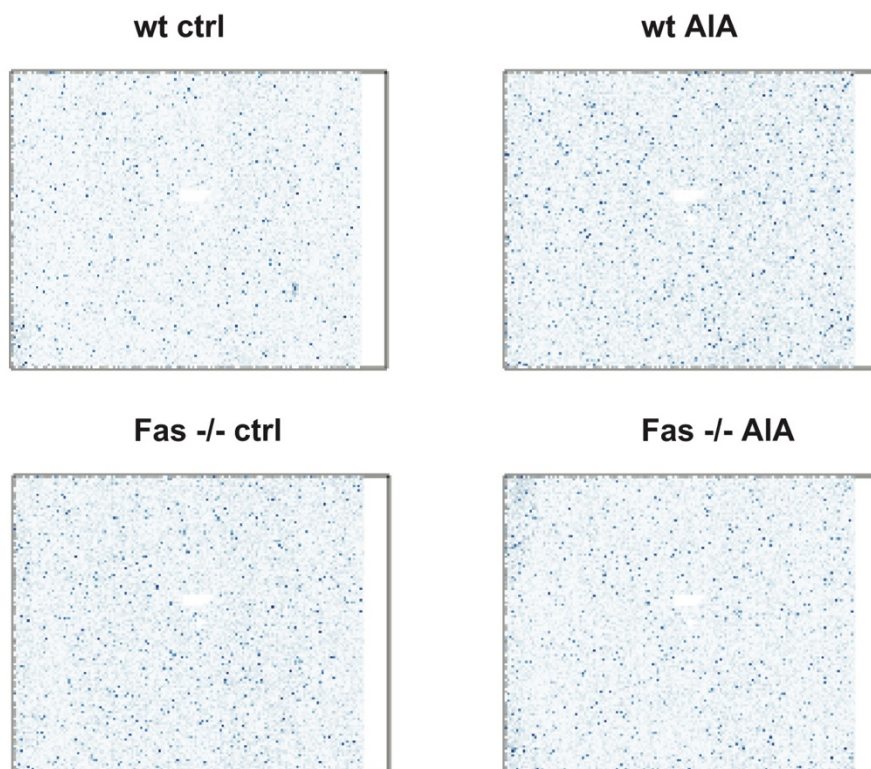
- procjena kvalitete čipova prije predobrade,
- predobrada signala genskih čipova,
- procjena kvalitete čipova nakon predobrade,
- filtriranje seta proba niske varijabilnosti,
- analiza različito izraženih gena i
- analiza zastupljenosti termina genske ontologije u različito izraženim genima.

Predobrada sirovih podataka dobivenih očitavanjem genskih čipova, kontrola kvalitete genskog čipa, analiza različito izraženih gena te analiza zastupljenosti termina genske ontologije provedene su unutar sučelja Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>) u programu R je pomoću *oligo* (296), *pd.mogene.2.0.st* (297), *limma* (298), *affycoretools* (299), *mogene20stranscriptcluster.db* (300), *clusterProfiler* (301) i *genefilter* (302) paketa.

Vrijednosti dobivene očitavanjem genskih čipova predobrađene su algoritmom RMA (prema engl. *robust multi-array average*), koji normalizira vrijednosti intenziteta signala dobivene očitavanjem čipa, zbroji probe u setove proba i ispravi pozadinski signal. Iz analize su uklonjene kontrolne probe te setovi proba bez anotacije ili s višestrukom anotacijom. Kvaliteta čipova procijenjena je prije i poslije normalizacije vrijednosti intenziteta signala. Budući da je izražaj velike većine gena sličan u svim eksperimentalnim skupinama karakteristika kvalitetnih čipova, koji se stoga mogu međusobno uspoređivati, slična je raspodjela intenziteta signala, te se na toj pretpostavci temelje postupci analize kvalitete. Koristeći vrijednosti logaritamski transformiranog signala svih proba kompjuterski su stvorene slike čipova za procjenu raspodjele signala na svakom čipu i isključivanja prostorne pristranosti (Slika 5). Za procjenu jakosti signala pojedinačnih proba na čipovima te utvrđivanje mogućih ne-bioloških razlika između pojedinačnih čipova primijenjen je prikaz MA, koji na ordinati sadrži omjer logaritamski transformiranih jakosti signala pojedinog čipa u odnosu na referentni čip, dok je na apscisi srednja vrijednost logaritamski transformiranih intenziteta signala oba čipa. Budući da se jakost signala velike većine proba bitno ne razlikuje među pojedinačnim čipovima, kvalitetne čipove karakterizira krivulja blizu  $y=0$ , što je u analiziranim čipovima bilo vidljivo i prije i nakon predobrade (Slika 6A). Dijagramom pravokutnika te histogramom su prikazane raspodjele logaritamski transformiranih signala svakog čipa. Intenzitet signala već je prije predobrade bio podjednako raspodijeljen u svim

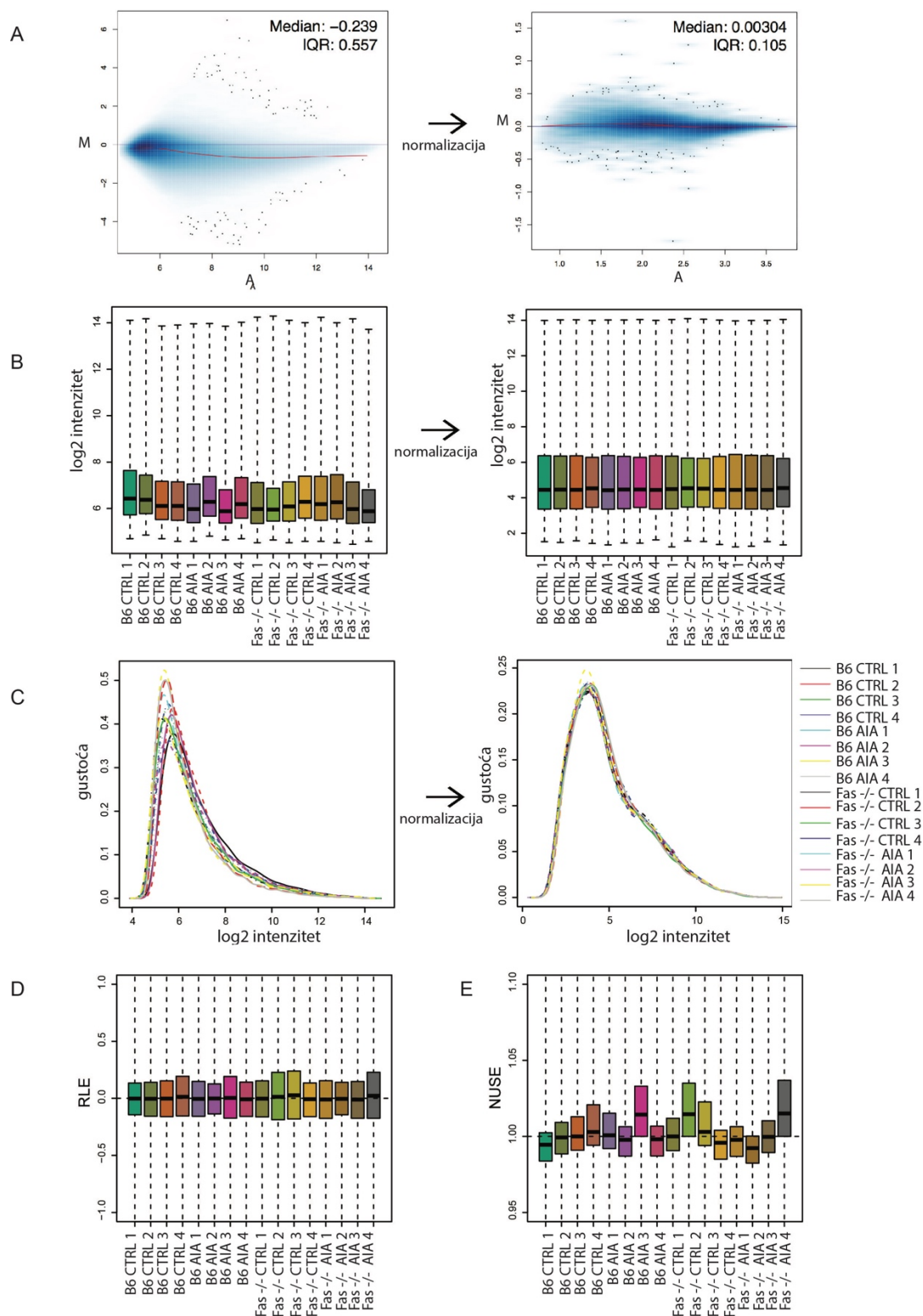
čipovima, a manje razlike u raspodjeli ispravljene su tijekom normalizacije (Slika 6B, C). Omjer vrijednosti izražaja seta proba i srednje vrijednosti izražaja istog seta proba u svim čipovima (RLE, prema engl. *relative log expression*) te normalizirana standardna pogreška (NUSE, prema engl. *normalized unscaled standard error*) također su bili podjednako raspodijeljeni u svim čipovima, i grupirani oko vrijednosti 0 (RLE) i 1 (NUSE), što je također karakteristično za čipove dobre kvalitete (Slika 6D, E). Korelacijska analiza korištena je za otkrivanje čipova lošijih kvaliteta, koji slabije koreliraju s ostalim čipovima. Pearsonovi koeficijenti povezanosti podataka dobivenih očitavanjem pojedinačnih čipova bili su veći od 0,93 za neobrađene, a veći od 0,96 za normalizirane podatke (Slika 7 A), što upućuje na to da nema čipova koji odskaču po kvaliteti.

Otkrivanje učinka zajedničke obrade također je nužno da bi se utvrdilo jesu li dobivene razlike među čipovima uzrokovane biološki ili tehničkim razlikama u obradi čipova. Zbog ograničenja uređaja za pranje čipova te vremenske zahtjevnosti protokola za hibridizaciju, hibridizacija te ispiranje čipova provedeni su u 4 skupine, a očitavanje čipa provedeno je u dva različita dana zbog ograničenja stroja za očitavanje čipova. Analiza glavnih komponenti (PCA, prema engl. *principal component analysis*) i analiza hijerarhijskog grupiranja isključili su grupiranje uzoraka koji su zajednički pripremani, jer su uzorci svih 4 eksperimentalnih skupina jednakomjerno podijeljeni u zajedno obrađene skupine. (Slika 7B). Na temelju svega navedenog zaključeno je da je kvaliteta pripreme i očitavanja čipova zadovoljavajuća.

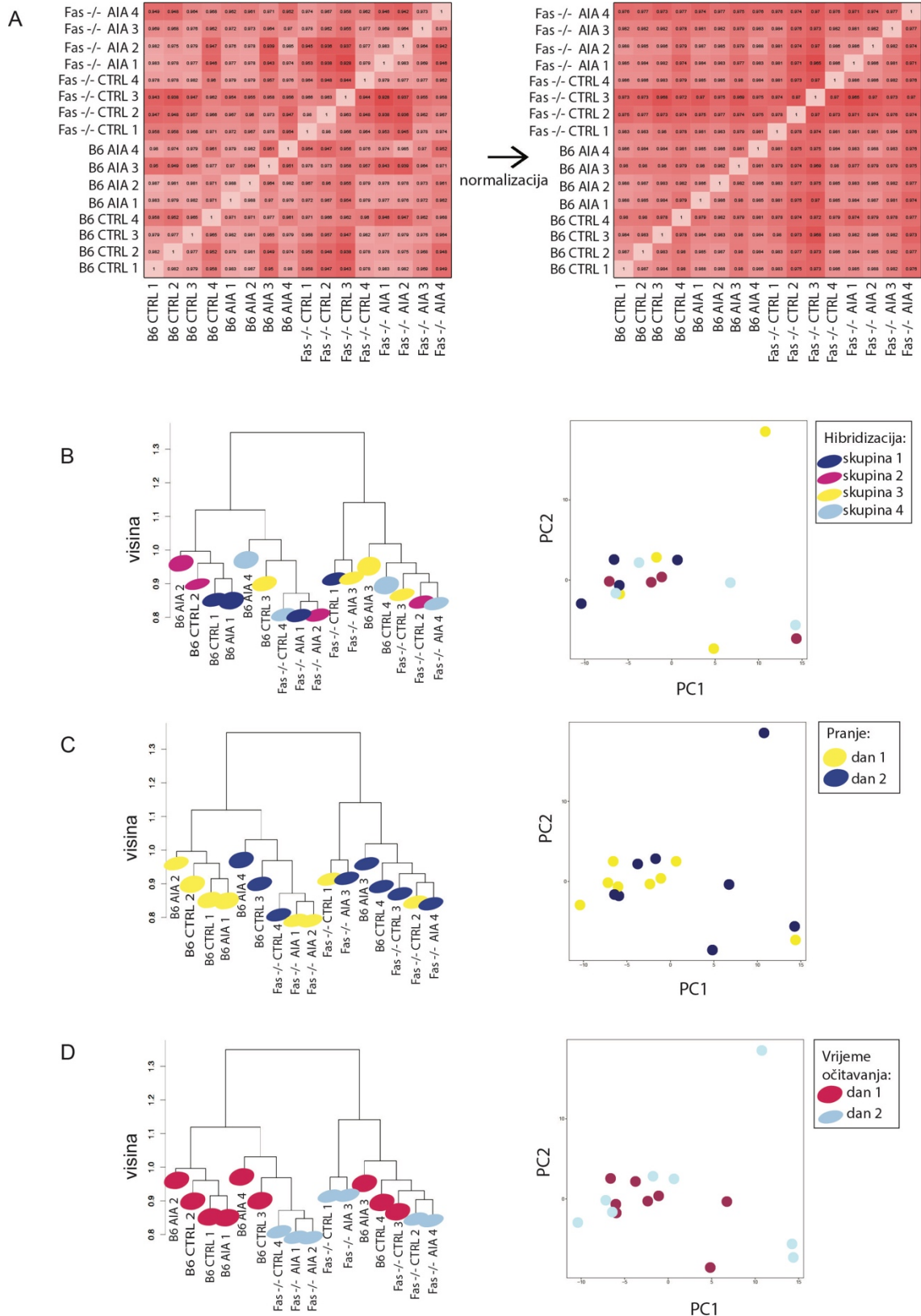


**Slika 5. Procjena kvalitete genskih čipova pomoću kompjuterski stvorene slike čipova.** Slike su napravljene koristeći vrijednosti logaritamski transformiranog signala svih proba te je procjenjivana raspodjela signala na svakom čipu i isključena prostorna pristranost. Prikazane su reprezentativne slike po jednog genskog čipa iz svake pokusne skupine. Jakost plave boje proporcionalna je jakosti signala dok se na bijelim mjestima nalaze kontrolne probe.





**Slika 6. Procjena kvalitete genskih čipova pomoću na temelju raspodjele signala pojedinačnih čipova.** Za otkrivanje mogućih razlika među čipovima uzrokovanih lošom kvalitetom korišteni su: grafikon MA (A), koji prikazuje omjer logaritamski transformiranih jakosti signala određenog čipa u usporedbi s referentnim čipom u odnosu na srednju vrijednost logaritamski transformiranih intenziteta signala oba čipa; dijagram pravokutnika (B) i histogram (C) koji prikazuju raspodjelu logaritamski transformiranih signala svakog čipa; prikaz omjera vrijednosti izražaja seta proba i srednje vrijednosti izražaja istog seta proba u svim čipovima (RLE, prema engl. relative log expression) (D) te prikaz normalizirane standardne pogreške (NUSE, prema engl. *normalized unscald standard error*) (E). Kvaliteta je provjerena prije i poslije normalizacije, a slična raspodjela vrijednosti u svim čipovima upućuje na dobru kvalitetu.



**Slika 7. Otkrivanje čipova loše kvalitete te učinka zajedničke obrade pomoću korelacijske analize, grupiranja te analize glavnih sastavnica (PC, prema engl. *principal component*). (A) Korelacijska analiza, pokazuje da nema čipova koji odskakuju po kvaliteti. Hibridizacija (B), ispiranje (C) i očitavanje čipova (D) su zbog tehničkih ograničenja provedeni u više skupina. analiza PC i analiza hijerarhijskog grupiranja ne pokazuju grupiranje uzoraka koji su zajednički pripremljeni.**

U sljedećem koraku su pomoću metode standardne devijacije (SD, prema engl. *standard deviation*) uklonjeni setovi proba niske varijabilnosti, s ciljem smanjenja broja usporedbi pri analizi razlika u izražaju između pokusnih skupina, te posljedično vjerojatnosti greške tipa 1. Ovakav pristup najpovoljniji je za analizu koja se temelji na malim pokusnim skupinama. Izračuna se SD jakost signala pojedinačnih setova proba za sve uzorke te se uklanjaju setovi proba čija je SD manja od srednje vrijednosti SD svih setova proba. Dobivena tablica normaliziranih i filtriranih vrijednosti izražaja, u kojoj svaki red predstavlja jedan set proba (koji predstavlja jedan gen) i svaki stupac jedan uzorak, korištena je za analizu razlika u genskom izražaju pomoću algoritma limma (prema engl. *linear models for microarray data*) (303). Analizirane su razlike u izražaju između svih Fas  $-/-$  i WT uzoraka, Fas  $-/-$  AIA i WT AIA uzoraka, Fas  $-/-$  CTRL i WT CTRL uzoraka, te svih CTRL i AIA uzoraka. Različito izraženim genima smatrani su geni sa apsolutnom vrijednošću omjera promjene (FC, prema engl. *fold change*)  $>1,5$ , te razinom značajnosti  $p < 0,05$  nakon prilagodbe p vrijednosti za višestruko testiranje postupkom Benjamini-Hochberg (304). Za prikaz različito izraženih gena korišten je grafički prikaz negativnog logaritma prilagođene p vrijednosti ( $-\log_{10}p$ ), u odnosu na logaritam omjera promjene izražaja gena ( $\log_2FC$ , prema engl. *fold change*), engl. *volcano plot*. Pojedinačni geni prikazani su crnim točkama, a crveno su označeni geni zadovoljavajuće prilagođene p vrijednosti (Benjamini-Hochberg,  $p < 0,05$ ) te omjera promjene. Razlike u izražaju također su prikazane toplinskom mapom (prema engl. *heatmap*) u kojoj su z-vrijednosti (prema engl. *z-score*) izražaja setova proba (gena) prikazane zeleno za pozitivne, crveno za negativne z-vrijednosti, te crno za vrijednosti oko  $z=0$ . Algoritmi hijerarhijskog grupiranja te analiza glavnih sastavnica uz procjenu kvalitete čipova primijenjeni su i za analzu sličnosti uzoraka na temelju izražaja gena. Analiza zastupljenosti termina genske ontologije (GO) (305) provedena je pomoću *enrichGO* funkcije *clusterProfiler* paketa u programu R. Analiza zastupljenosti GO termina određuje se jesu li određene biološke funkcije, stanične komponente ili molekularni procesi pojačano zastupljeni u među različito izraženim genima, uz nominalnu p vrijednost  $< 0,05$ , prilagođenu p vrijednost za višestruko testiranje postupkom Benjamini-Hochberg  $p < 0,1$ , i apsolutni omjer promjene  $> 1,5$ . Analiza uzima u obzir ukupni broj gena na kojima je provedena analiza različitog izražaja, broj gena koji su različito izražani između eksperimentalnih skupina za koje se provodi analiza, te broj gena koji pripadaju određenom terminu GO te pomoću hipergeometričke raspodjele, izračunava p vrijednost, koja određuje jesu li različito izražani geni uistinu pojačano zastupljeni u određenom terminu GO ili se tamo nalaze samo slučajno. Pošto se analiza istovremeno provodi na velikom broju termina GO (9996 javno dostupnih

genskih setova, od toga 7350 genskih setova bioloških procesa, 1001 genskih setova staničnih komponenta te 1645 genskih setova molekularne funkcije) potrebna je prilagodba p vrijednosti za višestruko testiranje postupkom Benjamini-Hochberg. Nakon prilagodbe, razina značajnosti postavljena je na  $p < 0,05$ . Grafički prikazi ove analize također su napravljeni pomoću *clusterProfiler* paketa u programu R.

#### 4.10. Analiza genskog izražaja pomoću sekvencioniranja RNA

Analiza transkriptoma populacija koštano-hrskavičnih prethodnika provedena je sekvencioniranjem RNA. Analizirane su sinovijalne CD200<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup> stanice miševa WT s artritismom, CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> stanice neimuniziranih miševa WT te CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> stanice miševa WT s artritismom. Sve analizirane populacije koštano hrskavičnih prethodnika se nalaze unutar nehematopoetske TER119<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> populacije. Usporedba CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> i CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> stanica miševa WT napravljena je u svrhu potvrde koštano-prethodničkog karaktera populacije CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> u zglobnom odjeljku, koja je na ovaj način zasad karakterizirana samo u kosti (43). Ova je populacija također uspoređena s istom populacijom u sinoviji miševa s artritismom s ciljem utvrđivanja mijenjaju li se značajno najraniji koštani prethodnici u artritisu. U svakoj od navedenih skupina je pripremljeno po 6 uzoraka, dobivenih iz 200-500 stanica izdvojenih postupkom FACS. Stanice su izdvojene izravno u 3,6  $\mu$ l pufera za lizu stanica s dodanim inhibitorom RNAze (TakaRa, Kyoto, Japan). Ovaj je pufer sastavni dio seta kemikalija Smartseq v4 Ultra<sup>®</sup> Low Input RNA Kit for Sequencing (TakaRa, Kyoto, Japan), koji se koristi za obrnuto prepisivanje i amplifikaciju transkriptoma uzoraka s malom količinom RNA. U uzorak su prije obrnutog prepisivanja i umnožavanja u razrijeđenju 1:65000 dodani kontrolni sljedovi nukleotida ERCC RNA Spike-In Mix (Invitrogen). U lizirani uzorak izdvojenih stanica je potom dodano 1  $\mu$ l početnica 3' SMART-Seq CDS II A (12  $\mu$ M) te je zajedno sa 0,75  $\mu$ l inhibitora RNAza uzorak inkubiran kroz 3 minute na 72 °C. Početnice 3' SMART-Seq CDS II A su modificirane početnice oligo dT koje se vežu za poli(A) rep molekula mRNA, i sadrže posebnu sekvencu koja se njihovim vezanjem dodaje na 5' kraj cDNA transkripata, te će u koraku PCR amplifikacije služiti kao početnica za vezanje DNA polimeraze. Nakon inkubacije je u uzorak dodano 0,5  $\mu$ l oligonukleotida SMART-Seq v4 (48  $\mu$ M) i 1  $\mu$ l enzima RT SMARTScribe (100U/ $\mu$ l), u 2  $\mu$ l 5X pufera Ultra Low First-Strand Buffer. Sinteza cDNA je potom provedena kroz 90 minuta na 40 °C i 10 min na 70 °C. Enzim RT korišten u ovoj reakciji na 3' kraju cDNA transkripata, to jest kad RT dođe do 5' kraja predloška mRNA, dodaje 3 molekule citozina, na koje se veže

oligonukleotid SMART-Seq v4, koji na svom 3' kraju ima 3 molekule gvanina. Na svom 5' kraju oligonukleotid sadrži slijed nukleotida komplementaran slijedu prethodno dodanom na 5' kraj cDNA transkripta pomoću početnica. Enzim RT korišten u ovoj reakciji ima posebnu sposobnost mijenjanja predloška, te nakon vezanja oligonukleotida na 3' kraj novostvorenog lanca cDNA dodaje ostatak njegove sekvence. Nastali cDNA produkt tako s obje strane ima dodani slijed nukleotida, koji u koraku PCR amplifikacije služi kao početnica za vezanje DNA polimeraze, te tako osigurava da se umnažaju samo transkripti koji su u potpunosti prepisani, čime se čuva reproducibilnost prepisivanja 5' kraja molekule mRNA. Ovu metodu nazivamo SMART®, prema engl. *switching mechanism at 5' end of RNA template* (306, 307). Tako dobivena cDNA umnožena je pomoću 0,5 µl DNA polimeraze SeqAmp i 0,5 µl početnica II A (12 µM), koje vežu slijed nukleotida dodan na krajeve cDNA transkripta, u 12,5 µl 2X pufera SeqAmp PCR Buffer. U reakciji PCR amplifikacije je cDNA denaturirana kroz 1 min na 95 °C, te potom amplificirana kroz 18 ciklusa: 10 sekundi na 98 °C, 30 sekundi na 65 °C te 3 min na 68 °C, nakon čega amplikon stoji 10 minuta na 72 °C. Amplikoni cDNA su potom pročišćeni pomoću Agencourt AMPure XP Kit seta kemikalija (Beckman Coulter, Pasadena, CA, SAD), koristeći magnetske čestice AMPure XP beads koje vežu veće fragmente cDNA i tako ih zadržavaju u otopini nakon ispiranja, dok se manji fragmenti, primjerice ostatci početnica uklanjaju. Kvaliteta amplikona je potvrđena setom kemikalija High sensitivity cDNA chip (Agilent) i uređajem Bioanalyzer (Agilent). Potom je 18 amplikona zadovoljavajuće kvalitete 1 ng cDNA prevedeno u knjižnice za sekvencioniranje pomoću seta kemikalija Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, SAD). Cijeli postupak se provodi u čistoj položici s 96 zdenaca. Prvi korak je tagmentacija, postupak u kojem je pomoću enzima transposoaza u istom koraku na nasumičnim mjestima fragmentirana cDNA te joj je na mjestima fragmentacije dodan adaptorski slijed nukleotida. U tu svrhu je na 1 ng cDNA u volumenu od 5 µl dodano 10 µl pufera Tagment DNA Buffer te 5 µl Amplicon Tagment Mix. Nakon miješanja uzorci su 1 minutu centrifugirani na 280×g na 20 °C, te potom 5 minuta tagmentirani na 55 °C. Za zaustavljanje reakcije dodano je 5 µl pufera Neutralize Tagment Buffer, te su nakon miješanja uzorci ponovo 1 minutu centrifugirani na 280×g na 20 °C i ostavljeni dodatnih 5 minuta na sobnoj temperaturi. U slijedećem koraku provedena je amplifikacija tagmentiranih fragmenata cDNA, tijekom koje se na njihove krajeve dodaju posebni sljedovi nukleotida, indeksi ili adapteri i7 i i5, čija je kombinacija specifična za svaki uzorak te nakon sekvencioniranja služe određivanju kojem uzorku pripada pojedinačni očitani slijed, te slijedovi nukleotida koji su nužni za provedbu sekvencioniranja. U uzorak je dodano 5 µl i7 i 5 µl i5 adaptera te 15 µl Nextera PCR Master

Mix. Nakon miješanja uzorci su 1 minutu centrifugirani na 280×g na 20 °C. Za amplifikaciju su uzorci prvo 3 minute inkubirani na 72 °C, potom 30 sekundi na 95 °C, nakon čega slijedi 12 ciklusa od 10 sekundi na 95 °C, 30 sekundi na 55 °C i 20 sekundi na 72 °C, a amplifikacija se završava inkubacijom 5 minuta na 72 °C. Knjižnice su nakon toga na isti način kao cDNA amplikoni pročišćene pomoću seta kemikalija Agencourt AMPure XP Kit te je njihova kvaliteta i koncentracija određena pomoću seta kemikalija High sensitivity cDNA chip i uređaja Bioanalyzer te setom kemikalija Qubit. Jednaka količina cDNA iz 15 odabranih knjižnica potom je spojena u jedan uzorak (engl. *library pooling*). Otopina spojenih knjižnica koncentracije 1,35pM sekvencionirana je pomoću uređaja NextSeq 500 (Illumina) i seta kemikalija High Output Kit v2.5 (150 Cycles) (Illumina). Za svaki uzorak očitano je 50 milijuna sljedova nukleotida dužine 75 baza. Sljedovi su očitani s oba kraja cDNA fragmenata, što nazivamo sekvencioniranje uparenih krajeva (prema engl. *paired end sequencing*). Pomoću indeksa i5 i i7 je potom određeno kojem uzorku pripada koji slijed (prema engl. *demultiplexing*) te su za svaki uzorak stvorene datoteke formata FASTQ, koji sadržava podatke o očitanoj slijedu nukleotida i kvaliteti očitavanja.

Bioinformatička analiza podataka provedena je pomoću nekoliko javno dostupnih alata u okruženju Unix te pomoću programa R unutar sučelja Bioconductor (<https://www.bioconductor.org>). Izvorni podaci očitavanja sekvenci u formatu FASTQ su pomoću programa cutadapt (308) skraćeni (prema engl. *trimming*) uklanjanjem dijela izvornog slijeda koji ne zadovoljava minimalni kriterij kvalitete ili sadrži adaptorski slijed, dodan tijekom pripreme amplikona ili knjižnica. Potom je kvaliteta datoteka FASTQ procijenjena korištenjem programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Kvaliteta datoteka bila je zadovoljavajuća, osim povećanog broja duplikata u nekim uzorcima, zbog visoke zastupljenosti kontrola ERCC dodanih prije pripreme amplikona. Jedan uzorak je zbog prezastupljenosti sljedova ERCC uklonjen iz analize, a preostalih 14 sadržavalo je dovoljan broj (~5-15 milijuna) očitavanja za daljnju analizu. Slijedeći korak, poravnavanje RNA očitavanja na referentni genom (prema engl. *sequence alignment*), proveden je pomoću programa HISAT2 (309). Program Samtools (310) korišten je za pretvorbu datoteka SAM u datoteke BAM, te spajanje datoteka BAM istog uzoraka te njihovo i indeksiranje. Ukupna stopa poravnavanja (engl. *overall alignment rate*) bila je oko 90%, što je zadovoljavajuće, a kvaliteta poravnavanja dodatno je procijenjena pomoću programa RSeQC (311) i picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). U slijedećem koraku, pomoću programa StringTie

(312) izbrojeni su očitani sljedovi koji se nalaze na istom genu, te je tako dobivena matrica brojeva očitavanja za svaki gen (prema engl. *count matrix*), koja je pomoću paketa egdeR (313) u programu R normalizirana koristeći algoritam TMM (prema engl. *trimmed mean of M values*) (314). Za analizu su korišteni geni sa ukupnim zbrojem očitavanja u svim uzorcima većim od 50. Normalizirani podateci dalje su analizirani u programu R standardnim postupcima za analizu sličnosti uzoraka koji su opisani kod analize genskih čipova, a analiza razlika u genskom izražaju provedena je pomoću algoritma limma voom (315). Različito izraženim genima smatrani su geni sa apsolutnom vrijednošću omjera promjene (FC, prema engl. *fold change*)  $>1,5$ , te razinom značajnosti  $p < 0,05$  nakon prilagodbe p vrijednosti za višestruko testiranje postupkom Benjamini-Hochberg, te su grafički prikazani korištenjem prikaza  $-\log_{10}p$  u odnosu  $\log_2FC$  (prema engl. *volcano plot*) te toplinske mape, na način opisan kod analize genskih čipova. Analiza zastupljenosti genskih setova (GSEA, prema engl. *gene set enrichment analysis*) (316) provedena je pomoću gseGO funkcije clusterProfiler paketa u programu R. Za analizu GSEA svi geni sa ukupnim zbrojem očitavanja u svim uzorcima većim od 50 za pojedinačnu usporedbu dviju skupina poredani su na način da su geni svrstani u listu prema logaritmu ( $\log_{10}$ ) prilagođene p vrijednosti (Benjamini-Hochberg), gdje je negativni predznak dodijeljen genima s negativnim a pozitivan genima s pozitivnim omjerom promijene, tako da se geni s najvećim brojem nalaze na vrhu a oni s najmanjim na dnu liste. GSEA određuje nalaze li se geni određene skupine bliže vrhu ili dnu liste, te izračunava ukupnu zastupljenost normaliziranu na broj gena u skupini (NES, prema engl. *normalized enrichment score*), koja odražava zastupljenost na vrhu (pozitivan NES) ili dnu (negativan NES) liste gena. Procijenjena je zastupljenost javno dostupnih genskih skupina (genskih skupina bioloških procesa, genskih skupina staničnih komponenata te genskih skupina molekularne funkcije). Statistički značajno zastupljene skupine gena smatraju se one kojima je  $p < 0,05$ , uz prilagodbu za višestruko testiranje prema Benjamini-Hochbergu).

#### **4.11. Analiza genskog izražaja postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu**

Pomoću metode qPCR u trećoj fazi istraživanja određen je izražaj gena, s ciljem potvrde rezultata dobivenih analizom genskih čipova te procijenio izražaj odabranih gena tijekom artritisa, a u četvrtoj fazi istraživanja radi potvrde utišavanja gena pomoću siRNA. Za potvrdu rezultata genskog čipa uzorci izdvojenih mijeloidnih stanica pripremljeni su na ranije

opisani način. Korišteni su uzorci izdvojenih stanica pojedinačnih miševa, uzorci združenih stanica 4 miša iz iste pokusne skupine, te tkivni ekstrakti koljena pojedinačnih miševa. Za izolaciju RNA iz tkiva, koljeni zglobovi su izolirani presijecanjem tibijalnih i femoralnih epifiznih ploča, te je nakon uklanjanja mišićnog tkiva koljeno odmah stavljeno u 1ml reagensa TRIzol te usitnjeno pomoću homogenizatora za tvrda tkiva (IKA-Werke, Staufen, Njemačka), a uzorci pohranjeni na -20 °C do izolacije RNA. Izolacija te mjerenje koncentracije RNA provedeni su na ranije opisani način, a potom je 1µg RNA prepisan je u cDNA pomoću seta kemikalija High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). RNA otopljena u vodi inkubirana je s 50 U enzima reverzne transkriptaze (MultiScribe™ MuLV, Applied Biosystems), 10 U inhibitora RNaze (RNase Inhibitor, Applied Biosystems), puferom RT, nasumičnim početnicama te mješavinom deoksiribonukleotida u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) sat vremena na temperaturi od 37 °C, a nakon toga se reakcija zaustavlja zagrijavanjem na 95 °C. Za uzorke s malom količinom RNA korišten je set kemikalija CellAmp™ Whole Transcriptome Amplification Kit (Real Time) Ver.2 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) kojim se nakon RT reakcije umnaža cDNA produkt. Set kemikalija je u nekim slučajevima korišten na već izoliranoj RNA, a pošto sadrži i pufer za lizu stanica može se koristiti i odmah nakon izdvajanja stanica. Izražaj gena je procijenjen postupkom qPCR pomoću uređaja 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Analiziran je izražaj gena *Mid1*, *Erdr1*, *Thbs1*, *IL-1β*, *IL-6* i *TNF-a*. Za analizu izražaja gena *Erdr1*, *Thbs1*, *IL-1β*, *IL-6* i *TNF-a* te endogenih kontrolnih gena *GAPDH* i *β-actin* korišteni su komercijalno dostupni setovi kemikalija TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) (*Erdr1*, Mm04214945\_uH; *m1*; *Thbs1*, Mm00449018\_m1; *IL-1β*, Mm00434228\_m1; *IL-6*, Mm00446190\_m1; *TNF-a*, Mm00443258\_m1; *GAPDH*, Mm99999915\_g1; *β-actin*, Mm00607939\_s1) te TaqMan Gene Expression Master mix (Applied Biosystems). TaqMan Gene Expression Master mix sadrži DNA polimerazu (AmpliAq Gold™ DNA Polymerase, Applied Biosystems), uracil-N glikozilazu za uklanjanje eventualno prisutnih PCR produkata koji bih mogli kontaminirati reakciju, te referentnu boju ROX™, unutarnju kontrolu za normalizaciju signala. TaqMan® Gene Expression Assay sadrži početnice i probu specifične za mjereni gen. Proba je obilježena sa fluorescentnom bojom FaM™ na 5' kraju te prigušivačem fluorescencije (NFQ, prema engl. *nonfluorescent quencher*) na 3' kraju. DNA polimeraza iz mješavine TaqMan Gene Expression Master mix prema predlošku cDNA izgrađuje novi lanac nukleotida počevši od mjesta vezanja početnica. Dolazeći do probe, polimeraza cijepa probu te udaljuje boju FAM od prigušivača, što izaziva fluorescentni signal. qPCR reakcija provedena je u pločici



sa 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate; Applied Biosystems), u ukupnom volumenu od 25,5  $\mu$ l (1  $\mu$ l cDNA, 1,25  $\mu$ l TaqMan® Gene Expression Assay, 12,5  $\mu$ l TaqMan Gene Expression Master mix, 11,75  $\mu$ l H<sub>2</sub>O). Reakcija započinje inkubacijom 2 minute na 50 °C, da bi se aktivirala uracil-N glikozilaza, a potom inkubacijom 10 minuta na 95 °C, tijekom koje se inaktivira uracil-N glikozilaza te aktivira DNA polimeraza. Slijedi 45 ciklusa naizmjenične inkubacije na 95 °C 15 sekundi, pri čemu dolazi do denaturacije DNA, te 60 °C tijekom 60 sekundi, kada se vežu početnice te stvara komplementarni DNA lanac. Za analizu izražaja gena *Mid1* korišten je set početnica (sense 5'-CACTCGCTGAAGGAAAATGACCA-3', antisense 5'-AATCAAAGGCAAAAAGTGTCAAA-3') (Applied Biosystems™ Sequence Detection Primer, Applied Biosystems), preuzet od Collison i sur. (317), te komercijalno dostupna mješavina SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Uz DNA polimerazu mješavina sadrži boju SYBR® Green koja fluorescira nakon vezanja dvolančanih molekula DNA. Reakcija je provedena u pločici s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate), a ukupni volumen reakcije je 25,5  $\mu$ l, od čega je 1  $\mu$ l cDNA, 0,5 $\mu$ l (200 nM) sense i antisense početnica, 12,5  $\mu$ l SYBR™ Green PCR Master Mix te ostatak voda. Reakcija započinje inkubacijom tijekom 2 minute na 50 °C te 10 minuta na 95 °C, a potom slijedi 45 ciklusa naizmjenične inkubacije na 95 °C 15 sekundi, te 60 °C 60 sekundi. Zbog nespecifičnog vezanja SYBR® Green boje za dvolančanu DNA, PCR produkti su nakon zadnjeg ciklusa razdvojeni zagrijavanjem sa 60 °C na 95 °C brzinom 0,03 °C/s, da bi se potvrdilo da temperatura tališta ( $T_m$ , prema engl. *melting temperature*) odgovara specifičnom proizvodu umnažanja. Izmjereni intenzitet fluorescencije u reakciji qPCR proporcionalan je količini umnoženih fragmenata. Odabran je prag vrijednosti fluorescencije pri kojem je izmjeren fluorescentni signal veći od pozadinskog signala. Potomje za svaki uzorak određen broj ciklusa potreban za postizanje određene razine fluorescencije, što nazivamo kritični broj ciklusa (CT, prema engl. *cycle threshold*). Relativna količina RNA u uzorku izračunata je pomoću standardne krivulje, prikazane u koordinatnom sustavu u kojem su logaritmi količine cDNA prikazani na apscisi, a vrijednosti Ct na ordinati, a napravljena je pomoću pet serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzoraka analiziranih stanica, odnosno tkiva. Relativna količina RNA u uzorku izražena je u odnosu na količinu RNA endogenih kontrolnih gena,  $\beta$ -aktin i GAPDH.

#### 4.12. *In situ* hibridizacija RNA

Metoda *in situ* hibridizacije RNA (ISH, prema engl. *in situ hybridization*) omogućava lokalizaciju te procjenu količine određene molekule mRNA u tkivu vezanjem posebno dizajniranih proba. ISH RNA korištena je u svrhu potvrde razlika u izražaju gena *Mid1* između miševa WT i Fas  $-/-$  s artritisa te neimuniziranih miševa, te određivanja lokalizacije izražaja *Mid1* gena u koljenom zglobovima. S obzirom da su vrijednosti izražaja gena *Mid1* bile najveće u ranoj fazi artritisa, za ovu vrstu analize pokusne životinje su žrtvovane na treći dan nakon izazivanja artritisa. Analiza je provedena na frontalnim histološkim rezovima koljena, pripremljenih postupcima opisanim za histološku i histomorfometrijsku analizu. ISH RNA provedena je korištenjem seta kemikalija RNAscope® (318), pećnice ACD HybEZ™ II Hybridization System (220v) te sustava za pranje i inkubaciju preparata ACD EZ-Batch Slide System (Advanced Cell Diagnostics, Inc., Bio-Techne, Minneapolis, MN, SAD), prema uputama proizvođača. Dan prije početka postupka preparati se 2 sata zagrijavaju na vrućoj ploči temperature 60 °C, da bi se fiksirali za predmetno staklo i izbjegli njihovo otpadanje tijekom višestrukih ispiranja i obrade kemikalijama. Preparati su deparafinizirani, a potom je u blokirana aktivnost endogenih peroksidaza tretiranjem vodikovim peroksidom (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi te su preparati isprani dva puta u dH<sub>2</sub>O. Blokiranje endogenih peroksidaza priječi stvaranje nespecifičnog signala oksidacijom kromogena DAB (3,3'-diaminobenzidin). Razotkrivanje ciljnih molekula postignuto je kuhanjem preparata tijekom 15 minuta u citratnom puferu (RNAscope® 1X Target Retrieval Reagent) na 98-102 °C. Potom su preparati isprani u destiliranoj vodi pa u 100% alkoholu i osušeni na sobnoj temperaturi. Oko rezova je pomoću hidrofobne olovke Immedge™ iscrtano polje veličine 2x2 cm da se priječi prelijevanje kemikalija. Rezovi su potom tretirani proteazama (RNAscope® Protease Plus), tijekom 30 minuta na 40 °C u pećnici ACD HybEZ™ II Hybridization System (220v) i tako je zapriječeno umrežavanje bjelančevina uzrokovano fiksacijom. Nakon ispiranja destiliranom vodom, hibridizirane su probe te amplificiran signal. Ukratko, preparati su inkubirani s probama nakon čega je uzastopno dodano 6 otopina s kemikalijama za amplifikaciju signala (RNAscope® 2.5 AMP 1, 2, 3, 4, 5-BROWN, 6-BROWN). Između inkubacija preparati su isprani puferom za ispiranje (0.1× SSC, 0.03% litij dodecil sulfat, RNAscope® Wash Buffer). Probe te prve četiri kemikalije za amplifikaciju signala inkubirane su na 40 °C u pećnici ACD HybEZ™ II Hybridization System (220v) tijekom 2 sata, 30 minuta, 15 minuta, 30 minuta te 15 minuta. Zadnje dvije kemikalije za amplifikaciju signala inkubirane su na sobnoj temperaturi tijekom

40 te 15 minuta. Osim probe za gen *Mid1* (RNAscope® Probe - Mm-Mid1) korištene su pozitivna kontrolna proba (RNAscope® Positive Control Probe - Mm-Polr2a) za konstitutivno izraženi gen niskog izražaja usporedivog s genom *Mid1*, te negativna kontrolna proba (RNAscope® Negative Control Probe – DapB) koja prepoznaje bakterijski gen za DapB, a koristi se za procjenu pozadinskog signala. Probe za pojedinačni gen mješavine su različitih proba sastavljenih od regije s 18-25 baza komplementarne ciljnoj molekuli mRNA, razdjelne (engl. *spacer*) sekvence te repne sekvence s 14 baza. Po dvije probe vežu se za susjedne regije na mRNA molekuli, što uzrokuje približavanje repnih sekvenca koje zajedno stvaraju veznu sekvencu od 28 baza koju potom hibridiziraju molekule za amplifikaciju signala. Time se smanjuje mogućnost nespecifične hibridizacije i lažno pozitivnog signala. Svaka amplifikacijska molekula ima više veznih mjesta za slijedeću amplifikacijsku molekulu te se tako povećava intenzitet signala. Zadnja se hibridizira proba na koju je konjugirana peroksidaza hrena (HRP, prema engl. *horseradish peroxidase*). U završnom koraku preparati se tretiraju otopinom DAB tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dodan u otopinu DAB neposredno prije uporabe oksidira DAB, a reakcija je katalizirana enzimom HRP. Oksidirani DAB stvara smeđi precipitat vidljiv svjetlosnim mikroskopom. Jezgre su obojene hematoksilinom, a preparati su potom dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola i ksilenu te pokriveni pokrovnim stakalcem. Analiza je provedena pomoću mikroskopa Axio Imager (Carl Zeiss Microimaging Inc.).

#### **4.13. Izolacija bjelančevina i western blot analiza**

Postupkom *western blot* u tkivnim ekstraktima koljena je procijenjena relativna količina bjelančevine *Mid1* te katalitičke podjedinice PP2A (PP2Ac). Za izolaciju bjelančevina iz tkivnih ekstrakata koljena su uzeta postupkom opisanim za izolaciju RNA, te stavljena u 600 µl pufera za lizu stanica (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, SAD) obogaćenog inhibitorima proteaza (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific) i fosfataza (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific) u razrijeđenu 1:100. Tkivo koljena je potom usitnjeno pomoću homogenizatora (IKA-Werke) i lizirano pomoću uređaja Branson Sonifier 150 (Emerson Electric, St. Louis, MO, SAD). Stanični lizati su centrifugirani na 14000 g tijekom 10 minuta na 4 °C, a potom su supernatanti prebačeni u novu epruvetu. Koncentracija bjelančevina u uzorku je određena kolorimetrijski, pomoću seta kemikalija Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

U volumen uzoraka koji sadrži 35 µg bjelančevina je dodano 5 µl pufera za uzorke NuPAGE® LDS sample buffer (Thermo Fisher Scientific) te 2,5 µl reducirajućeg agensa NuPAGE® Sample reducing agent (Thermo Fisher Scientific). Bjelančevine su potom denaturirane tijekom 5 minuta na 95°C. Za razdvajanje bjelančevina SDS-poliakrilamidnom elektorforezom su miješanjem kemikalija iz seta TGX Stain-Free™ FastCast Acrylamide Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD) te 10% amonij persulfata (APS) i 8 µl tetrametiletilendiamina (TEMED) pripremljeni 4% gornji (prema engl. *stacking gel*) i 12% donji gel (prema engl. *running gel*), te izliveni u kalup za pripremu gelova (Bolt™ Empty Mini Gel Cassettes, Thermo Fisher Scientific) u kojoj su polimerizirani tijekom 30 minuta. U gornji gel je prije polimerizacije stavljen češljic za formiranje jažica. Polimerizirani gel je potom postavljen u sustav za elektorforezu (Mini Gel Tank and Blot Module Set, Thermo Fisher Scientific) napunjen puferom za elektorezu (0,025 M Tris baza, 0,15 M glicin i 0,1% SDS). U pojedinačnu jažicu je dodano po 30 µl uzoraka u puferu za uzorke. U jednu jažicu dodano je 4 µl biljega koji za određivanje veličine bjelančevina PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Elektroforeza je provedena tijekom 1h na 120V, a potom su gelovi pažljivo izvađeni iz kalupa za pripremu. Uklonjen je gornji gel, a ostatak gela je aktiviran 5 minutnim izlaganjem UV svjetlu u uređaju ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories). Gelovi pripremljeni setom kemikalija TGX Stain-Free™ sadrže trihalo spojeve koji se vežu za triptofan u bjelančevinama i pri izloženosti UV svjetlu emitiraju fluorescentni signal. Nakon aktivacije bjelančevine iz gela se prenose na PVDF membranu prethodno aktiviranu 1 minutu u metanolu i ispranu destiliranom vodom. Zbog kovalentnog vezanja, trihalo spojevi se također prenose na membranu. Prijenos se provodi tijekom 1h na 30V pomoću sustava za prijenos Mini Gel Tank and Blot Module Set (Thermo Fisher Scientific) ispunjenog puferom za prijenos (0,02 M Tris, 0,14 M glicin i 20% methanol). Ukupna količina bjelančevina u uzorku odredi se kratkim izlaganjem UV svjetlu u uređaju ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories), i potom koristi za normalizaciju količine ispitivane bjelančevine. Membrane su prvo inkubirane u puferu za blokiranje nespecifičnih interakcija (5% mlijeko u prahu u fiziološke otopine puferirane Tris-om ili fosfatom sa 0,01% Tween-20 (TBST, za detekciju PP2AC; PBST, za detekciju Mid1) 1h na sobnoj temperaturi. Potom su preko noći inkubirane s primarnim protutijelom razrijeđenim 1:1000 (zečje protu-PP2AC, Cell Signaling Technology) ili 1:500 (zečje protu-Mid1, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) u istoj otopini na 4°C. Nakon ispiranja u puferu TBST membrane su sljedeći dan inkubirane sa sekundarnim protu-zečjim protutijelom (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, SAD) na kojeg je konjugiran enzim HRP, u razrjeđenju

1:50000 u otopini korištenoj za blokiranje kroz 1h na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, vezanje protutijela je vizualizirano kemiluminiscencijom pomoću seta kemikalija SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher) u uređaju ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories). Intenzitet signala izmjeren je u programu Image Lab Software (Bio-Rad Laboratories) i normaliziran prema intenzitetu signala ukupnih bjelančevina na membrani.

#### 4.14. *In vivo* primjena siRNA

U svrhu procjene učinka inhibicije izražaja *Mid1* u miševa divljeg tipa s resorptivnim artritismom na tijek artritisa potaknutog antigenom, koristili smo molekule siRNA, duljine 20-25 parova baza, koje vezivanjem na molekulu mRNA ciljnog gena nakon transkripcije posreduju njenu razgradnju i tako utišavaju translaciju. Komercijalno dostupan set oligonukleotida za utišavanje gena *Mid1* te kontrolna siRNA koja nema učinak na izražaj gena *Mid1* (In Vivo Ready siRNA, Ambion®, Life Technologies, ThermoFisher) primijenjene su pomoću sustava za primjenu *in vivo* (In Vivo-jetPEI, PolyPlus Transfection, Illkirch-Graffenstaden, Francuska), u kojem se nalazi polietilenimin (PEI), linearni kationski polimer, koji sa siRNA putem elektrostatskih interakcija stvara pozitivno nabijene komplekse, i interakcijom s molekulama stanične membrane pomaže ulaz siRNA u stanicu endocitozom (319). U endosomu, PEI sprječava razgradnju siRNA, a istovremeno puferira nizak endosomalni pH, što uvjetuje porast osmotskog tlaka, pucanje endosoma i ulaz siRNA u citoplazmu (320). Svojstva komercijalno dostupne kemikalije *in-vivo* jet-PEI i siRNA te stvaranje kompleksa u plazmi sprječavaju imunosni odgovor na molekule dvolančane RNA (dsRNA, prema engl. *double stranded RNA*). Otopina za injiciranje, koja sadržava siRNA i jetPEI, pripravljena je prema uputama proizvođača *in vivo* jet-PEI. Ukratko, određen je volumen u kojem će siRNA biti injicirana, nakon čega je prema njemu određena maksimalna količina siRNA koja se može koristiti u injekciji, 0,5 µg/µl volumena injekcije. Prema količini siRNA u injekciji te omjeru NP određen je volumen jet-PEI u injekciji. Omjer NP predstavlja omjer pozitivno nabijenih amina PEI (N) te negativno nabijenih fosfatnih skupina (P) siRNA, a vrijednost 6 je najniži preporučeni omjer pri kojemu su kompleksi jet-PEI i siRNA još uvijek pozitivno nabijeni. U pola ukupnog injekcijskog volumena u 5% otopini glukoze je otopljen određena količina siRNA, a u drugoj polovici je u istoj otopini pripremljen jet-PEI. Otopine su potom združene te su nakon pažljivog miješanja inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi da bi se stvorili pozitivno nabijeni kompleksi, a tako

pripremljeni kompleksi mogu se pohraniti na do 7 dana na 4 °C. Proveden je set pokusa u kojima je siRNA primijenjena i.a. te pokus u kojem je siRNA primijenjena i.v.. Korišteni su miševi divljeg tipa u dobi od 12 tjedana, kojima je AIA izazvan na već opisani način. Intra-artikularno je siRNA primijenjena 1. i 2. dan nakon izazivanja artritisa (i.a. injekcije mBSA), odnosno 22. i 23. dan nakon primarne imunizacije. U koljeno je injicirano je 0,75 nmol (10 µg) siRNA i 1,2 µl jet-PEI u konačnom volumenu od 20 µl 5% otopine glukoze, a miševi su pritom podvrgnuti inhalacijskoj anesteziji s 2% izofluranom. S obzirom na jasno povećanje izražaja gena *Mid1* rano u tijeku artritisa te da se izbjegne oštećenje zgloba brojnim i.a. injekcijama, miševi su u ovome pokusu žrtvovani 3. dan artritisa (24. dan nakon primarne imunizacije), kad je artritis procijenjen inspekcijom i mjerenjem promjera koljena, a izolirana je i RNA iz koljena, za određivanje izražaja gena *Mid1*, *IL-1β* i *TNF-α*. U ovome setu pokusa pokusne skupine su miševi s artritism kojima je *Mid1* siRNA injicirana s jet-PEI, miševi s artritism kojima je injicirana samo *Mid1* siRNA, te miševi s artritism kojima je injicirana kontrolna siRNA. U setu pokusa gdje je siRNA primijenjena i.v., miševi su injicirani siRNA na dan indukcije artritisa (i.a. injekcije mBSA), te dva dana poslije toga, odnosno 21. i 23. dan nakon primarne imunizacije. Injicirano je 3,7 nmol (50 µg) siRNA i 6 µl jet-PEI u konačnom volumenu od 200 µl 5% otopine glukoze. Miševi su u žrtvovani 3. dan artritisa (24. dan nakon primarne imunizacije), kad je artritis procijenjen inspekcijom i mjerenjem promjera koljena, a izolirana je i RNA iz koljena, za određivanje izražaja gena *Mid1* te RNA iz pluća i jetre za procjenu sustavnog utišavanja gena *Mid1*. U ovome setu pokusa pokusne skupine su miševi s artritism kojima je *Mid1* siRNA injicirana s jet-PEI i miševi s artritism kojima je injicirana kontrolna siRNA s jet-PEI.

#### **4.15. *In vivo* primjena metformina**

Metformin (1,1-dimetilbigvanid hidroklorid, Sigma-Aldrich) sprječava vezanje *Mid1* bjelančevine na njegovu ciljnu bjelančevinu, enzim PP2A (290). *Mid1* potiče njezinu razgradnju zbog čega dolazi do posrednog pojačanja signalizacije proupalnih citokina. Stoga smo pro-upalno djelovanje *Mid1* bjelančevine u miševima divljeg tipa s resorptivnim artritism pokušali blokirati oralnom primjenom metformina. U pokusima su korišteni miševi divljeg tipa kojima je AIA izazvan na ranije opisan način. Pokusne skupine su: neimunizirani miševi (NI), miševi s artritism (AIA), ta miševi s artritism tretirani metforminom (AIA+metformin). Metformin je primijenjen u dozi od 1g/kg pomoću gastrične sonde, u 200

μl vode, svakih 24 sata počevši dan poslije primarne imunizacije do žrtvovanja 10. dana artritisa (31. dan nakon primarne imunizacije). Kontrolnoj skupini miševa je tijekom imunizacijskog i induksijskog protokola pomoću gastične sonde primijenjena voda. Intenzitet artritisa procijenjen je inspekcijom i mjerenjem promjera koljena na dan žrtvovanja te histološki. Učinak metformina na lokalno koštano razaranje procijenjen je analizom distalnih femoralnih epifiza pomoću μ-CT. Izražaj gena *Mid1* te gena za proupalne citokine IL-1β i TNF-α procijenjen je pomoću qPCR, a protočnom citometrijom su analizirani udjeli mijeloidnih i limfoidnih staničnih populacija u sinoviji, koristeći kombinaciju I protutijela (Tablica 2).

#### 4.16. Stanična kultura

Kultura mišjih stanica koštane srži korištena je za procjenu učinka inhibicije međudjelovanja *Mid1* i PP2A *in vitro* na izražaj proupalnih citokina potaknut aktivacijom receptora TLR2. TLR2 je aktiviran pomoću bakterije *Mycobacterium tuberculosis* inaktivirane visokom temperaturom, koja je kao dio CFA korištena u izazivanju artritisa, a prethodno su stanice inkubirane tijekom 1h na 37 °C s metforminom (1,1-dimetilbigvanid hidroklorid, Sigma-Aldrich) ili peptidom GSK'364A (Cambridge Research Biochemicals, Billingham, UK). Metformin priječi vezanje bjelančevine *Mid1* za PP2A (290) i time njenu proteasomsku razgradnju, za koju je ključno vezanje *Mid1* na regulacijsku podjedinicu PP2A, α4 (IGBP1, prema engl. *immunoglobulin-binding protein 1*) (321). Peptid GSK'364A je slijed 29 aminokiselina (249–277) bjelančevine α4, (AQAKVFGAGYPSLPTMTVSDWYEQHRKYG) (291), koji prepoznaje vezno mjesto za α4 na bjelančevini *Mid1* te tako kompetitivno onemogućuje njeno vezanje na autologni α4 čime priječi razgradnju PP2A. Na peptid je tijekom sinteze dodan N terminalni slijed bazične domene (49–58) bjelančevine transaktivatora transkripcije (Tat, prema engl. *trans-activator of transcription*) virusa humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) (RKKRRQRRR), koji omogućuje ulaz peptida u citoplazmu stanice (322). Sintetizirani peptid je pročišćen pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC, prema engl. *high-performance liquid chromatography*). Nakon primjene peptida GSK'364A očekuje se povećana razina i aktivnost PP2A, a s ciljem procjene specifičnosti ovog djelovanja set zdenaca je uz GSK'364A tretiran i inhibitorom aktivnosti PP2A, LB-100 (Selleck Chemicals, Huston, TX, SAD).

Suspencija stanica koštane srži pripravljena je ispuhivanjem koštane srži iz bedrene i goljenične kosti miševa divljeg tipa minimalnim esencijalnim medijem  $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM, prema engl.  *$\alpha$ -minimal essential medium*) (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Njemačka) pomoću igle provrta 23G. Stanice su potom izbrojene u Bürker-Türkovoju komorici korištenjem 0,05% tripankog plavila za isključenje mrtvih stanica. Stanice su zasijane u pločici sa 96 zdenaca u gustoći  $10^6$  živih stanica/mL medija  $\alpha$ -MEM obogaćenog s 10% FBS (Gibco™, Thermo Fisher), 100 U/mL penicilina (Gibco™, Thermo Fisher) i 100 U/mL streptomicina (Gibco™, Thermo Fisher). Stanice su prvo tretirane s 20 mM metformina ili 20  $\mu$ M peptida GSK'364A ili 20  $\mu$ M peptida GSK'364A u kombinaciji sa 2,5  $\mu$ M LB-100 tijekom 1h na 37 °C uz 5% CO<sub>2</sub>, a potom su upalno potaknute dodavanjem 2  $\mu$ g/mL bakterije *Mycobacterium tuberculosis* inaktivirane visokom temperaturom (BD™ Difco™, Thermo Fischer Scientific). Stanice su inkubirane preko noći na 37 °C uz 5% CO<sub>2</sub>, nakon čega je za analizu uzet sadržaj cijeloga zdenca. Stanice su centrifugiranjem spuštene na dno epruvete i resuspendirane u 1 mL reagensa TRIzol (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), te je potom izolirana i obrnuto prepisana RNA i procijenjen izražaj gena za IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  postupkom qPCR. U svakoj različito tretiranoj pokusnoj skupini analizirana su četiri uzorka, a jedan uzorak dobiven je združivanjem stanica dvaju zdenaca.

#### 4.17. Statistička analiza

U rezultatima je prikazan reprezentativni pokus, a u legendi slika naveden je broj ponavljanja pokusa. Ukupan broj životinja korištenih u pojedinačnim pokusima izračunat je prema snazi studije (80%) te odabranoj razini statističke značajnosti, na temelju dosadašnjih pokusa u našem laboratoriju, koristeći program G\*power (292), i naveden je u opisima slika.

Raspodjela podataka provjerena je pomoću Kolmogorov–Smirnovljevog testa. Normalno raspodijeljeni podaci su grafički prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD, dok su podatci koji ne slijede normalnu raspodjelu prikazani kao medijan  $\pm$  interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*). Statistička analiza razlika između WT i Fas  $-/-$  skupina s artritismom (AIA) i kontrolnih (ctrl) ili neimuniziranih (NI) skupina provedena je dvosmjernom analizom varijance (two-way ANOVA, prema engl. *two-way analysis of variance*), kojom je procijenjen utjecaj dviju neovisnih kategoričkih varijabli, genotipa i artritisa, na mjereni parametar od interesa. Rezultati ove vrste analize izraženi su kroz tri p vrijednosti: p(g), značajnost utjecaja genotipa na promatrani parametar, p(a), značajnost utjecaja artritisa na



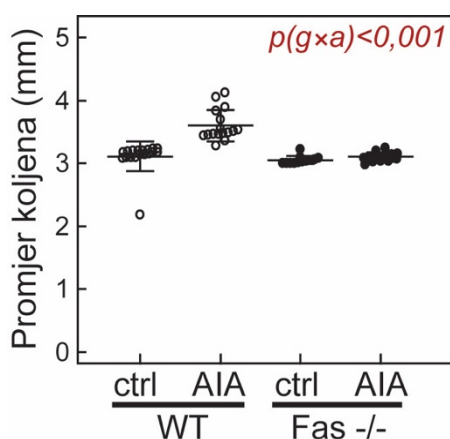
promatrani parametar, te  $p(g \times a)$ , značajnost međudjelovanja genotipa i artritisa, koja određuje odgovaraju li miševi različitog genotipa drugačije na artritis. Za uspoređivanje triju neovisnih skupina homogenih varijanci s normalnom raspodjelom podataka primijenjena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA, prema engl. *analysis of variance*) uz Tukey-Kramer post hoc test, odnosno Kruskal-Wallis za podatke koji nisu normalno raspodjeljeni ili varijance skupina nisu homogene. Homogenost varijanci uspoređivanih pokusnih skupina određena je primjenom Levenovog testa. Za analizu povezanosti primijenjena je korelacija ranga i izračunat je Spearmanov koeficijent  $\rho$ . Razina značajnosti statističkih testova postavljena je na  $p < 0,05$ . Pri analizi izražaja gena metodom qPCR, biološki značajnom razlikom smatra se razlika minimalno 100%, jer su prethodna istraživanja pokazala da je to najmanja razlika u izražaju koja se može ponavljano izmjeriti (323). Statistička analiza provedena je koristeći program MedCalc (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija).

Bioinformatička analiza genskih čipova te primijenjeni statistički testovi opisani su u poglavlju o analizi genskog izražaja pomoću genskih čipova.

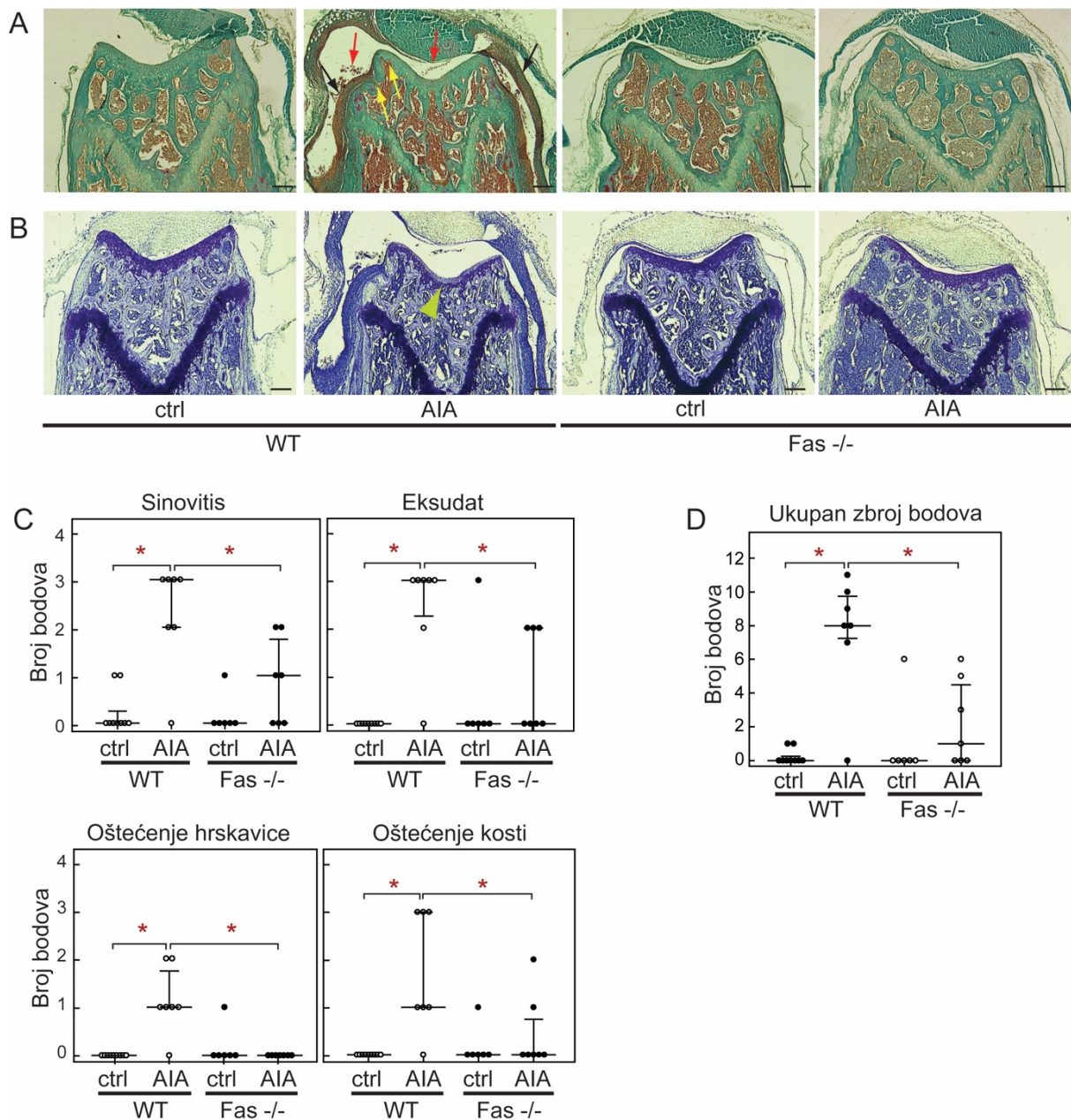
## 5. Rezultati

### 5.1. Klinička i histološka procjena artritisa u miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas

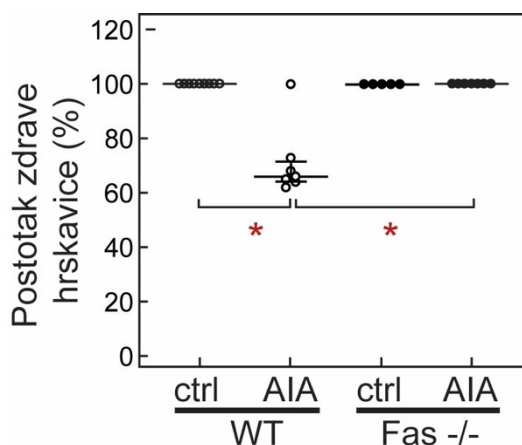
Artritis je procijenjen pri žrtvovanju, 10. dan poslije i.a. injekcije i to klinički i mjerenjem promjera koljena, te histološki, na frontalnim rezovima koljena. Promjer koljena bio je značajno veći u skupini miševa WT s artritismom ( $3,60 \pm 2,45$  mm) u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $3,11 \pm 0,23$  mm), dok je u miševa Fas  $-/-$  promjer koljena bio podjednak u obje skupine ( $3,01 \pm 0,06$  mm u ctrl,  $3,10 \pm 0,07$  mm u AIA,  $p(g \times a) < 0,001$ , two way-ANOVA, Slika 8). Na frontalnim rezovima koljena obojenima postupkom Goldner Masson trikrom procijenjivan je sinovitis, zglobni eksudat te koštano oštećenje (Slika 9A), a na rezovima obojenim toluidinskim plavilom, procijenjeno je stanje zglobne hrskavice (Slika 9B). Broj bodova određen je prema ljestvici prikazanoj u Tablici 1. Deseti dan artritisa ukupni zbroj bodova bilo je značajno veći u skupini miševa WT s artritismom ( $8[7,25-9,75]$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa WT ( $0[0-0,25]$ ), a broj bodova miševa Fas  $-/-$  s artritismom ( $1[0-4,5]$ ) nije se značajno razlikovao od broja bodova kontrolne skupine miševa Fas  $-/-$  ( $0[0-0]$ , Kruskal-Wallis test, Slika 9D). Pri analizi pojedinačnih elementa, primijećen je sporadični blaži sinovitis i zglobni eksudat u miševa Fas  $-/-$  s AIA, s iznimno rijetkim zahvaćanjem kosti i hrskavice (Slika 9C). Postotak zdrave hrskavice bio je značajno manji u miševa WT s artritismom ( $66[64,25-71,75]\%$ ) u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa WT ( $100[100-100]\%$ , Kruskal-Wallis test,  $p < 0,05$ ). U miševa Fas  $-/-$  obje pokusne skupine nije uočeno hrskavično oštećenje ( $100[100-100]\%$  u ctrl i AIA, Slika 10).



**Slika 8. Klinička procjena artritisa u miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ).** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskeg albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili otopine fosfatnog pufera (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; ctrl). Pri žrtvovanju je nakon odmicanja kože promjer lijevog i desnog koljena izmjeren pomoću kalipera. Mjerenje je za svaki zglob ponovljeno tri puta, a za analizu je korištena srednja vrijednost. Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 6 miševa u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Promjer koljena je prikazan kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).  $p$  ( $g \times a$ ), razina značajnosti međudjelovanja genotipa ( $g$ ) i artritisa ( $a$ ) (dvosmjerna ANOVA).



**Slika 9. Histološka procjena artritisa u miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas<sup>-/-</sup>).** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; ctrl). Artritis je procijenjen na frontalnim rezovima koljena debljine 6  $\mu$ m obojenim postupkom (A) Goldner Masson trikrom i (B) toluidinskim plavilom. (C) Prema ljestvici prikazanoj u Tablici 1 procijenjena su 4 parametra: celularnost sinovije (sinovitis, crne strelice), eksudat u zglobnom prostoru (crvene strelice) te oštećenje zglobne hrskavice (zelena strelica) i kosti (žuta strelica). (D) Zbrajanjem bodova pojedinih parametara zglobne upale izračunat je ukupni zbroj bodova, maksimum 12. Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 6 miševa u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Rezultati bodovanja pojedinih parametara te ukupan zbroj bodova su prikazani kao medijan  $\pm$  interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*). \*  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis test, Tukey-Kramer post hoc test).



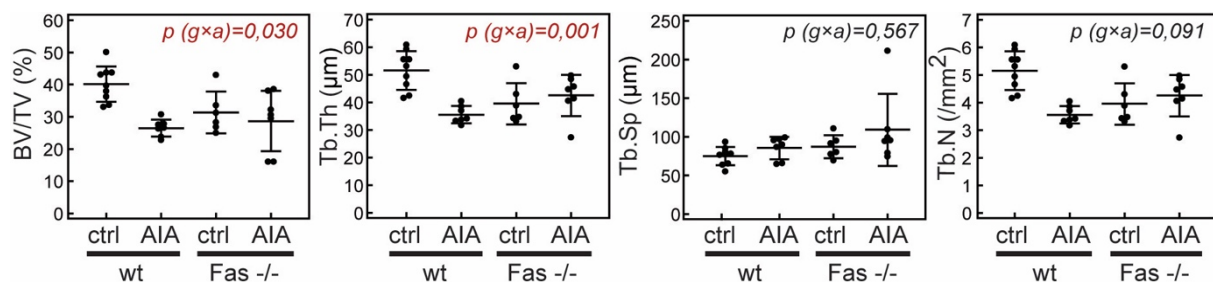
**Slika 10. Histomorfometrijska procjena oštećenja zglobne hrskavice u miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ).** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatnom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; ctrl). Debljina zglobne hrskavice izmjerena je na frontalnim rezovima koljena debljine 6  $\mu$ m obojenim toluidinskim plavilom, cijelom duljinom femoralne zglobne hrskavice, pri povećanju 200X, na 4 presjeka uzetih iz različitih dubina koljenog zgloba. Izmjerena je ukupna debljina zglobne hrskavice i debljina zdrave (intenzivno plavo obojene) hrskavice, a rezultat je izražen kao postotak zdrave hrskavice u ukupnoj debljini te prikazan kao medijan  $\pm$  interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*). Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 6 miševa u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. \*  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis test, Tukey-Kramer post hoc test).

## 5.2. Procjena subhondralnog koštanog razaranja u artritisu u miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas

Subhondralno koštano razaranje procijenjeno je 10. dan nakon i.a. injekcije mjerenjem koštanih gredica u distalnim femoralnim epifizama, pomoću  $\mu$ -CT te histomorfometrijski. Koljeni zglobovi su prvo snimljeni pomoću uređaja  $\mu$ -CT, a potom pripremljeni za histomorfometrijsku analizu, provedenu na frontalnim rezovima koljena obojenim postupkom Goldner Masson trikrom.

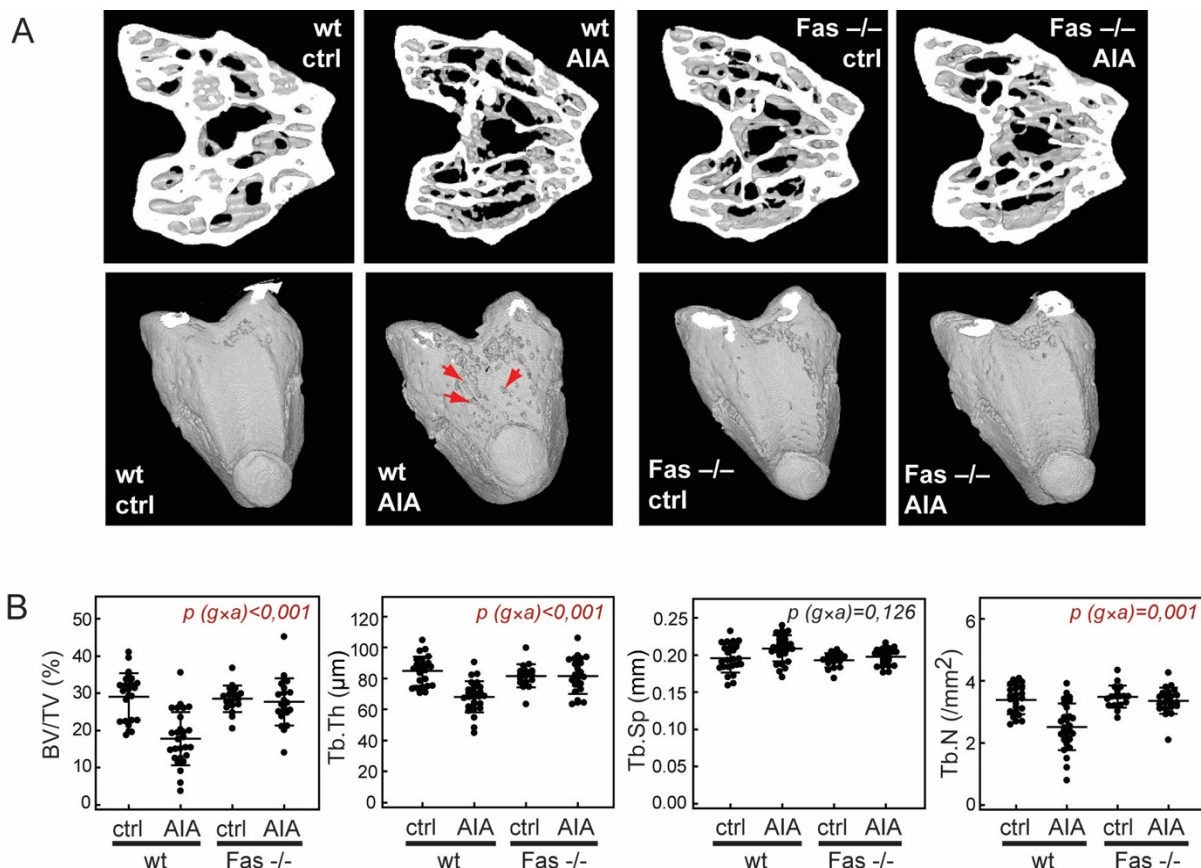
Histomorfometrijska analiza pokazala je da se udio i debljina koštanih gredica u femoralnim epifizama razlikuju u artritisu miševa WT i miševa Fas  $-/-$ . U miševa WT s artritisom, volumen ( $26,48 \pm 2,65\%$ ) i debljina gredica ( $35,56 \pm 3,17 \mu\text{m}$ ) značajno su manji odnosu na kontrolnu skupinu (BV/TV  $40,13 \pm 3,17\%$ , Tb.Th  $51,61 \pm 7 \mu\text{m}$ ), dok se u miševa Fas  $-/-$  ova dva parametra u miševa s artritisom (BV/TV  $28,71 \pm 9,32\%$ , Tb.Th  $42,54 \pm 7,52 \mu\text{m}$ ) nisu značajno promijenili u odnosu na kontrolne miševe (BV/TV  $31,31 \pm 6,48\%$ , Tb.Th  $39,51 \pm 7,55 \mu\text{m}$ ) ( $p(\text{gxa})=0,03$  za BV/TV,  $p(\text{gxa})=0,001$  za Tb.Th, two-way ANOVA, Slika 11). Razdvojenost koštanih gredica bila je podjednaka u sve četiri skupine ( $75,03 \pm 11,71 \mu\text{m}$  u WT ctrl,  $85,55 \pm 14,44 \mu\text{m}$  u WT AIA,  $85,55 \pm 14,80 \mu\text{m}$  u Fas  $-/-$  ctrl,  $109,04 \pm 46,71 \mu\text{m}$  u Fas  $-/-$  AIA). Broj gredica smanjio se s nastupom artritisa u miševa WT ( $8,36 \pm 1,06 /\text{mm}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu miševa WT bez artritisa ( $7,95 \pm 0,76 /\text{mm}$ ), a u miševa Fas  $-/-$  broj se nije značajno promijenio u artritisu ( $7,96 \pm 0,82 /\text{mm}$  u ctrl,  $6,97 \pm 1,5 /\text{mm}$  u AIA). Usprkos tome, međudjelovanje genotipa i artritisa za ovaj parametar nije doseglo statističku značajnost (Slika 11).

Analiza distalnih femoralnih epifiza postupkom  $\mu$ -CT pokazala je, sukladno rezultatima histomorfometrije, da su volumena, debljina i broj koštanih gredica različiti u artritisu miševa WT i Fas  $-/-$  ( $p(g \times a) < 0,001$  za BV/TV,  $p(g \times a) < 0,001$  za Th.Th,  $p(g \times a) = 0,001$  za Tb.N). U miševa WT s artritisom značajno je smanjen volumen, debljina i broj koštanih gredica (BV/TV  $17,8 \pm 7,16\%$ , Tb.Th  $68,2 \pm 10,12 \mu\text{m}$ , Tb.N  $2,52 \pm 0,75 /\text{mm}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu miševa WT (BV/TV  $29,04 \pm 6,41\%$ , Tb.Th  $84,89 \pm 9,46 \mu\text{m}$ , Tb.N  $3,39 \pm 0,45 /\text{mm}$ ) (Slika 12B). U miševa Fas  $-/-$  ovi se parametri ne mijenjaju u artritisu (BV/TV  $28,49 \pm 3,58\%$  u ctrl i  $27,73 \pm 6,36\%$  u AIA; Th.Th  $81,78 \pm 0,75 \mu\text{m}$  u ctrl i  $81,81 \pm 11,65 \mu\text{m}$  u AIA, Tb.N  $3,49 \pm 0,36$  u ctrl i  $3,36 \pm 0,42$  u AIA) (Slika 12B). Razdvojenost gredica bila je slična u sve četiri pokusne skupine ( $195,29 \pm 19,27 \mu\text{m}$  u WT ctrl,  $208,76 \pm 17,64 \mu\text{m}$  u WT AIA,  $193,12 \pm 9,68 \mu\text{m}$  u Fas  $-/-$  ctrl,  $197,35 \pm 11,71 \mu\text{m}$  u Fas  $-/-$  AIA) (Slika 12B). Na trodimenzionalnim prikazima dobivenim rekonstrukcijom snimki  $\mu$ -CT, u miševa WT na distalnim femoralnim epifizama prisutne su brojne koštane erozije, koje nedostaju u miševa Fas  $-/-$  s artritisom (Slika 12A).



**Slika 11. Histomorfometrijska procjena djelovanja artritisa na subhondralne koštane gredice miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ).** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; ctrl). Histomorfometrijska analiza izvršena je na frontalnim rezovima koljena debljine  $6 \mu\text{m}$  obojenim postupkom Goldner Masson trikrom, u vidnome polju dimenzija  $500 \times 500 \mu\text{m}$  smještenom u sredini epifize, pri povećanju  $100\times$ , na 4 presjeka različitih dubina koljenog zgloba. Mjereni su udio volumena (BV/TV, %), broj (Tb.N, /mm), debljina (Tb.Th,  $\mu\text{m}$ ) i razdvojenost (Tb.Sp,  $\mu\text{m}$ ) koštanih gredica. Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 6 miševa u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).  $p(g \times a)$  je p vrijednost međudjelovanja genotipa (g) i artritisa (a) (dvosmjerna ANOVA).





**Slika 12. Procjena djelovanja artritisa na subhondralne koštane gredice u miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ) pomoću mikro-kompjutorizirane tomografije ( $\mu$ -CT). Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; ctrl). Koljena su snimljena uređajem SkyScan 1076 (Bruker, Kontich, Belgija) na svakih  $0,4^\circ$  rotacije izvora, uz rezoluciju  $9\ \mu\text{m}$ , i aluminijski filter debljine  $0,5\ \text{mm}$ , napon  $50\ \text{kV}$  te jakost struje  $200\ \mu\text{A}$ . Snimke su rekonstruirane pomoću programa Nrecon (Bruker) te analizirane pomoću programa CTAn (Bruker). (A) Trodimenzionalne rekonstrukcije snimki napravljene u programu CTVox (Bruker). U miševa WT AIA vidljive su brojne koštane erozije (crvene strelice). (B) U odsječku duljine  $300\ \mu\text{m}$ , između epifizne crte i razine razdvajanja femoralnih kondila određeni su udio volumena (BV/TV, prema engl. *bone volume/total volume*, %), broj (Tb.N, prema engl. *trabecular number*, /mm), debljina (Tb.Th, prema engl. *trabecular thickness*,  $\mu\text{m}$ ) i razdvojenost (Tb.Sp, prema engl. *trabecular separation*,  $\mu\text{m}$ ) koštanih gredica. Prikazani su združeni rezultati 3 pokusa, a najmanji broj miševa u skupini je 18. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). p(gxa) je p vrijednost međudjelovanja genotipa (g) i artritisa (a) (dvosmjerna ANOVA).**

### **5.3. Fenotipska analiza staničnih populacija u zglobnom odjeljku i periartikularnoj srži miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas**

S obzirom na izražaj receptora Fas na brojnim vrstama stanica, sa svrhom utvrđivanja populacija čiji udio se značajno mijenja u artritisu miševa WT i miševa Fas  $-/-$ , protočnom citometrijom je analiziran udio limfoidnih, mijeloidnih i mezenhimalnih staničnih populacija u zglobnom odjeljku i periartikularnoj koštanoj srži miševa s artritisom i kontrolnih miševa WT i Fas  $-/-$ . Životinje su žrtvovane 10. dan artritisa, pri čemu je jedan koljeni zglob uzet za histološku analizu i  $\mu$ -CT, a drugi zglob za protočno-citometrijsku analizu udjela staničnih populacija, da se dobiju podaci o zglobnom oštećenju i udjelu staničnih populacija u iste životinje. Stanice su za protočnu citometrijsku analizu obilježene protutijelima usmjerenim na biljege limfoidnih (CD3, B220), mijeloidnih (CD11b, Gr-1, F4/80) te mezenhimalnih populacija (CD44, CD51, CD105, CD200, Sca-1, CD90,2, CD140b).

#### **5.3.1. Fenotipska analiza hematopoetskih populacija u zglobnom odjeljku miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas**

Analiza udjela hematopoetskih staničnih populacija u zglobovima pokazala je, da s nastupom artritisa dolazi do značajnog povećanja udjela granulocita CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> te mijelomonocita CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup> u miševa WT AIA (49,88±10,04% stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> i 7,35±4,09% stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>) u odnosu na skupinu WT ctrl (38,84±4,69% stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> i 2,91±0,88% stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>), a nakupljanje ovih populacija izostaje u artritisu u miševa Fas  $-/-$  (25,95±5,02% stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> u ctrl i 24,9±6,75% u AIA te 1,9±0,4 stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup> u ctrl i 2,11±0,47% u AIA,  $p(\text{gxa CD11b}^+\text{Gr-1}^+)=0,03$ ,  $p(\text{gxa CD11b}^+\text{Gr-1}^-)=0,02$ , dvosmjerna ANOVA, Slika 13B). Slično se mijenja i udio makrofaga (F4/80<sup>+</sup>) u zglobnom odjeljku (Slika 13B). U miševa WT AIA u zglobovima se povećava udio limfocita T (CD3<sup>+</sup>) u odnosu na skupinu WT ctrl (0,87±0,32% u ctrl i 2,74±2,06% u AIA), dok se u miševa Fas  $-/-$  ta populacija značajno ne mijenja u artritisu (1,29±0,64% u ctrl i 1,11±0,28% u AIA,  $p(\text{gxa})=0,03$ , dvosmjerna ANOVA, Slika 13B).

Udio limfocita B bio je manji u miševa s artritisom oba soja (Slika 13B).

### 5.3.2. Fenotipska analiza mezenhimalnih staničnih populacija u zglobnom odjeljku miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas

Obzirom na to da je to da su izražaj receptora Fas i njegova uloga u apoptozi i sazrijevanju osteoblasta opisani u brojnim istraživanjima (231-235), uz hematopoetske su analizirane i mezenhimalne stanične populacije s ciljem utvrđivanja promjena u sastavu populacija koštanih i hrskavičnih prethodnika.

Prvom kombinacijom protutijela usmjerenim na mezenhimalne biljege su unutar svih nehematopoetskih stanica, odnosno stanica negativnih na leukocitne (CD45), endotelne (CD31) i eritroidne (TER119) biljege, analizirani udjeli stanica koje izražavaju biljege CD44, CD140b i Sca-1, opisane na mezenhimalnim osteoblastnim prehodnicima (324, 325). Udio nehematopoetskih stanica (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>) nije se mijenjao u artritisu u odnosu na kontrolne skupine, niti u ovisnosti o genotipu pokusnih životinja (Slika 14B). Nadalje, udjeli stanica Sca-1<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> i CD140b<sup>+</sup> unutar nehematopoetske populacije nisu se značajno razlikovali između pokusnih skupina (Slika 14B). Iako se udio stanica CD140b<sup>+</sup> blago smanjio u miševa WT s artritisom (17,51±9,45%) u odnosu na kontrolnu skupinu WT miševa (28,67±6,23%), a to smanjenje je izostalo u miševa Fas <sup>-/-</sup> (31,03±7,49% u ctrl i 32,3±9,41% u AIA). Također, zbog velike varijabilnosti ove populacije unutar pokusnih skupina ova promjena nije bila statistički značajna (p(gxa)=0,05).

Chan i sur. (43) detaljno su karakterizirali populacije koštanih i hrskavičnih prethodnika koja je dio nehematopoetske populacije (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>) i izražava biljeg CD51. Prethodničke subpopulacije su unutar populacije CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup> dalje razdvojene na temelju različitog izražaja biljega CD200, CD90.2, CD105 i 6C3. Koristeći sličnu kombinaciju protutijela analizirali smo udio stanica CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> (dalje u tekstu CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup>) čiji fenotip odgovara matičnim stanicama koštanog sustava (mSSC, prema engl. *murine skeletal stem cell*), odnosno najnezrelijim prethodnicima te populaciju CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD200<sup>-</sup> (dalje u tekstu CD200<sup>-</sup>), unutar koje se najvjerojatnije nalaze usmjereni koštani i hrskavični prethodnici. Također smo analizirali populaciju CD45<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>CD90.2<sup>+</sup> (dalje u tekstu CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>CD90.2<sup>+</sup>) koja sadrži usmjerene koštane prethodnike (BP, prema engl. *bone progenitors*).

Udio stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> bio je značajno smanjen u miševa WT s artritisom (16,13±4,63%) u odnosu na kontrolnu skupinu WT miševa (29,71±5,51%), dok je njihov udio bio u miševa Fas <sup>-/-</sup> s artritisom sličan udjelu u kontrolnih miševa Fas <sup>-/-</sup>

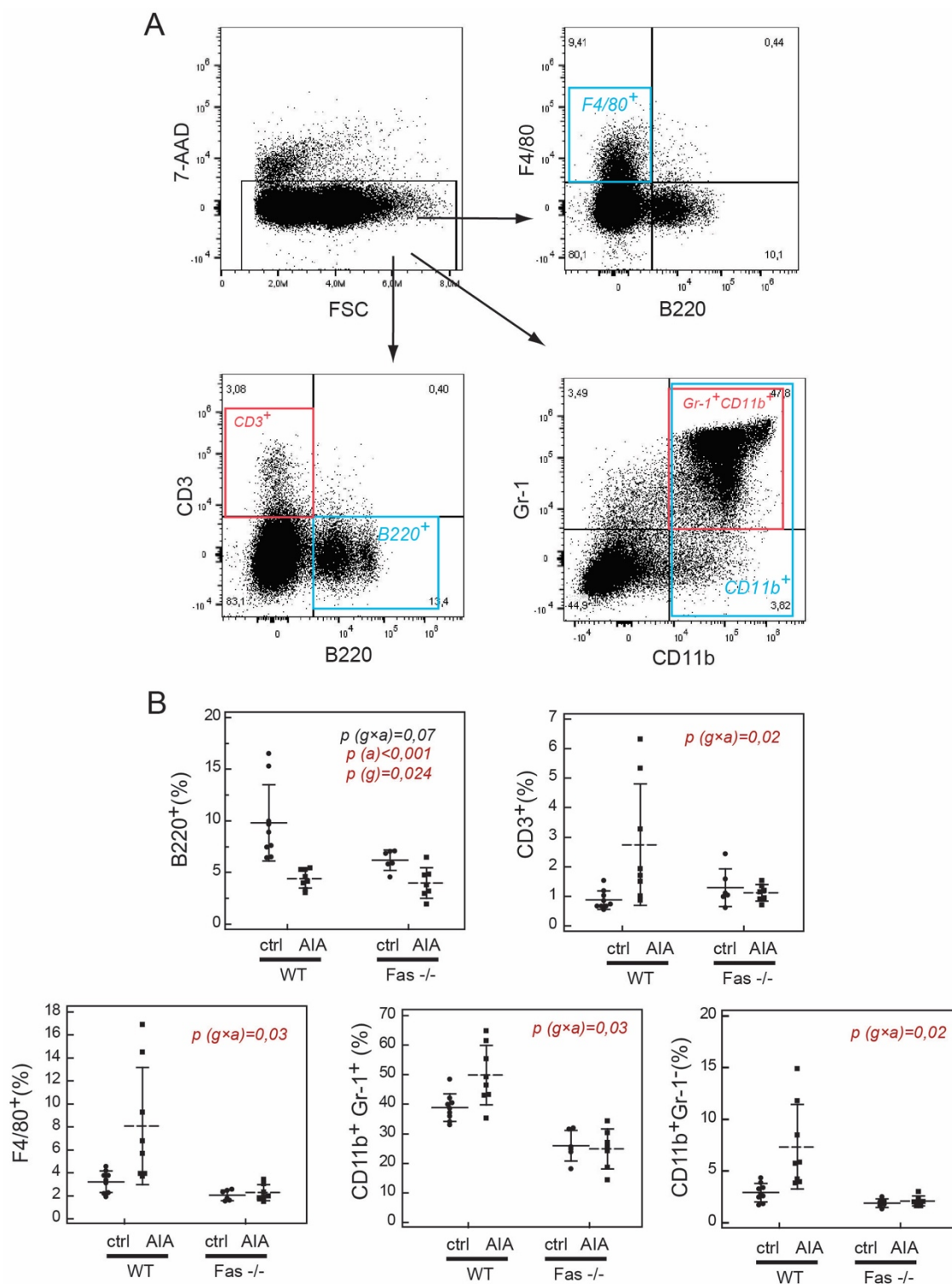


(16,52±3,43% u ctrl i 15,17±4,68% u AIA,  $p(\text{gxa})=0,002$ , dvosmjerna ANOVA, Slika 15B). Štoviše, u miševa Fas  $-/-$  je udio ove populacije bio sličan njenom udjelu u miševa WT s artritismom (Slika 15B). Promjene udjela te populacije bile su praćene odgovarajućom, suprotnom promjenom u udjela stanica CD200 $^-$  (Slika 15B). Iako se udio populacije CD200 $^-$ CD105 $^+$ CD90.2 $^+$  u skupinama s artritismom u odnosu na kontrolne skupine nije značajno mijenjao, udio tih stanica u sinovijalnom odjeljku bio je viši u miševa Fas  $-/-$  (12,42±4,93%) u odnosu na miševe WT (5,54±3,91,  $p(\text{g})<0,001$ , dvosmjerna ANOVA, Slika 15B). Udio populacije CD45 $^-$ CD31 $^-$ TER119 $^-$ CD51 $^+$  bio je sličan u svim pokusnim skupinama (Slika 15B).

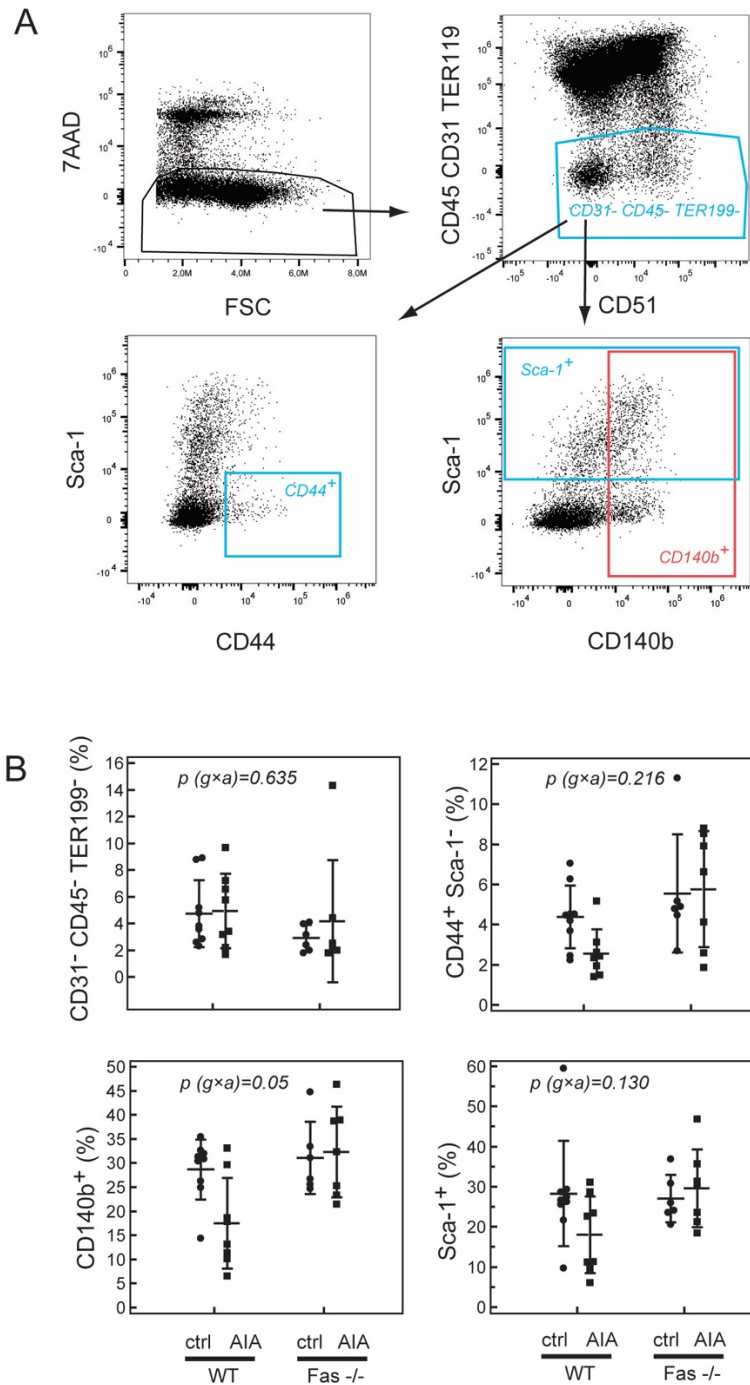
### **5.3.3. Fenotipska analiza hematopoetskih populacija u periartikularnoj koštanoj srži miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas**

Budući da su stanice periartikularne koštane srži uključene u patogenezu lokalnog gubitka kosti u artritismu, analizirani su i udjeli limfoidnih i mijeloidnih staničnih populacija periartikularne koštane srži miševa s artritismom te kontrolnih skupina miševa WT i Fas  $-/-$ .

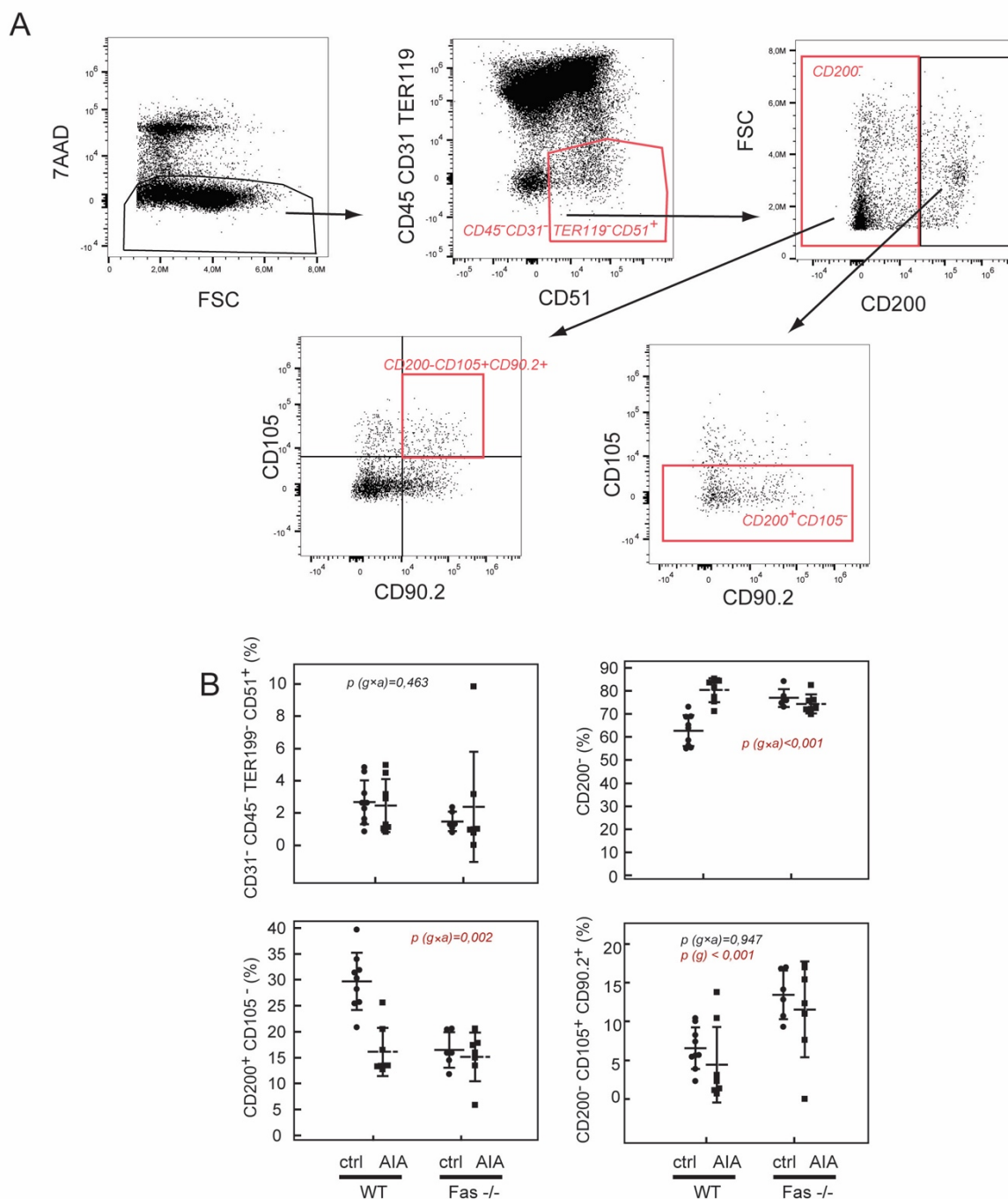
Udio limfocita T (CD3 $^+$ ) bio je viši u miševa Fas  $-/-$  u odnosu na miševe divljeg tipa ( $p(\text{g})<0,001$ , two-way ANOVA), dok je udio mijeloidnih stanica (CD11b $^+$ Gr-1 $^+$ ) bio manji u miševa Fas  $-/-$  ( $p(\text{g})=0,003$ , two-way ANOVA, Slika 16). Udio limfocita B (B220 $^+$ ) te makrofaga (F4/80 $^+$ ) u oba je soja bio manji nakon izazivanja artritisa ( $p(\text{a})=0,005$ , two-way ANOVA, Slika 16). Genotip nije značajno utjecao na udjele ovih populacija (Slika 16).



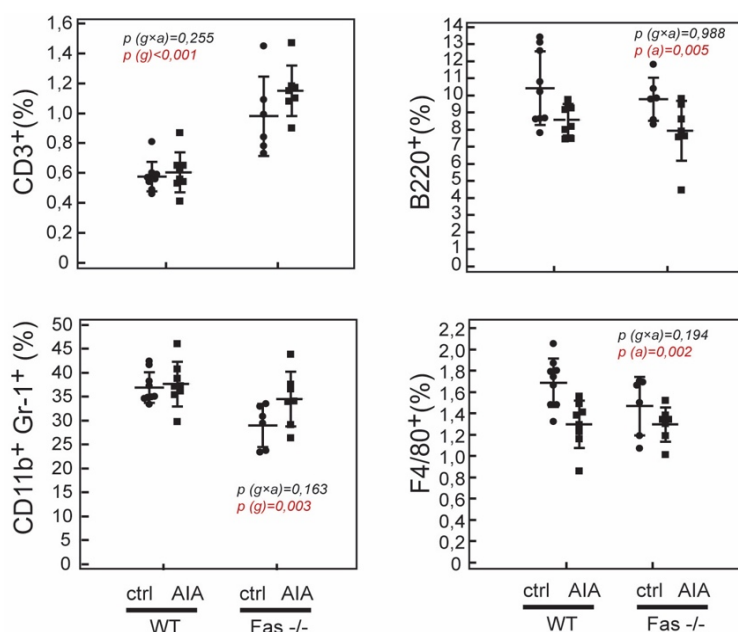
**Slika 13. Udio hematopoetskih staničnih populacija u zglobovima miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ).** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; ctrl). Nakon pripreme jednostanične suspenzije, stanice su obilježene protutjelima konjugiranim fluorescentnim bojama usmjerenima na limfoidne i mijeloidne biljege. (A) Udio stanica pojedine loze određen je u populaciji živih (7AAD $^-$ ) stanica. (B) Analiziran je udio limfocita B (B220 $^+$ ), limfocita T (CD3 $^+$ ), makrofaga (F4/80 $^+$ ), granulocita (CD11b $^+$ Gr-1 $^+$ ) i mijelomonocita (CD11b $^+$ Gr-1 $^-$ ). Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 6 miševa u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). p(gxa) - p vrijednost međudjelovanja genotipa i artritisa, p(g) - p vrijednost učinka genotipa, p(a) - p vrijednost učinka artritisa (dvosmjerna ANOVA), FSC - prema engl. *forward scatter*, SSC - prema engl. *side scatter*.



**Slika 14. Udio mezenhimalnih (Sca-1<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup> i CD140b<sup>+</sup>) staničnih populacija u zglobnom odjeljku miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas<sup>-/-</sup>). Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; ctrl). Nakon pripreme jednostanične suspenzije, stanice su obilježene protutijelima konjugiranim fluorescentnim bojama usmjerenim na mezenhimalne biljege. (A) Udio stanica pojedine loze određen je u populaciji živih (7AAD<sup>-</sup>) stanica. (B) Analiziran je udio ukupne populacije nehematopoetskih stanica (CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>), te udio Sca-1<sup>+</sup>, CD140b<sup>+</sup> i CD44<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> stanica unutar populacije nehematopoetskih stanica. Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 6 miševa u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD), p(gxa) - p vrijednost međudjelovanja genotipa i artritisa, p(g) – p vrijednost učinka genotipa, p(a) – p vrijednost učinka artritisa (dvosmjerna ANOVA), FSC – prema engl. *forward scatter*, SSC – prema engl. *side scatter*.**



**Slika 15. Udio subpopulacija koštano-hrskavičnih prethodnika u zglobnom odjeljku miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas<sup>-/-</sup>).** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatnom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; ctrl). Nakon pripreme jednostanične suspenzije, stanice su obilježene protutijelima konjugiranim fluorescentnim bojama usmjerenim na biljege CD200, CD105 i CD90.2. (A) Udio stanica pojedine loze određen je u populaciji živih (7AAD<sup>-</sup>) stanica. (B) Analiziran je udio populacije koštanih i hrskavičnih prethodnika (CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>), te udjeli stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup>, CD200<sup>-</sup> te CD200<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD90.2 unutar populacije CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>. Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 6 miševa u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). p(gxa) - p vrijednost međudjelovanja genotipa i artritisa, p(g) – p vrijednost učinka genotipa, p(a) – p vrijednost učinka artritisa (dvosmjerna ANOVA), FSC – prema engl. *forward scatter*, SSC – prema engl. *side scatter*.



**Slika 16. Udio hematopoetskih populacija u periartikularnoj koštanoj srži miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas <sup>-/-</sup>).** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliriranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; ctrl). Nakon pripreme jednostanične suspenzije, stanice su obilježene protutijelima konjugiranim fluorescentnim bojama usmjerenim na limfoidne i mijeloidne biljege. Udio stanica pojedine loze određen je u populaciji živih (7AAD<sup>-</sup>) stanica. Analiziran je udio limfocita B (B220<sup>+</sup>), limfocita T (CD3<sup>+</sup>), makrofaga (F4/80<sup>+</sup>) i mijeloidnih stanica (CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>). Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 6 miševa u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). p(g×a) – p vrijednost međudjelovanja genotipa i artritisa, p(g) – p vrijednost učinka genotipa, p(a) – p vrijednost učinka artritisa (dvosmjerna ANOVA), FSC – prema engl. *forward scatter*, SSC – prema engl. *side scatter*.

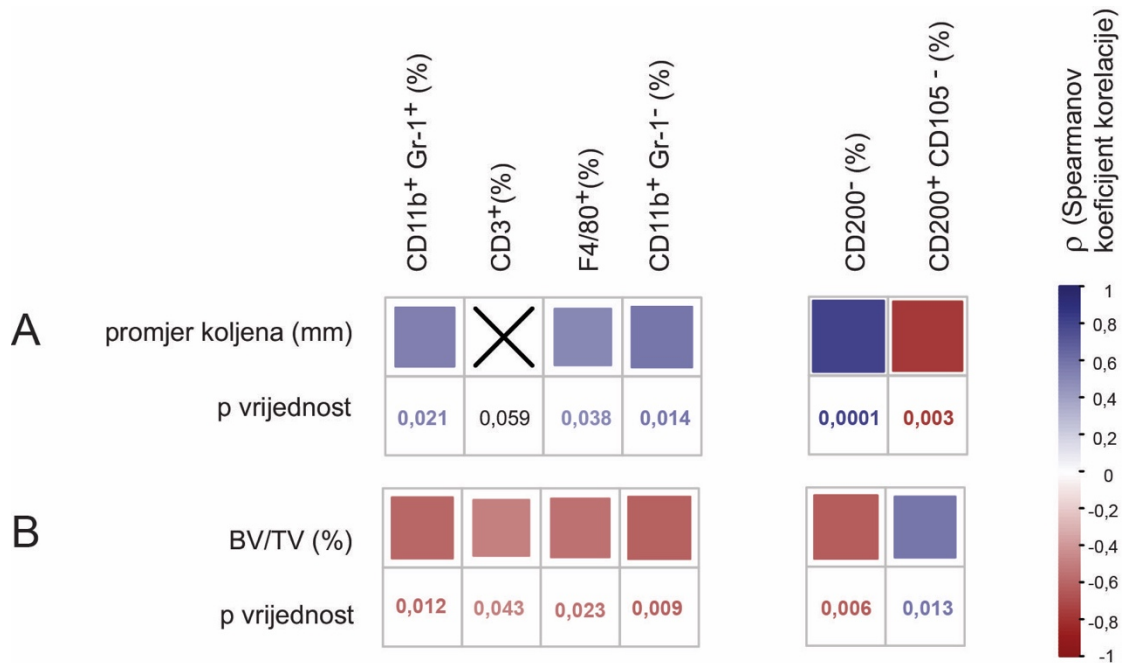
#### 5.4. Povezanost udjela staničnih populacija u zglobnom odjeljku sa subhondralnim koštanim volumenom i zglobnom oteklinom

Nakon određivanja udjela staničnih populacija analizirana je povezanost promjera koljena i subhondralnog koštanog volumena sa udjelom pojedinih, značajno promijenjenih sinovijalnih staničnih populacija. Udio sinovijalnih CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup> te F4/80<sup>+</sup> stanica pozitivno je povezan sa zglobnom oteklinom ( $\rho(\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^+)=0,55$ ,  $p(\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^+)=0,021$ ;  $\rho(\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^-)=0,58$ ,  $p(\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^-)=0,014$ ;  $\rho(\text{F4/80}^+)=0,51$ ,  $p(\text{F4/80}^+)=0,038$ , korelacija ranga, Slika 17A), te negativno povezan sa volumenom subhondralnih koštanih gredica ( $\rho(\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^+)=-0,59$ ,  $p(\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^+) = 0,012$ ;  $\rho(\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^-)=-0,62$ ,  $p(\text{CD11b}^+\text{Gr-1}^-)=0,009$ ;  $\rho(\text{F4/80}^+)=-0,55$ ,  $p(\text{F4/80}^+)=0,023$ , korelacija ranga, Slika 17B), Udio limfocita T u zglobnom odjeljku bio je povezan sa subhondralnim koštanim volumenom ( $\rho=0,50$ ,  $p=0,043$ , korelacija ranga, Slika 17B), ali ne i sa zglobnom oteklinom.

Među mezenhimalnim staničnim populacijama u zglobnom odjeljku, udio populacije CD200<sup>-</sup> bio je pozitivno povezan s zglobnom oteklinom ( $\rho=0,80$ ,  $p=0,0001$ , korelacija ranga, Slika 17A) te negativno povezan s volumenom subhondralnih koštanih gredica ( $\rho=-0,64$ ,  $p=0,006$ , linearna korelacija, Slika 17B). Populacija CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> bila je negativno povezana sa zglobnom oteklinom ( $\rho=-0,76$ ,  $p=0,003$ , korelacija ranga, Slika 17A) te pozitivno povezana s volumenom subhondralnih koštanih gredica ( $\rho=0,59$ ,  $p=0,013$ , korelacija ranga, Slika 17B).

Populacija stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> nakuplja se u zglobovima miševa WT s resorptivnim artritismom, a ovo nakupljanje izostaje u artritisu miševa Fas<sup>-/-</sup>, te je njen udio konzistentno povezan sa zglobnom upalom i koštanim promjenama. Budući da ova populacija čini oko 50% stanica u zglobovima miševa s resorptivnim artritismom, odabrana je za analizu transkriptoma pomoću genskih čipova s ciljem otkrivanja molekularnih posrednika kojima ova populacija posreduje koštanu resorpciju.

Nadalje, u zglobovima miševa Fas<sup>-/-</sup> smanjen je udio stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> u populaciji nehematopoetskih stanica. Ova je populacija u kosti karakterizirana kao populacija koštanih matičnih stanica (43). U miševa Fas<sup>-/-</sup> također je bio povećan udio stanica CD200<sup>-</sup> koja može sadržavati usmjerene koštane prethodnike, ali i sinovijalne fibroblaste. Naša je pretpostavka da je miševa Fas<sup>-/-</sup> pojačana diferencijacija koštanih prethodnika a smanjena njihova apoptoza te da je to jedan od čimbenika, koji doprinosi očuvanju subhondralnog koštanog volumena miševa Fas<sup>-/-</sup> u artritisu (141). Stoga smo ove populacije odabrali za analizu transkriptoma da bismo utvrdili odgovaraju li zglobove populacije CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> i CD200<sup>-</sup> populacijama karakteriziranim u koštanom tkivu, te mijenja li se transkriptom populacije CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> u artritisu u odnosu na zdravu sinoviju.



**Slika 17. Povezanost udjela staničnih populacija s promjerom koljena i volumenom subhondralnim koštanim gredica.** Miševi divljega tipa (WT) i miševi s izbačenim genom za receptor Fas (Fas <sup>-/-</sup>) žrtvovani su 10. dan nakon intra-artikularne injekcije. Pri žrtvovanju je kaliperom izmjeren promjer koljena, a potom je jedan koljeni zglob snimljen uređajem za mikro-kompjutoriziranu tomografiju (μ-CT), a drugi zglob uzet za protočno-citometrijsku analizu udjela staničnih populacija, s ciljem dobivanja podataka o koštanom razaranju i udjelu staničnih populacija u iste životinje. Za protočno-citometrijsku analizu sinovijalne stanice su obilježene protutijelima konjugiranim fluorescentnim bojama usmjerenim na biljege CD11b, Gr-1, CD3, F4/80, CD200 i CD105. Udio granulocita (CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>), mijelomonocita (CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>), makrofaga (F4/80<sup>+</sup>) i limfocita T (CD3<sup>+</sup>) određen je u populaciji živih (7AAD<sup>-</sup>) stanica, dok je udio CD200<sup>-</sup> i CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> stanica određen unutar populacije CD31<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>TER119<sup>-</sup>CD51<sup>+</sup>. Za analizu volumena subhondralnih koštanih gredica korišten je μ-CT. Koljena su snimljena uređajem SkyScan 1076 (Bruker, Kontich, Belgija) na svakih 0,4° rotacije izvora, uz rezoluciju 9 μm, i aluminijski filter debljine 0,5 mm, napon 50 kV te jakost struje 200 μA. Snimke su rekonstruirane pomoću programa NRecon (Bruker) te analizirane pomoću programa CTAn (Bruker). U odsječku duljine 300 μm, između epifizne hrskavice i razine razdvajanja femoralnih kondila određen je udio koštanih gredica (BV/TV, prema engl. *bone volume/total volume*, %). Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 6 miševa u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Za analizu povezanosti primijenjena je korelacija ranga, pomoću koje je izračunat Spearmanov koeficijent (ρ) i p vrijednosti. **(A)** Povezanost promjera koljena s udjelom staničnih populacija. **(B)** Povezanost volumena subhondralnih koštanih gredica s udjelom staničnih populacija. Boja kvadratića odgovara vrijednosti r, a veličina kvadratića proporcionalna p vrijednosti. X označava povezanost koja nije statistički značajna. Plava boja označava pozitivnu, a crvena negativnu povezanost.

## 5.5. Analiza transkriptoma zglobnih mijeloidnih stanica u artritisu miševa divljeg tipa i miševa s izbačenim genom za receptor Fas

Zbog povećanja udjela mijeloidnih (CD11<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>) stanica u zglobovima miševa WT s artritisom i izostanka tog povećanja u neresorptivnom artritisu miševa Fas  $-/-$  te zbog negativne povezanosti te populacije sa subhondralnim koštanim volumenom, ova je populacija odabrana za analizu transkriptoma pomoću genskih čipova Mouse ST 2.0 Array (ThermoFisher, Waltham, MA, SAD), u svrhu otkrivanja mijeloidno-specifičnih molekularnih posrednika koštanog razaranja u artritisu. Miševi WT i Fas  $-/-$  žrtvovani su 10. dan poslije i.a. injekcije mBSA ili pufera PBS, te je procijenjen intenzitet artritisa i uzeta su oba koljena zgloba za izdvajanje stanica postupkom FACS. Dva dana prije žrtvovanja koljena su snimljena *in vivo* pomoću uređaja  $\mu$ -CT, da bi se procijenilo koštano razaranje u zglobovima iz kojih će se izdvojiti stanice. Iz izdvojenih stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> potom je izolirana ukupna stanična RNA, a po 4 pojedinačna uzorka zadovoljavajuće kvalitete iz svake pokusne skupine su fragmentirana, obilježena i hibridizirana na genske čipove. Nakon procjene kvalitete obrade genskih čipova provedena je bioinformatička analiza rezultata unutar sučelja Bioconductor u programu R .

Za analizu sličnosti uzoraka na temelju izražaja svih gena primijenjeni su postupci PCA i analiza hijerarhijskog grupiranja. PCA nije pokazala specifično razdvajanje uzoraka na temelju izražaja svih gena, upućujući na homogenost mijeloidnih stanica svih pokusnih skupina (Slika 18A). Uzorci su se prema hijerarhijskoj analizi razdvojili u dvije skupine, dominantno zastupljene uzorcima miševa WT ili Fas  $-/-$ , međutim tri uzorka miševa Fas  $-/-$  svrstalo se s uzorcima skupine WT, a dva uzorka miševa WT svrstali su se s uzorcima miševa Fas  $-/-$  (Slika 18B). Skupine kontrolnih miševa i miševa s artritisom nisu se grupirale vezano uz pripadnost skupini (Slika 18B).

Nakon određivanja grupiranja uzoraka, provedena je analiza razlika u genskom izražaju pomoću algoritma *limma* (prema engl. *linear models for microarray data*) (303).

Uspoređen je izražaj gena svih uzoraka miševa WT u odnosu na miševe Fas  $-/-$ , izražaj gena kontrolnih miševa WT u odnosu na kontrolne miševe Fas  $-/-$  te izražaj gena miševa WT s artritisom u odnosu na miševe Fas  $-/-$  s artritisom. Između sinovijalnih mijeloidnih stanica miševa WT i Fas  $-/-$  nije pronađena značajna razlika u velikom broju gena, međutim u sve tri usporedbe jasno su se izdvojila dva gena, *erythroid differentiation regulator 1* (Erdr1) i *midline 1* (Mid1), koji su konzistentno pojačano izraženi u miševa WT u odnosu na miševe

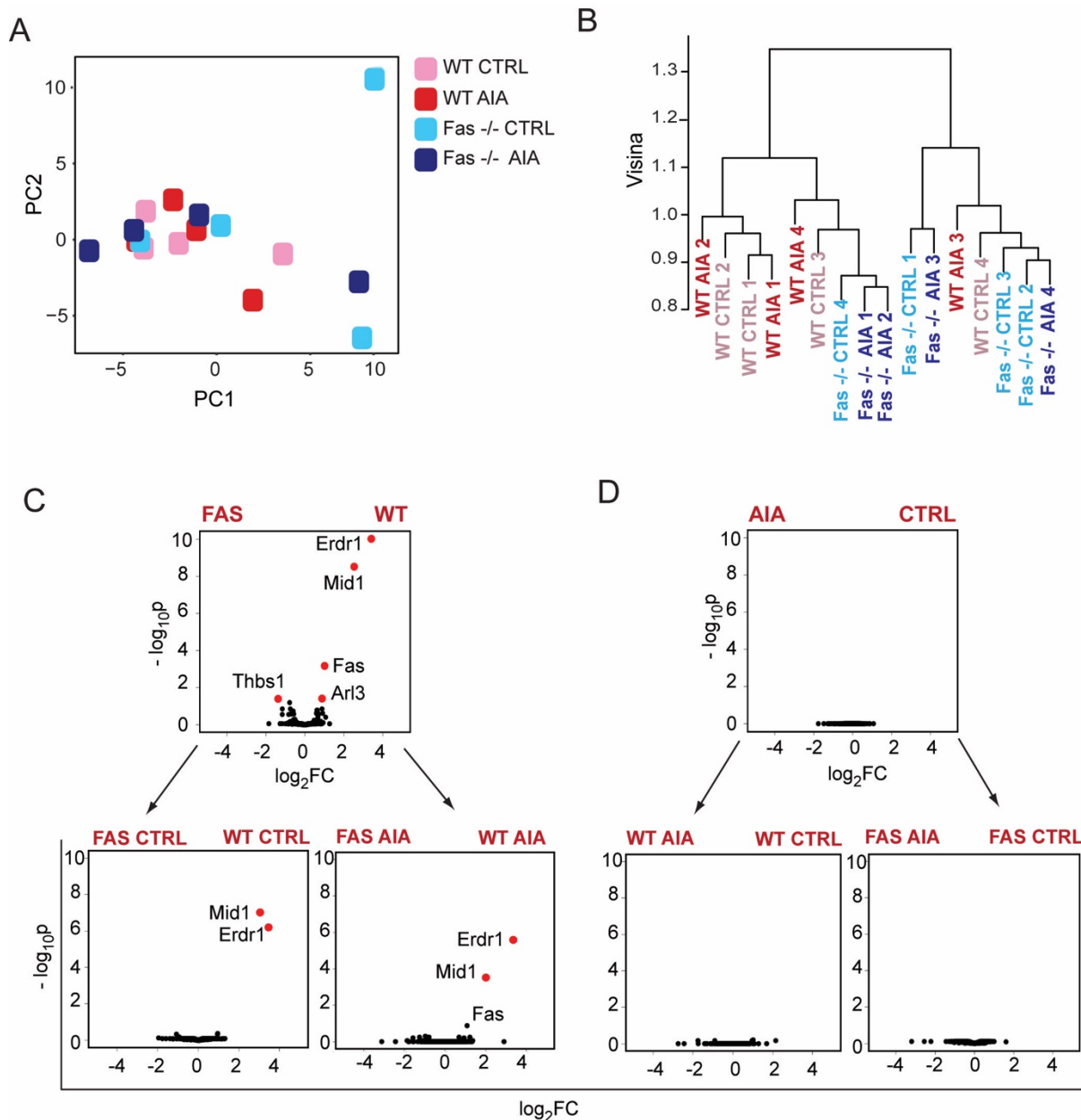


Fas  $-/-$  ( $p < 0,05$ ,  $p$  vrijednost je prilagođena postupkom Benjamini-Hochberg, *limma*, Slika 18C). U usporedbi svih uzoraka miševa WT u odnosu na miševe Fas  $-/-$  kao različito izražena pokazala su se još 3 gena, gen za receptor Fas i *ADP ribosylation factor like GTPase 3* (Arl3), koji su pojačano izraženi u miševa WT u odnosu na miševe Fas  $-/-$  ( $p < 0,05$ ,  $p$  vrijednost je prilagođena postupkom Benjamini-Hochberg, *limma*, Slika 18C) te *thrombospondin 1* (Thbs1), koji je pojačano izražen u miševa Fas  $-/-$  u odnosu na miševe WT ( $p < 0,05$ ,  $p$  vrijednost je prilagođena postupkom Benjamini-Hochberg, *limma*, Slika 18C). Mali broj različito izraženih gena upućuje na homogenost transkriptoma mijeloidnih populacija.

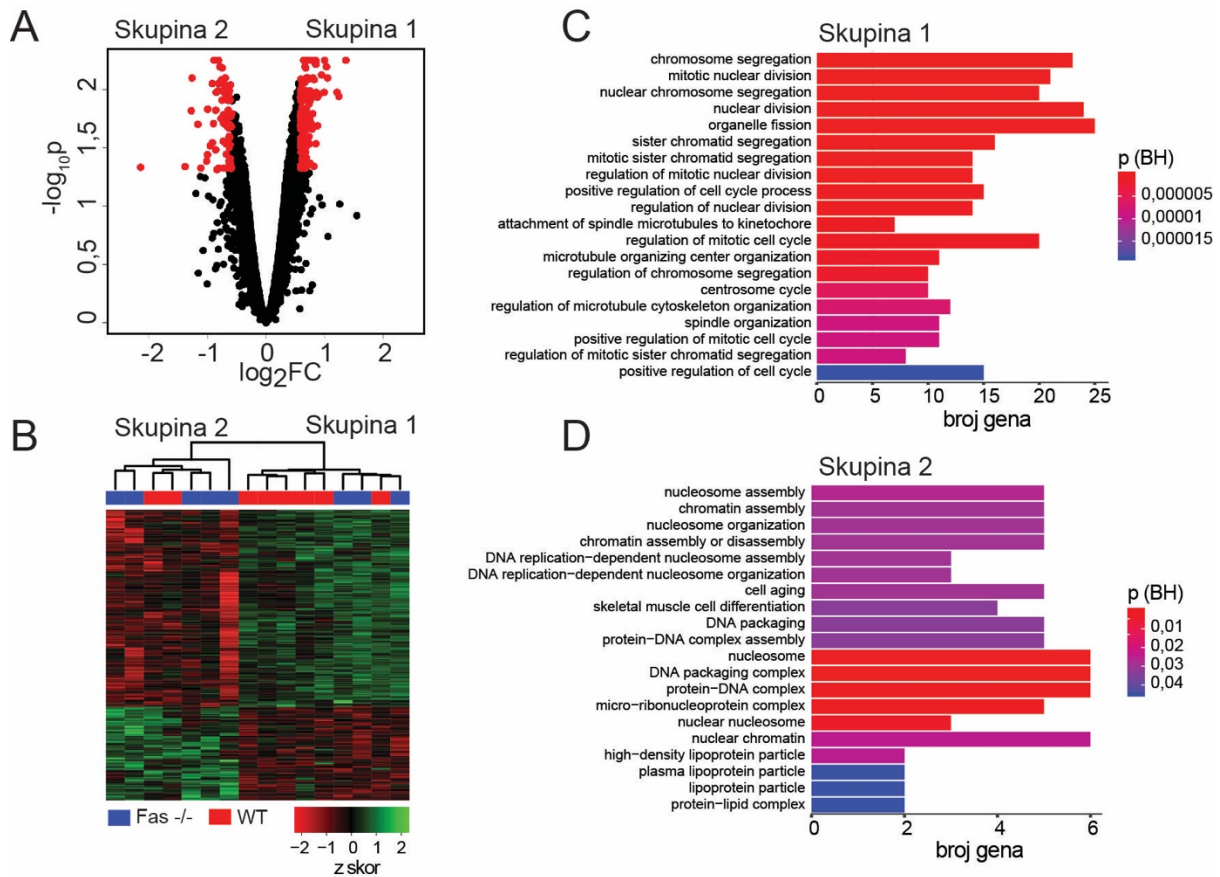
Da bi procijenili mijenja li se transkriptom zglobnih mijeloidnih stanica s nastupom artritisa, uspoređen je izražaj gena svih uzoraka miševa a artritismom u odnosu na kontrolne miševe te odvojeno izražaj gena miševa WT s artritismom u odnosu na kontrolne miševe WT i izražaj gena miševa Fas  $-/-$  s artritismom u odnosu na kontrolne miševe Fas  $-/-$ . U skladu s rezultatima grupiranja, gdje nije primijećeno zasebno grupiranje uzoraka skupine kontrolnih miševa i miševa s artritismom, usporedba genskog izražaja nije pronašla razlike u genskom izražaju između skupina kontrolnih miševa u odnosu na miševe s artritismom (Slika 18D), što upućuje na to, da se mijeloidna populacija ne mijenja s pojavom artritisa. Razlog tomu je najvjerojatnije je sustavno upalno poticanje mijeloidnih stanica imunizacijom s mBSA u CFA koja je provedena i u miševa kontrolne skupine.

Sljedeći korak bio je utvrditi gene koji određuju razvrstavanje uzoraka u dvije skupine, u svrhu čega je napravljena analiza razlika izražaja između dvije skupine razdvojene prema hijerarhijskom grupiranju. U skupini dominantno zastupljenoj s uzorcima miševa WT pojačano je izražen 171 gen, dok je u skupini dominantno zastupljenoj s uzorcima Fas  $-/-$  pojačano izražen 81 gen ( $p < 0,05$  ( $p$  vrijednost prilagođena postupkom Benjamini-Hochberg), apsolutni omjer promjene  $> 1,5$ , *limma*, Slika 19A, B). Pomoću analize zastupljenosti GO termina određeno je jesu li određene biološke funkcije, stanične komponente ili molekularni procesi pojačano zastupljeni među genima, različito izraženima uz nominalnu  $p$  vrijednost  $< 0,05$ , prilagođenu  $p$  vrijednost za višestruko testiranje postupkom Benjamini-Hochberg  $p < 0,1$ , i apsolutni omjer promjene  $> 1,5$ . Pokazalo se da su u skupini s dominantno zastupljenim uzorcima miševa WT pojačano izraženi geni vezani uz progresiju staničnog ciklusa i mitotičku aktivnost, te da su u skupini s dominantno zastupljenim uzorcima miševa Fas  $-/-$  pojačano izraženi geni vezani uz epigenetičku regulaciju genske transkripcije (Slika 19C, D).

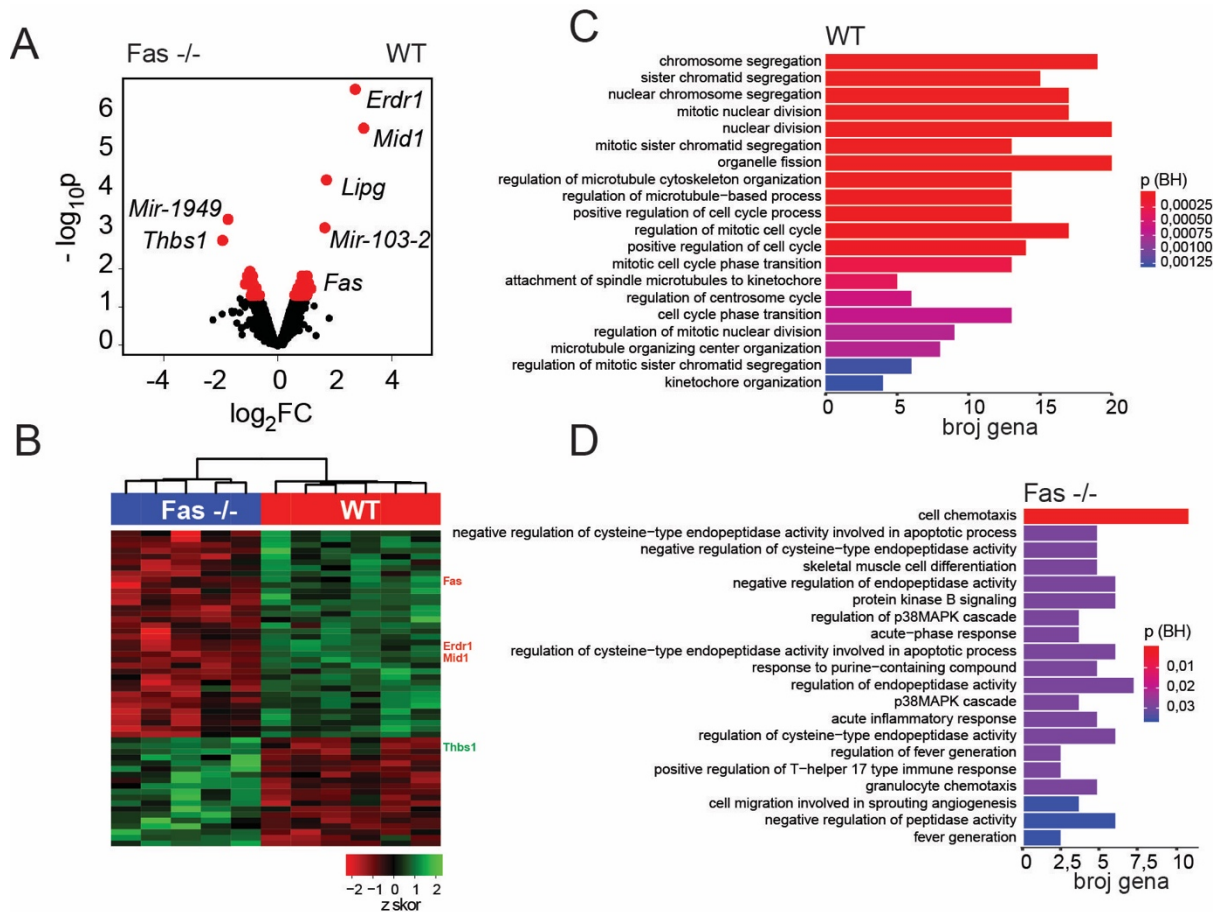
Nepotpuno svrstavanje uzoraka miševa WT i Fas  $-/-$  u dvije skupine te mali broj različito izraženih gena između ove dvije skupine moguće je objasniti varijabilnošću unutar eksperimentalnih skupina. Osim moguće varijabilnosti modela AIA poznato je, da može varirati i fenotip miševa Fas  $-/-$  te da ne razvijaju svi Fas  $-/-$  miševi jednako intenzivnu limfoproliferaciju (202). Štoviše, unutar skupine miševa Fas  $-/-$  također klinička slika AIA varira, jer neki miševi ipak razvijaju blagi sinovitis, međutim većina miševa Fas  $-/-$  nema nikakvih znakova zglobne upale. U svrhu određivanja razlika između reprezentativnih uzoraka sinovijalnih stanica miševa WT i Fas  $-/-$ , su iz analize uklonjeni uzorci koji su se prema hijerarhijskom grupiranju svrstali u nepodudarnu skupinu. Uspoređeno je 6 uzoraka miševa WT sa 5 uzoraka miševa Fas  $-/-$  (Slika 20A). U miševa WT pojačano je izraženih 36 gena, dok je u skupini s uzorcima Fas  $-/-$  pojačano izraženih 19 gena ( $p < 0,05$  ( $p$  vrijednost prilagođena postupkom Benjamini-Hochberg), apsolutni omjer promjene  $> 1,5$ , *limma*, Slika 20 A,B, Dodatak – Tablica 4). Među njima se ponovo nalaze geni *Mid1*, *Erdr1* i *Thsb1*, definirani kao različito izraženi već u analizi svih uzoraka. Prema analizi zastupljenosti GO termina među različito izraženim genima uz nominalnu  $p$  vrijednost  $< 0,05$ , prilagođenu  $p$  vrijednost za višestruko testiranje postupkom Benjamini-Hochberg  $p < 0,1$ , i apsolutni omjer promjene  $> 1,5$ , sinovijalne mijeloidne stanice miševa WT pojačano izražavaju gene vezane uz progresiju staničnog ciklusa, dok sinovijalne mijeloidne stanice miševa Fas  $-/-$  pojačano izražavaju gene vezane uz regulaciju imunskog odgovora, apoptozu, MAPK signalni put te signalni put proteinske kinaze B (PKB) (Slika 20 C, D, A, Dodatak – Tablica 5).



**Slika 18. Analiza transkriptoma sinovijalnih mijeloidnih stanica miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (*Fas*<sup>-/-</sup>).** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; CTRL). Nakon opuštanja stanica sinovijalnog odjeljka pomoću kolagenaze tipa IV je postupkom staničnog razvrstavanja aktiviranog fluorescencijom (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*) izdvojena populacija živih (DAPI<sup>-</sup>) neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), nelimfoidnih (CD3B220NK1.1<sup>-</sup>) stanica, koje izražavaju biljege CD11b i Gr-1 (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low/+</sup>). Iz izdvojene mijeloidne populacije je potom izolirana ukupna stanična RNA, a po 4 pojedinačna uzorka zadovoljavajuće kvalitete iz svake pokuse skupine su fragmentirana, obilježena i hibridizirana na genske čipove GeneChip™ Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix). Nakon procjene kvalitete očitanih podataka bioinformatička analiza provedena je unutar sučelja Bioconductor u programu R. Za određivanje grupiranja uzoraka na temelju sličnosti izražaja svih gena primijenjene su (A) analiza glavnih sastavnica (PC, prema engl. *principal component*) i (B) analiza hijerarhijskog grupiranja. Analiza različito izraženih gena između (C) WT i *Fas*<sup>-/-</sup> miševa te (D) miševa s artritismom i kontrolnih miševa provedena je pomoću algoritma *limma* (prema engl. *linear models for microarray data*), a rezultati su grafički prikazani odnosom negativnog logaritma prilagođene p vrijednosti (-log<sub>10</sub>p), i logaritma omjera promjene izražaja gena (log<sub>2</sub>FC, prema engl. fold change), engl. *volcano plot*. Pojedinačni geni prikazani su crnim točkama, a crveno su označeni geni zadovoljavajuće prilagođene p vrijednosti (p<0,05, Benjamini-Hochberg) te omjera promjene (apsolutni FC>1,5).



**Slika 19. Analiza razlika u genskom izražaju skupina uzoraka razdvojenih na temelju hijerarhijske analize.** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; CTRL). Nakon otpuštanja zglobnih stanica pomoću kolagenaze tipa IV, pomoću staničnog razvrstavanja aktiviranog fluorescencijom (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*) izdvojena je populacija živih (DAPI<sup>-</sup>) neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), nelimfoidnih (CD3B220NK1.1<sup>-</sup>) stanica, koje izražavaju biljege CD11b i Gr-1 (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low/+</sup>). Iz izdvojene mijeloidne populacije je potom izolirana ukupna stanična RNA, a po 4 pojedinačna uzorka zadovoljavajuće kvalitete iz svake pokuse skupine su fragmentirana, obilježena i hibridizirana na genske čipove GeneChip™ Mouse Gene 2,0 ST Array (Affymetrix). Nakon procijene kvalitete očitanih podataka bioinformatička analiza je provedena unutar sučelja Bioconductor u programu R. Analiza različito izraženih gena između dviju skupina uzoraka razdvojenih na temelju hijerarhijske analize provedena je pomoću algoritma *limma* (prema engl. *linear models for microarray data*). U skupinu 1 svrstalo se 6 uzoraka miševa WT i 3 uzorka miševa Fas  $-/-$ , dok se u skupini 2 nalaze 5 uzoraka miševa Fas  $-/-$  i 2 uzorka miševa WT. (A) Rezultati su grafički prikazani odnosom negativnog logaritma prilagođene p vrijednosti ( $-\log_{10}p$ ), i logaritma omjera promjene izražaja gena ( $\log_2FC$ , prema engl. fold change), engl. *volcano plot*, pri čemu su pojedinačni geni prikazani crnim točkama, a crveno su označeni geni zadovoljavajuće prilagođene p vrijednosti ( $p < 0,05$ , Benjamini-Hochberg) te omjera promjene (apsolutni  $FC > 1,5$ ). (B) Razlike u izražaju također su prikazane toplinskom mapom (prema engl. *heatmap*) u kojoj su zelena boja predstavlja višu a crvena nižu razinu izražaja gena. Pomoću analize zastupljenosti GO termina određene su biološke funkcije, stanične komponente i molekularni procesi pojačano zastupljeni među genima pojačano izraženima u (C) skupini 1 i (D) skupini 2. Stupci za svaki od 20 najznačajnije promijenjenih GO termina prikazuju broj gena koji pripadaju pojedinom GO terminu, a boja stupca odgovara prilagođenoj p vrijednosti ( $p < 0,05$ , Benjamini-Hochberg).



**Slika 20. Analiza razlika u genskom izražaju zglobnih CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> stanica miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas<sup>-/-</sup>) nakon uklanjanja uzoraka koji se prema hijerarhijskom grupiranju svrstaju u nepodudarnu skupinu.** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*; AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*; CTRL). Nakon otpuštanja stanica sinovijalnog odjeljka pomoću kolagenaze tipa IV, staničnim razvrstavanjem aktiviranim fluorescencijom (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*) izdvojena je populacija živih (DAPI<sup>-</sup>) neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), nelimfoidnih (CD3B220NK1.1<sup>-</sup>) stanica, koje izražavaju biljege CD11b i Gr-1 (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low/+</sup>). Iz izdvojene mijeloidne populacije je potom izolirana ukupna stanična RNA, a po 4 pojedinačna uzorka zadovoljavajuće kvalitete iz svake pokuse skupine su fragmentirana, obilježena i hibridizirana na genske čipove GeneChip<sup>TM</sup> Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix). Nakon procjene kvalitete očitanih podataka bioinformatička analiza provedena je unutar sučelja Bioconductor u programu R. Da bi odredili razlike između reprezentativnih uzoraka sinovijalnih mijeloidnih stanica miševa WT i Fas<sup>-/-</sup>, iz analize su uklonjeni uzorci koji su se prema hijerarhijskom grupiranju svrstali u skupinu s nepodudarnim genotipom. Pomoću algoritma *limma* (prema engl. *linear models for microarray data*) je uspoređeno 6 uzoraka miševa WT sa 5 uzoraka miševa Fas<sup>-/-</sup>. (A) Rezultati su grafički prikazani odnosom negativnog logaritma prilagođene p vrijednosti (-log<sub>10</sub>p), i logaritma omjera promjene izražaja gena (log<sub>2</sub>FC, prema engl. *fold change*), engl. *volcano plot*, pri čemu pojedinačni geni prikazani crnim točkama, a crveno su označeni geni zadovoljavajuće prilagođene p vrijednosti (p<0,05, Benjamini-Hochberg) te omjera promjene (apsolutni FC>1,5). (B) Razlike u izražaju također su prikazane toplinskom mapom (prema engl. *heatmap*) u kojoj zelena boja predstavlja višu, a crvena nižu razinu izražaja gena. (C) Analizom zastupljenosti GO termina određene su biološke funkcije, stanične komponente i molekularni procesi pojačano zastupljeni među genima pojačano izraženima u (C) sinovijalnim mijeloidnim stanicama miševa WT i (D) miševa Fas<sup>-/-</sup>. Stupci za svaki od 20 najznačajnije promijenjenih GO termina prikazuju broj gena koji pripadaju pojedinom GO terminu, a boja odgovara prilagođenoj p vrijednosti (p<0,05, Benjamini-Hochberg).

## 5.6. Analiza transkriptoma sinovijalnih populacija koštano-hrskavičnih prethodnika miševa divljeg tipa

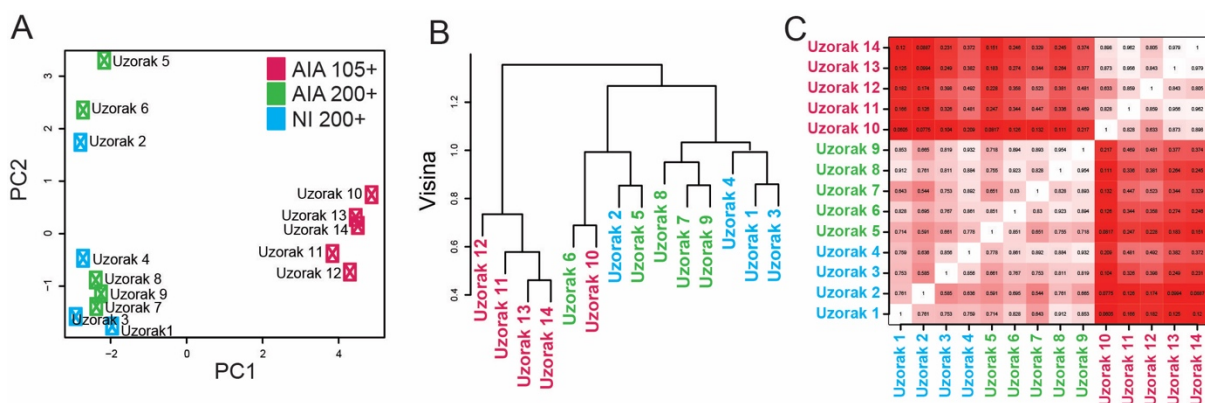
Populacija koštano-hrskavičnih prethodnika karakterizirana je samo u koštanom tkivu (43), ali ne i u zglobnim stanicama, analizom transkriptoma stanica  $CD200^+CD105^+$  i  $CD200^+CD105^-$ , koje prema Chan i sur. u kosti predstavljaju rane i usmjerene koštano-hrskavične prethodnike, željeli smo procijeniti izražavaju li gene karakteristične za ove populacije i utvrditi mijenja li se populacija koja fenotipski odgovara najranijim koštano-hrskavičnim prethodnicima  $CD200^+CD105^-$  tijekom artritisa. U tu svrhu smo usporedili transkriptom stanica  $CD200^+CD105^-$  i  $CD200^-CD105^+$ , te transkriptom stanica  $CD200^+CD105^-$  iz zglobova neimuniziranih miševa sa stanicama izdvojenim iz miševa s artritismom. U ovome dijelu istraživanja korišteni su samo miševi WT, koji su žrtvovani 10. dan poslije i.a. injekcije mBSA u miševa imuniziranih sa mBSA i CFA (AIA) ili pufera PBS u neimuniziranih miševa (NI), te je procijenjen intenzitet artritisa i uzeta su oba koljena zgloba za izdvajanje stanica postupkom FACS. Iz izdvojenih stanica su potom pripremljene knjižnice, koje su sekvencionirane pomoću uređaja NextSeq 500 (Illumina). Nakon procjene kvalitete očitavanja provedena je bioinformatička analiza rezultata pomoću nekoliko javno dostupnih alata u okruženju Unix te pomoću programa R unutar sučelja Bioconductor.

Sličnost uzoraka procijenjena je pomoću analize PCA, hijerarhijskog grupiranja te korelacijske analize. Analiza PCA i korelacijska analiza pokazale su zasebno grupiranje uzoraka  $CD200^-CD105^+$  stanica miševa s artritismom (Slika 21A, C). Hijerarhijska analiza također zasebno grupira 4 uzorka skupine stanica  $CD200^-CD105^+$  iz miševa s artritismom, no jedan se grupira zajedno s uzorcima  $CD200^+CD105^-$  miševa s artritismom i neimuniziranih miševa (Slika 21B). Sve tri analize ukazuju na sličnost globalnog genskog izražaja  $CD200^+CD105^-$  populacije neimuniziranih miševa i miševa s artritismom (Slika 21A, B, C).

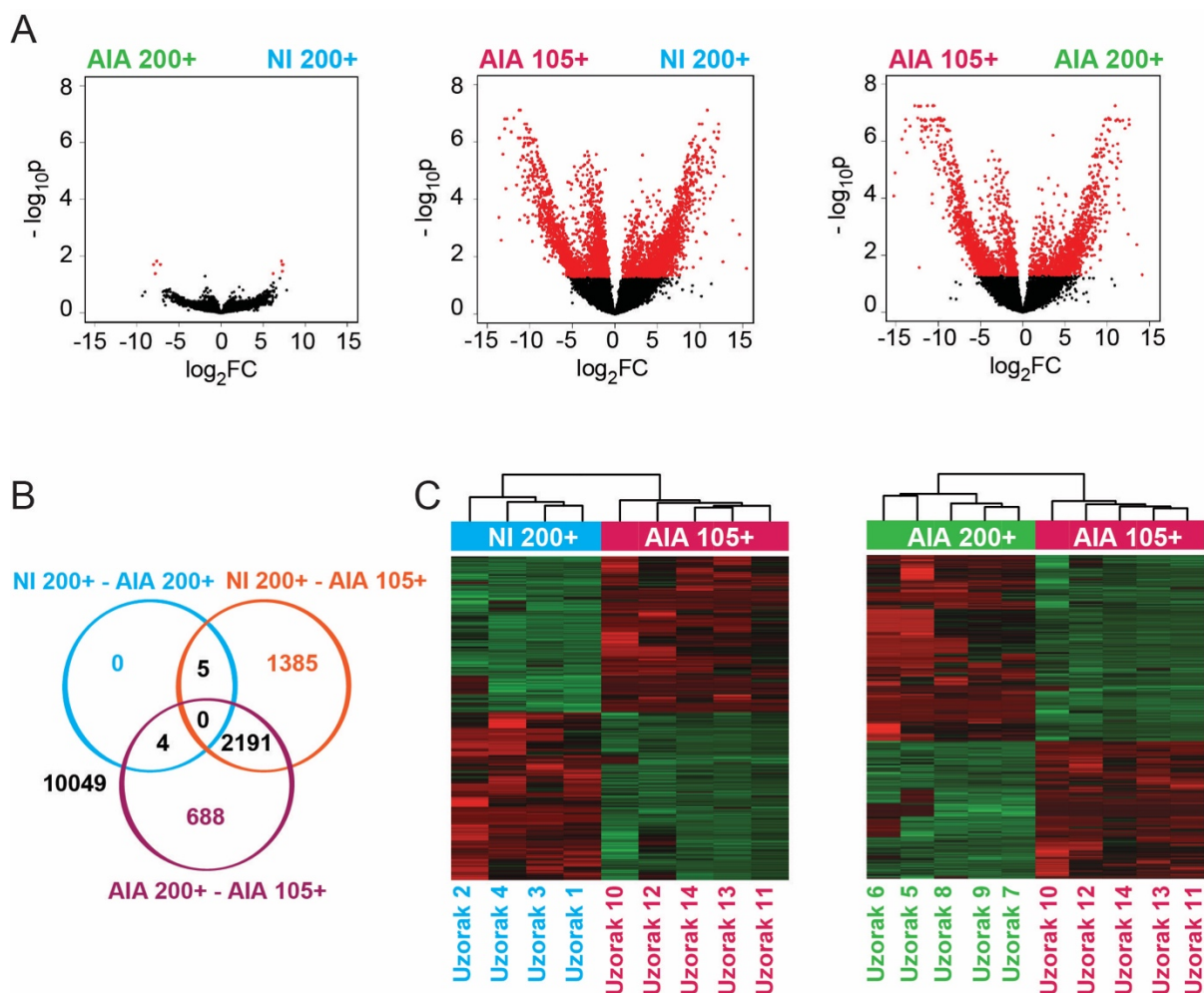
To je potvrdila i analiza razlika u izražaju, pri čemu je samo 9 gena različito izraženo u usporedbi između  $CD200^+CD105^-$  stanica neimuniziranih miševa i  $CD200^+CD105^-$  stanica miševa s artritismom, od čega je 5 pojačano izraženo u stanicama neimuniziranih miševa, te 4 u populaciji miševa s artritismom (apsolutni omjer promjene 1,5,  $p < 0,05$  uz prilagodbu za višestruko testiranje prema Benjamini-Hochbergu, Slika 22A). Usporedbom stanica  $CD200^+CD105^-$  neimuniziranih miševa sa stanicama  $CD200^-CD105^+$  miševa s artritismom pronađen je 3581 različito izražen gen, od čega 1723 gena pojačano izraženih u stanicama  $CD200^+CD105^-$ , te 1858 u stanicama  $CD200^-CD105^+$  (apsolutni omjer promjene 1,5,  $p < 0,05$  uz prilagodbu za višestruko testiranje prema Benjamini-Hochbergu, Slika 22A, C).



Između stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> i CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> miševa s artritisom bilo je 2883 različito izraženih gena, od čega je 1227 pojačano izraženih u populaciji CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup>, te 1656 u populaciji i CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> miševa s artritisom (apsolutni omjer promjene 1,5,  $p < 0,05$  uz prilagodbu za višestruko testiranje prema Benjamini-Hochbergu, Slika 22A, C). Od 3581 gena različito izraženih između stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> neimuniziranih miševa i stanica i CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> miševa s artritisom, te 2883 gena različito izraženih između stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> i i CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> miševa s artritisom, 2191 gen bio je različit u obje usporedbe (Slika 22B). Pet gena različito izraženih u stanicama CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> neimuniziranih miševa u odnosu na stanice CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> miševa s artritisom, također su različito izraženi u usporedbi sa stanicama i CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> miševa s artritisom (Slika 22B). Četiri različito izražena gena u stanicama i CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> miševa s artritisom, u odnosu na stanice CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> neimuniziranih miševa, također su različito izraženi u usporedbi sa stanicama CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> miševa s artritisom (Slika 22B).



**Slika 21. Analiza sličnosti uzoraka populacija sinovijalnih koštano-hrskavičnih prethodnika.** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) u skupini miševa s artritisom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) u neimuniziranoj (NI) kontrolnoj skupini. Nakon otpuštanja stanica sinovijalnog odjeljka pomoću kolagenaze tipa IV, staničnim razvrstavanjem aktiviranim fluorescencijom (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*) izdvojeno je do 200-500 pojedinačnih, živih (DAPI<sup>-</sup>), CD51<sup>+</sup>, neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), neendotelinih (CD31<sup>-</sup>), neleukoidnih (CD45<sup>-</sup>) CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> stanica miševa s artritisom (AIA 200+, Uzorak 5-9) i NI miševa (NI 200+, Uzorak 1-4) te CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> stanica miševa s artritisom (AIA 105+, Uzorak 10-14). Iz izdvojenih populacija su potom pripremljene knjižnice za sekvencioniranje RNA. Po pet knjižnica zadovoljavajuće kvalitete iz svake pokuse skupine sekvencionirano je pomoću uređaja NextSeq 500 (Illumina). Nakon procjene kvalitete očitavanja provedena je bioinformatička analiza rezultata pomoću nekoliko javno dostupnih alata u okruženju Unix te pomoću programa R unutar sučelja Bioconductor. Za određivanje grupiranja uzoraka na temelju sličnosti izražaja svih gena primijenjene su (A) analiza glavnih sastavnica (PC, prema engl. *principal component*), (B) analiza hijerarhijskog grupiranja i (C) korelacijska analiza, gdje je sličnost odražena visokim stupnjem korelacije uzoraka (Pearsonov korelacijski koeficijent: bijela boja kvadratića =1, crvena boja =0)



**Slika 22. Analiza različitosti u genskom izražaju između uzoraka populacija zglobnih stabica koje izražavaju biljege koštano hrskavičnih prethodnika.** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metilirano goveđeg serumskeg albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) u skupini miševa s artritisom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) u neimuniziranoj (NI) skupini kontrolnih miševa. Nakon otpuštanja stanica sinovijalnog odjeljka pomoću kolagenaze tipa IV, staničnim razvrstavanjem aktiviranim fluorescencijom (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*) izdvojeno je do 200-500 pojedinačnih, živih (DAPI<sup>-</sup>), CD51<sup>+</sup>, neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), neendotelnih (CD31<sup>-</sup>), neleukoidnih (CD45<sup>-</sup>) CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> stanica miševa s artritisom i NI miševa te CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> stanica miševa s artritisom. Iz izdvojenih populacija su potom pripremljene knjižnice za sekvencioniranje RNA. Pet knjižnica zadovoljavajuće kvalitete iz svake pokuse skupine sekvencionirano je pomoću uređaja NextSeq 500 (Illumina). Nakon procjene kvalitete očitavanja provedena je bioinformatička analiza rezultata pomoću nekoliko javno dostupnih alata u okruženju Unix te pomoću programa R unutar sučelja Bioconductor. Pomoću algoritma *limma voom* uspoređen je izražaj gena u CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> stanica miševa s artritisom (AIA 200+, Uzorak 5-9) i NI miševa (NI 200+, Uzorak 1-4) te CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> stanica miševa s artritisom (AIA 105+, Uzorak 10-14). (A) Rezultati su grafički prikazani odnosom negativnog logaritma prilagođene p vrijednosti ( $-\log_{10}p$ ), i logaritma omjera promjene izražaja gena ( $\log_2FC$ , prema engl. *fold change*), engl. *volcano plot*, pri čemu su pojedinačni geni prikazani crnim točkama, a crveno su označeni geni zadovoljavajuće prilagođene p vrijednosti ( $p < 0,05$ , Benjamini-Hochberg) te omjera promjene (apsolutni  $FC > 1,5$ ). (B) Vennovim dijagramom prikazan je broj gena koji su različito izraženi u pojedinačnim usporedbama (brojevi u bojama) te broj gena koji su različito izraženi u više usporedbi (brojevi crne boje). (C) Razlike u izražaju između NI 200+ (plavo) i AIA 105+ (crveno) te AIA 200+ (zeleno) i AIA 105+ također su prikazane toplinskom mapom (prema engl. *heatmap*) u kojoj su zelena boja predstavlja višu, a crvena nižu razinu izražaja gena.



GSEA pokazala je da stanice CD200<sup>+</sup> neimuniziranih miševa ili stanice CD200<sup>+</sup> miševa s artritismom u odnosu na stanice CD105<sup>+</sup> miševa s artritismom pojačano izražavaju gene vezane uz diferencijaciju i regulaciju aktivnosti stanica koštanog i hrskavičnog tkiva, primjerice Wnt, BMP, TGF- $\beta$  i Notch signalne puteve (Slika 23A, B). Također, stanice CD200<sup>+</sup> pojačano izražavaju gene vezane uz MAPK signalni put, te nekoliko imunskih procesa, primjerice regulaciju sazrijevanja i kemotaksije leukocita te citokinsku signalizaciju. Štoviše, stanice CD200<sup>+</sup> izražavaju gene vezane uz razvoj, proliferaciju i održavanje matičnih stanica (Slika 23A, B, E). Stanice CD105<sup>+</sup> u odnosu na populaciju CD200<sup>+</sup> karakterizira pojačan izražaj gena vezanih uz regulaciju staničnog ciklusa i replikacije DNA, stanično disanje, ribosomske procese i regulaciju imunskog sustava (Slika 23A, B, E).

Posebni naglasak stavili smo na usporedbu CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> i CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> stanica miševa s artritismom, koja je napravljena u svrhu potvrde koštano-prethodničkog karaktera stanica CD200<sup>+</sup>CD105 (Tablica 6). Osim članova BMP, TGF- $\beta$  i Wnt signalnih puteva, pokazan je viši izražaj gena *Osterix*, *Runx2*, *RANKL*, *Nestin* i *Fas* u CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> stanica. Izražaj biljega CD200 na stanicama CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup>, odnosno CD105 na stanicama CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> potvrđen je i na genskoj razini. Također, stanice CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> pojačano izražavaju gen za biljeg 6C3, dok CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> imaju viši izražaj gena *CD90*, što je sukladno sa prije opisanim profilom površinskih biljega na tim stanicama u kosti (43). Viši izražaj gena za receptor Fas u stanicama CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> sukladan je rezultatima ranijih istraživanja našeg laboratorija, kojima smo pokazali da ova populacija izražava Fas i na razini bjelančevine te je osjetljiva na apoptozu uzrokovanu dodavanjem aktivirajućeg protutijela protu-Fas, što upućuje na ulogu Fas-posredovane apoptoze u uklanjanju ove populacije u resorptivnom AIA (141).

Iako usporedba transkriptoma stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> miševa s artritismom i iste populacije neimuniziranih miševa nije pokazala veliki broj statistički značajno različito izraženih gena, analiza zastupljenosti skupina gena pokazala je da stanice CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> neimuniziranih miševa u odnosu na stanice miševa s artritismom jače izražavaju gene vezane uz diferencijaciju koštanog i hrskavičnog tkiva, te regulaciju migracije, diferencijacije i aktivacije leukocita, dok ove stanice miševa s artritismom u odnosu na iste stanice neimuniziranih miševa pojačano izražavaju gene vezane uz regulaciju diobe stanica, stanično disanje i ribosomske procese (Slika 23C, D).



**Slika 23. Analiza zastupljenosti genskih setova (GSEA, prema engl. *gene set enrichment analysis*) u zglobnim populacijama koje izražavaju biljege koštano-hrskavičnih prethodnika.** Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) u skupini miševa s artritisom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) u neimuniziranoj (NI) skupini kontrolnih miševa. Nakon otpuštanja stanica zglobnog odjeljka pomoću kolagenaze tipa IV, staničnim razvrstavanjem aktiviranim fluorescencijom (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*) izdvojeno je do 200-500 pojedinačnih, živih (DAPI<sup>+</sup>), CD51<sup>+</sup>, neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), neendotelnih (CD31<sup>-</sup>), neleukoidnih (CD45<sup>-</sup>) CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> stanica miševa s artritisom i NI miševa te CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> stanica miševa s artritisom. Iz izdvojenih populacija su potom pripremljene knjižnice za sekvencioniranje RNA. Pet knjižnica zadovoljavajuće kvalitete iz svake pokuse skupine je sekvencionirano pomoću uređaja NextSeq 500 (Illumina). Nakon procjene kvalitete očitavanja provedena je bioinformatička analiza rezultata pomoću nekoliko javno dostupnih alata u okruženju Unix te pomoću programa R unutar sučelja Bioconductor. Za analizu GSEA svi geni sa ukupnim zbrojem očitavanja u svim uzorcima većim od 50 za pojedinačnu usporedbu dvaju skupina poredani su na način da su geni s najvećim razlikama u izražaju na vrhu, a oni s najmanjim na dnu liste. GSEA određuje nalaze li se geni određene skupine bliže vrhu ili dnu liste, te izračunava ukupnu zastupljenost normaliziranu na broj gena u skupini (NES, prema engl. *normalized enrichment score*), koja odražava zastupljenost na vrhu (pozitivan NES) ili dnu (negativan NES) liste gena. Procijenjena je zastupljenost javno dostupnih genskih skupina (genskih skupina bioloških procesa, genskih skupina staničnih komponentata te genskih skupina molekularne funkcije). (A) Zastupljenost genskih setova u skupini stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> neimuniziranih miševa (NI 200+) u odnosu na skupinu stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> iz miševa s artritisom (AIA 105+), (B) u skupini stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> miševa s artritisom (AIA 200+) u odnosu na skupinu stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> iz miševa s artritisom (AIA 105+) te (C) u skupini stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> neimuniziranih miševa (NI 200+) u odnosu na istu populaciju skupine miševa s artritisom (AIA 200+). Prikazane su odabrane statistički značajno zastupljene skupine gena ( $p < 0,05$ , uz prilagodbu za višestruko testiranje prema Benjamini-Hochbergu). (D) Funkcionalno povezane skupine genskih setova pojačano zastupljene u skupini NI CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> u odnosu AIA CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> te (E) u skupine genskih setova pojačano zastupljene u obje skupine stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> u odnosu na stanice CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup>.

**Tablica 6. Razlike u izražaju gena obitelji BMP, članova Wnt i TGF- $\beta$  signalnih puteva te ostalih odabranih gena između stanica zglobnog odjeljka CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> i CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> miševa divljeg tipa s artritisom.**

<b>Članovi obitelji BMP</b>					
<b>Simbol gena</b>	<b>Naziv gena</b>	<b>log<sub>2</sub>FC</b>	<b>p vrijednost (BH)</b>	<b>log<sub>2</sub>CPM u CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup></b>	<b>log<sub>2</sub>CPM u CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup></b>
<i>Bmp2</i>	bone morphogenetic protein 2	8,27	1,92×10 <sup>-5</sup>	4,69	-3,52
<i>Bmp3</i>	bone morphogenetic protein 3	8,25	0,00056	4,20	-4,30
<i>Bmp4</i>	bone morphogenetic protein 4	9,59	1,87×10 <sup>-6</sup>	7,06	-2,96
<i>Bmp6</i>	bone morphogenetic protein 6	8,84	3,52×10 <sup>-6</sup>	5,81	-3,12
<i>Gdf3</i>	growth differentiation factor 3	-9,37	1,72×10 <sup>-7</sup>	-4,06	5,45
<i>Gdf6</i>	growth differentiation factor 6	6,76	0,003886	2,31	-4,30
<i>Acvr2b</i>	activin receptor IIB	5,52	0,028873	2,57	-2,93
<i>Bmpr1a</i>	bone morphogenetic protein receptor, type 1A	4,72	0,006831	6,44	1,77
<i>Bmpr2</i>	bone morphogenetic protein receptor, type II	3,55	0,015029	6,82	3,17
<i>Smad1</i>	SMAD family member 1	4,59	0,008171	5,59	1,09
<i>Smad3</i>	SMAD family member 3	4,31	0,037767	4,57	0,72
<i>Grem1</i>	gremlin 1, DAN family BMP antagonist	6,53	0,007645	2,98	-3,22
<b>Članovi WNT signalnog puta</b>					
<i>Fzd4</i>	frizzled class receptor 4	4,69	0,00563	5,64	0,70
<i>Fzd7</i>	frizzled class receptor 7	5,43	0,018986	2,66	-2,50
<i>Fzd8</i>	frizzled class receptor 8	5,79	0,020296	2,08	-3,45
<i>Wnt4</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 4	5,75	0,024414	2,82	-2,77
<b>Članovi TGF-<math>\beta</math> signalnog puta</b>					
<i>Tgfb2</i>	transforming growth factor, beta 2	7,10	0,000358	6,19	-0,71
<i>Tgfb1</i>	transforming growth factor, beta receptor I	2,73	0,024076	6,37	3,79

<i>Tgfb3</i>	transforming growth factor, beta receptor III	4,47	0,000777	7,98	3,37
<b>Ostali geni</b>					
<i>CD200</i>	CD200 antigen	11,29	2,66×10 <sup>-6</sup>	8,74	-2,72
<i>Eng</i>	CD105, endoglin	-3,55	0,103711	-1,38	1,88
<i>Thy1</i> (CD90.1)	thymus cell antigen 1, theta	-1,03	0,753003	0,17	1,08
<i>Enpep</i> (6C3)	glutamyl aminopeptidase	6,10	0,022652	2,67	-3,10
<i>Sp7</i> (Osterix)	Sp7 transcription factor 7	7,41	0,001808	3,59	-3,49
<i>Runx2</i>	runt related transcription factor 2	7,68	0,005623	2,66	-4,30
<i>Tnfsf11</i> (RANKL)	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 (RANKL)	6,03	0,024547	1,51	-4,30
<i>Nes</i>	Nestin	1,49	0,636425	1,18	-0,27
<i>Fas</i>	Fas, CD95	6,41	0,002375	4,93	-1,68

Miševi su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) u skupini miševa s artritismom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) u neimuniziranoj (NI) skupini kontrolnih miševa. Nakon otpuštanja stanica zglobnog odjeljka pomoću kolagenaze tipa IV, staničnim razvrstavanjem aktiviranim fluorescencijom (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*) izdvojeno je do 200-500 pojedinačnih, živih (DAPI<sup>-</sup>), CD51<sup>+</sup>, neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), neendotelnih (CD31<sup>-</sup>), neleukoidnih (CD45<sup>-</sup>) CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> stanica miševa s artritismom i NI miševa te CD200<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup> stanica miševa s artritismom. Iz izdvojenih populacija su potom pripremljene knjižnice za sekvencioniranje RNA. Pet knjižnica zadovoljavajuće kvalitete iz svake pokuse skupine je sekvencionirano pomoću uređaja NextSeq 500 (Illumina). Nakon procjene kvalitete očitavanja provedena je bioinformatička analiza rezultata pomoću nekoliko javno dostupnih alata u okruženju Unix te pomoću programa R unutar sučelja Bioconductor. Različito izraženi geni smatrani su geni sa apsolutnom vrijednošću omjera promjene (FC, prema engl. *fold change*) >1,5, te razinom značajnosti p<0,05 nakon prilagodbe p vrijednosti za višestruko testiranje postupkom Benjamini-Hochberg. Prikazane su vrijednosti log<sub>2</sub>FC, prilagođene p vrjednosti i prosječni izražaj gena prikazan kao log<sub>2</sub> očitavanja na milijun očitavanja poravnanih na referentni genom (CPM, prema engl. *counts per million*) za članove obitelji BMP i Wnt i TGF-β signalnih puteva, te odabranih gena koji kodiraju za CD200, CD105, CD90, 6C3, Osterix, Runx2, RANKL i Fas.

## 5.7. Potvrda rezultata analize genskih čipova

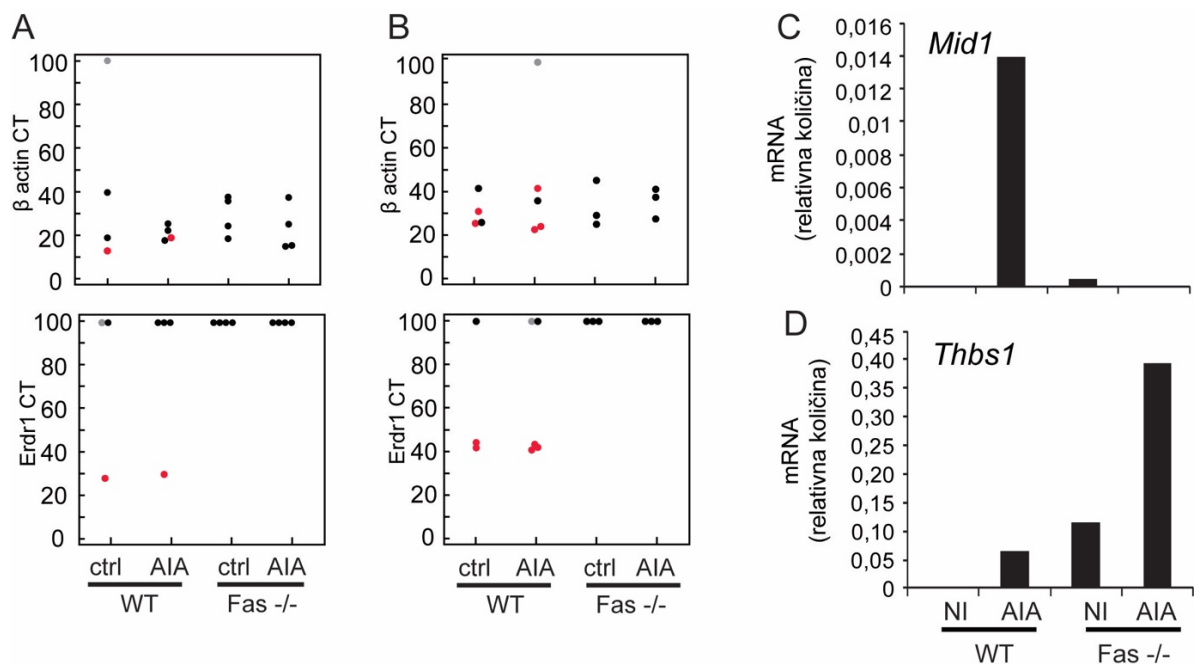
Za potvrdu valjanosti rezultata genskog čipa odabrani su geni *Mid1*, *Erdr1* i *Thbs1*, koji su bili različito izraženi u svim usporedbama transkriptoma miševa WT s resorptivnim artritismom u odnosu na miševe Fas  $-/-$  s neresorptivnim artritismom. Izražaj odabranih gena je procijenjen postupkom qPCR u izdvojenim zglobnim mijeloidnim stanicama pojedinačnih miševa nakona amplifikacije ukupnog transkriptoma, na uzorcima združenih izdvojenih mijeloidnih stanica miševa iste skupine bez amplifikacije transkriptoma, te na tkivnim ekstraktima koljena. Izražaj *Mid1* mRNA procijenjen je i na parafinskim rezovima koljenih zglobova postupkom *in situ* hibridizacije RNA, a procijenjen je i na razini bjelančevine. Rezultati analize genskih čipova upućuju na sličnost transkriptoma mijeloidnih stanica kontrolne skupine imuniziranih miševa i miševa s artritismom, koja je najvjerojatnije posljedica upalne aktivacije mijeloidnih stanica samom imunizacijom. Budući da u miševa Fas  $-/-$  izostaje nakupljanje mijeloidnih stanica i ne razvijaju se simptomi artritisa, zaključili smo da je receptor Fas ključan za imunizacijom posredovanu aktivaciju mijeloidnih stanica, koja je pak nužna za učinkovitu aktivaciju stanica specifične imunosti i time započinjanje i održavanje autoimununosne upale. Stoga su u nastavku istraživanja kao kontrolna skupina korišteni neimunizirani miševi, u svim vremenskim točkama injicirani puferom PBS. Samo je u prvom koraku validacije rezultata korištena imunizirana kontrola, jer je validacija provedena na setu uzoraka izdvojenih mijeloidnih stanica pojedinačnih miševa koji nisu iskorišteni za analizu genskim čipovima. S obzirom na malu količinu RNA u izdvojenim uzorcima pojedinačnih zglobova, provedeno je prethodno umnožavanje njihove ukupne RNA, a potom su amplikoni analizirani postupkom qPCR. Od ukupno 31 analiziranog uzorka, endogena kontrola ( $\beta$ -aktin) umnožila se u 29 uzoraka. *Erdr1* se umnožio u ukupno 7 uzoraka, od toga u 4 uzoraka miševa WT s artritismom i 3 uzorka miševa WT kontrolne skupine (Slika 24 A, B). Bez obzira na slične CT vrijednosti endogene kontrole ni u jednom uzorku miševa Fas  $-/-$  nije se umnožio gen *Erdr1* (Slika 24 A, B). Umnožavanje *Erdr1* isključivo u miševa WT potvrđuje nalaz značajno većeg izražaja tog gena u miševa WT na genskim čipovima. Zbog nedovoljne količine RNA ovim postupkom nisu valjano potvrđene razlike u izražaju *Mid1* i *Thbs1*. Stoga su za validaciju njihovog izražaja korišteni uzorci izdvojenih mijeloidnih stanica združeni iz više miševa iste skupine te je potvrđen povećan izražaj gena *Mid1* u miševa WT s artritismom u odnosu na neimunizirane kontrolne miševe WT i obje skupine miševa Fas  $-/-$ , koji vrlo slabo izražavaju ili ne izražavaju *Mid1* (Slika

24C). Također je potvrđen značajno veći izražaj gena *Thbs1* u miševa Fas  $-/-$  u odnosu na miševa WT (Slika 24D).

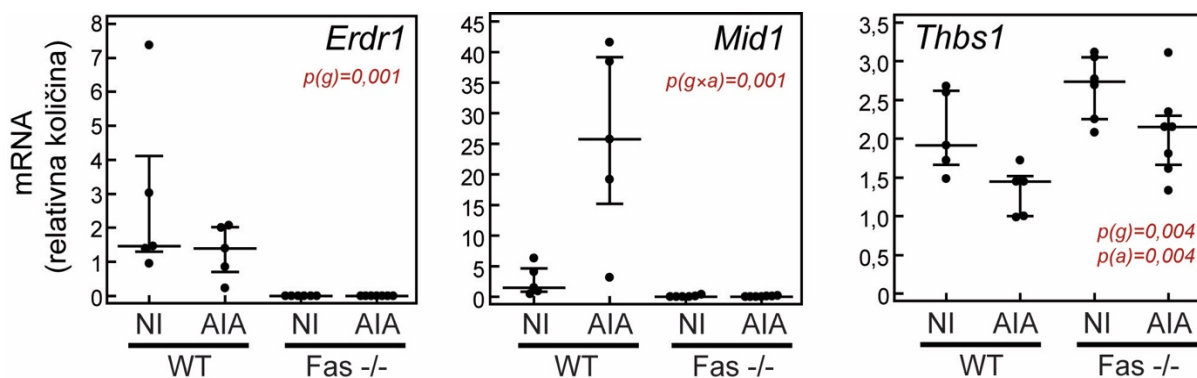
S obzirom na to da su mijeloidne stanice najzastupljenija populacija u sinovijalnom odjeljku miševa s artritismom, svrhu određivanja u kojoj mjeri razlike u izražaju gena izdvojene mijeloidne populacije odražavaju izražaj tih gena u koljenom zglobo, korištena je RNA izolirana iz ukupnog tkiva koljena. U tim uzorcima potvrđen je značajno viši izražaj gena *Erd1* u miševa WT u odnosu na miševa Fas  $-/-$  ( $p(g)=0,001$ , two-way ANOVA, Slika 25), međutim izražaj ovoga gena je konstitutivno visok i ne mijenja s pojavom artritisa (Slika 25). Nadalje je potvrđen značajno viši izražaj gena *Mid1* u koljenima miševa WT s artritismom u odnosu na koljena neimuniziranih miševa, dok je u miševa Fas  $-/-$  gen *Mid1* u obje skupine slabo izražen ili uopće nije izražen, a izostaje i njegov porast u artritisu ( $p(gxa)=0,001$ , dvosmjerna ANOVA, Slika 25). Izražaj gena *Thbs1* u koljenima miševa Fas  $-/-$  bio je značajno je viši u odnosu na miševa WT ( $p(g)=0,004$ , dvosmjerna ANOVA, Slika 25), a njegov se izražaj u koljenima smanjuje u artritisu u obje skupine ( $p(a)=0,004$ , dvosmjerna ANOVA, Slika 25).

Na parafinskim rezovima koljenih zglobova miševa WT s artritismom obilježenim postupkom *in situ* hibridizacije RNA, u subkondralnom je području vidljiv signal koji označava vezanje probe *Mid1* i prisutnost *Mid1* mRNA, koji u potpunosti nedostaje u koljenima miševa Fas  $-/-$  s artritismom (Slika 26).

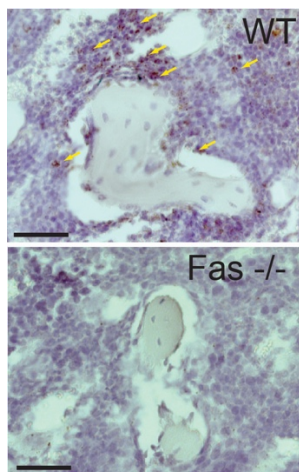
Razlika u izražaju *Mid1* ispitana je i na razini bjelančevine postupkom western blot u ekstraktima bjelančevina koljenih zglobova neimuniziranih miševa WT i Fas  $-/-$  i miševa s artritismom. Međutim protutijelo je obilježilo vrpcu veće molekulske mase 115kDa od bjelančevine *Mid1* (75kD) a otkrivena bjelančevina bila je izraženija u miševa divljega tipa s artritismom, dok je izražaj bio manji u neimuniziranih miševa i miševa Fas  $-/-$  (Slika 27).



**Slika 24. Potvrda rezultata analize genskih čipova na uzorcima izdvojenih mijeloidnih stanica zglobnog odjeljka postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR).** Miševi divljeg tipa (WT) i miševi s izbačenim genom za receptor Fas<sup>-/-</sup> su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskeg albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) u skupini miševa s artritism (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) u imuniziranoj (ctrl) i neimuniziranoj (NI) kontrolnoj skupini. Nakon opuštanja zglobnih stanica pomoću kolagenaze tipa IV postupkom razvrstavanja aktiviranog fluorescencijom (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*) izdvojena je populacija živih (DAPI<sup>-</sup>) neeritroidnih (TER119<sup>-</sup>), nelimfoidnih (CD3B220NK1.1<sup>-</sup>) stanica, koje izražavaju biljege CD11b i Gr-1 (CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>low/+</sup>). Iz izdvojene mijeloidne populacije potom je izolirana ukupna stanična RNA u kojoj je pomoću qPCR procijenjen genski izražaj. (A) U uzorcima gdje su iz koljena pojedinačnih miševa izdvojene sinovijalne mijeloidne stanice čija je RNA prethodno umnožena setom kemikalija CellAmp (Takara) te (B) u uzorcima izdvojenih i liziranih 500 sinovijalnih mijeloidnih stanica iz kojih je setom kemikalija CellAmp izravno umnožena ukupna RNA procijenjen izražaj gena *Erd1*. Prikazane su vrijednosti praga umnožavanja (CT, prema engl. *cycle threshold*) za  $\beta$ -aktin i *Erd1*. U 7 uzoraka potvrđen je izražaj gena *Erd1* (crvene oznake), u 21 uzorak umnožen je gen za  $\beta$ -aktin, a nije umnožen gen *Erd1* (crne oznake), dok u 2 uzoraka nije bilo umnožavanja (sive oznake). U svrhu povećanja količine RNA su za validaciju izražaja (C) *Mid1* i (D) *Thbs1* korišteni združeni uzorci izdvojenih mijeloidnih stanica miševa iste skupine. Relativna količina RNA u uzorku izračunata je pomoću standardne krivulje za određeni gen napravljene pomoću pet serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzorka analiziranih stanica. Relativna količina RNA u uzorku izražena je u odnosu na relativnu količinu RNA gena  $\beta$ -aktin. Analiza genskog izražaja je ponovljena tri puta, a na slici je prikazan reprezentativan pokus.

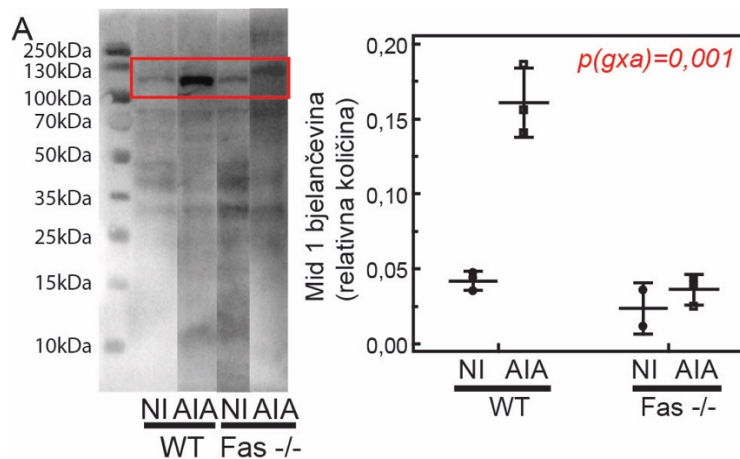


**Slika 25. Potvrda rezultata analize genskih čipova na uzorcima ukupnog tkiva koljena postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR).** Miševi divljeg tipa (WT) i miševi s izbačenim genom za receptor Fas  $-/-$  su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) u skupini miševa s artritismom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili fiziološke otopine puferirane fosfatom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) u skupini neimuniziranih miševa (NI). Za izolaciju RNA iz tkiva koljena, koljeni zglobovi su izolirani presijecanjem tibijalnih i femoralnih epifiznih ploča, te je nakon uklanjanja mišićnog tkiva i ispiranja zaostale koštane srži koljeno prebačeno u 1 ml reagensa TRIzol te usitnjeno pomoću homogenizatora za tvrda tkiva. Izražaj gena *Erdr1*, *Mid1* i *Thbs1* procijenjen je postupkom qPCR. Relativna količina RNA u uzorku izračunata je pomoću standardne krivulje za određeni gen napravljene pomoću pet serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzoraka analiziranih stanica. Relativna količina RNA u uzorku izražena je u odnosu na relativnu količinu RNA gena  $\beta$ -actin. Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 5 miševa u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).  $p(g \times a)$  - p vrijednost međudjelovanja genotipa i artritisa,  $p(g)$  - p vrijednost učinka genotipa,  $p(a)$  - p vrijednost učinka artritisa (dvosmjerna ANOVA).



**Slika 26. Analiza izražaja gena *Mid1* na parafinskim rezovima koljenih zglobova postupkom *in situ* hibridizacije (ISH) RNA.** Miševi divljeg tipa (WT) i miševi s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ) žrtvovani su 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*). ISH *Mid1* mRNA provedena je korištenjem seta kemikalija RNAscope® na frontalnim rezovima koljena debljine 6  $\mu$ m. Nakon blokiranja endogenih peroksidaza i razotkrivanja ciljnih molekula, preparati su inkubirani s probama, te uzastopnim dodavanjem 6 otopina proba za pojačanje signala. Zadnja hibridizirana proba konjugirana je s peroksidazom hrena (HRP, prema engl. *horseradish peroxidase*). Vezivanje probe stoga u prisutnosti  $H_2O_2$  oksidacijom prevodi supstrat 3,3'-diaminobenzidin (DAB) u smeđi precipitat (žute strelice). Jezgre su obojene hematoksilinom. Mjerna oznaka: 50  $\mu$ m.





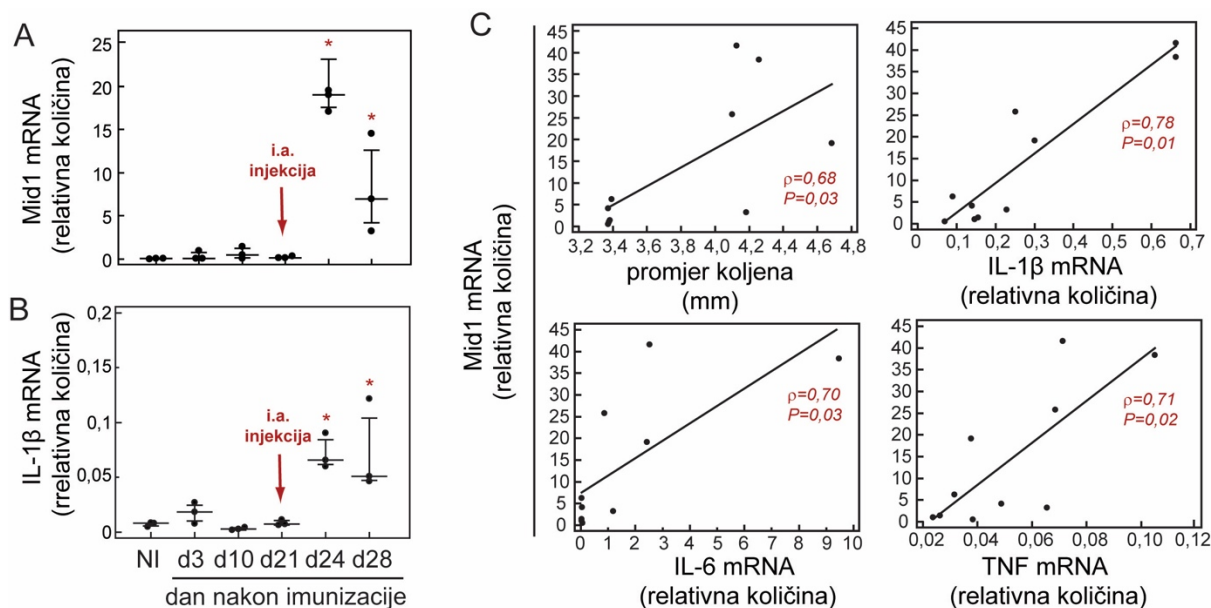
**Slika 27. Izražaj bjelančevine Mid1 u zglobovima miševa divljeg tipa (WT) i miševa s izbačenim genom za receptor Fas<sup>-/-</sup>.** Miševi su žrtvovani na 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) u skupini miševa s artritidom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili otopine fosfatnog pufera (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) u skupini neimuniziranih miševa (NI). Za izolaciju bjelančevina iz tkiva koljena, koljeni zglobovi su izolirani presijecanjem tibijalnih i femoralnih epifiznih hrskavica, te je nakon uklanjanja mišićnog tkiva koljeno odmah stavljeno u 600  $\mu$ l pufera za lizu stanica s inhibitorima proteaza i fosfataza. Tkivo je usitnjeno u homogenizatoru te potom stanice lizirane sonikacijom. Količina bjelančevine Mid1 u uzorcima je procijenjena postupkom western-blot. **(A)** Nakon inkubacije s primarnim i sekundarnim protutijelima je kemiluminiscencijom određen signal njihovog vezivanja na membranu. **(B)** Relativna količina bjelančevine Mid1 je određena u odnosu na količinu ukupnih bjelančevina u uzorku. U svakoj pokusnoj skupini su 3 životinje. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD).  $p(gxa)$  - p vrijednost međudjelovanja genotipa i artritisa,  $p(g)$  - p vrijednost učinka genotipa,  $p(a)$  - p vrijednost učinka artritisa (dvosmjerna ANOVA).

### **5.8. Izražaj gena *Mid1* tijekom artritisa potaknutog antigenom i njegova povezanost s izražajem proupalnih citokina i intenzitetom artritisa**

Budući da je uloga *Mid1* ranije opisana u bolestima posredovanim imunskim sustavom, poput alergijske upale dišnih puteva i eksperimentalnog eozinofilnog ezofagitisa (288, 289), te nizvodna uloga *Mid1* u signalizaciji TNF-vezanog liganda koji inducira apoptozu (TRAIL, prema engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand liganda*) iz obitelji liganda smrtonosnih receptora (288) nastavak istraživanja usmjeren je na ulogu *Mid1* u posredovanju lokalnog upalnog oštećenja u AIA. Prvi korak bio je određivanje vremenskog obrazasca izražaja *Mid1* u koljenim zglobovima tijekom AIA. Izražaj gena *Mid1* i upalnog citokina *IL-1 $\beta$*  određen je postupkom qPCR 3., 10. i 21. dan poslije primarne imunizacije te 3. te 7. dan poslije i.a. injekcije, odnosno 24. i 28. dan poslije primarne imunizacije.. Također je analizirana povezanost izražaja gena *Mid1* s izražajem proupalnih citokina *IL-1 $\beta$* , *IL-6* i *TNF- $\alpha$*  te promjerom koljena 10. dan nakon izazivanja artritisa, odnosno 31. dan nakon primarne imunizacije.

Nakon i.a. injekcije antigena izražaj gena *Mid1* u koljenima se značajno povećava ( $p < 0,05$ , ANOVA, Slika 28A) rano u početku bolesti, 3. dan poslije izazivanja artritisa, a prema kraju akutne faze, 7. dan poslije izazivanja artritisa, izražaj se smanjuje, ali je još uvijek povišen u odnosu na izražaj u imuniziranih miševa prije i.a. injekcije ili u neimuniziranih miševa (Slika 28A). Izražaj gena *Mid1* se 3., 10. i 21. dan poslije primarne imunizacije značajno ne razlikuje od izražaja u koljenima neimuniziranih miševa (Slika 28A). Obrazac izražaja *Mid1* slijedi obrazac izražaja citokina *IL-1 $\beta$*  tijekom AIA (Slika 28 B).

Izražaj gena *Mid1* je 10. dan artritisa, značajno pozitivno povezan s promjerom koljena ( $\rho = 0,68$ ,  $p = 0,03$ , korelacija ranga) te izražajem gena *IL-1 $\beta$*  ( $\rho = 0,78$ ,  $p = 0,01$ , korelacija ranga), *TNF- $\alpha$*  ( $\rho = 0,71$ ,  $p = 0,02$ , korelacija ranga) te *IL-6* ( $\rho = 0,70$ ,  $p = 0,03$ , korelacija ranga) (Slika 28C).

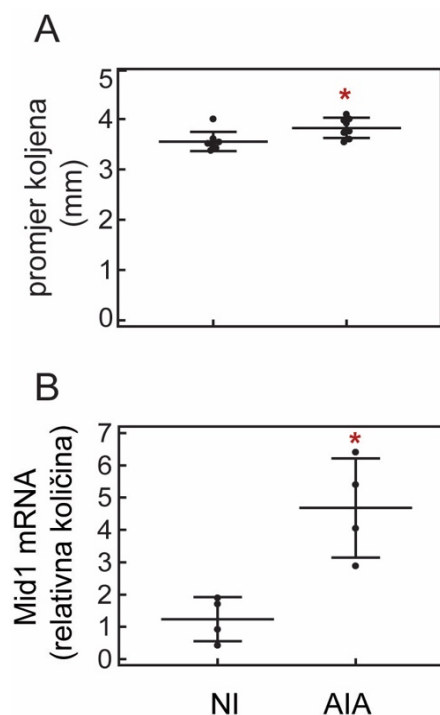


**Slika 28. Izražaj gena *Mid1* tijekom artritisa potaknutog antigenom i njegova povezanost s izražajem proupalnih citokina i zglobnom oteklinom.** Miševi divljeg tipa (WT) žrtvovani 3., 10. i 21. dan poslije primarne imunizacije i 3., 7. i 10. dan poslije intra-artikularne injekcije, odnosno 24., 28. i 31. dan poslije primarne imunizacije. Pri žrtvovanju su koljeni zglobovi izolirani presijecanjem tibijalnih i femoralnih epifiznih hrskavica. Nakon uklanjanja mišićnog tkiva koljeno je prebačeno u 1 ml reagensa TRIzol te usitnjeno pomoću homogenizatora za tvrda tkiva. Skupina neimuniziranih (NI) miševa divljeg tipa korištena je kao kontrolna skupina. (A) Izražaj *Mid1* i (B) *IL-1 $\beta$*  procijenjen 3., 10. i 21. dan poslije primarne imunizacije i 3. te 7. dan poslije intra-artikularne injekcije, odnosno 24. i 28. dan poslije primarne imunizacije postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR). (C) Povezanost izražaja gena *Mid1* s izražajem *IL-1 $\beta$* , *IL-6* i *TNF- $\alpha$*  i promjerom koljena 10. dan nakon izazivanja artritisa, odnosno 31. dan nakon primarne imunizacije. Relativna količina RNA u uzorku izračunata je pomoću standardne krivulje za određeni gen napravljene pomoću pet serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzorka analiziranog tkiva. Relativna količina RNA u uzorku izražena je u odnosu na količinu RNA gena  $\beta$  aktin. Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 3 miša u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD, A,B). Za analizu povezanosti primijenjena je korelacija ranga, pomoću koje je izračunat Spearmanov koeficijent ( $\rho$ ) i p vrijednosti. \*  $p < 0,05$  (ANOVA).

### 5.9. Izražaj *Mid1* u koljenima mužjaka miševa WT u artritisu potaknutom antigenom

S obzirom na to da se gen *Mid1* nalazi na kromosomu X te da su prethodni pokusi provedeni na ženkama, proveden je i set pokusa na mužjacima miševa WT da bi se isključio spolni dimorfizam i utvrdilo pojačava li se izražaj gena *Mid1* u mužjaka miševa WT s artritisom. Miševi su žrtvovani 10. dan nakon i.a. injekcije mBSA ili pufera PBS, pri čemu je pomičnim mjerilom izmjeren promjer koljena, a koljena su uzeta za izolaciju RNA i procjenu izražaja gena *Mid1* postupkom qPCR .

Mužjaci s artritisom imali su značajno povećan promjer koljena ( $3,83 \pm 0,2$  mm) u odnosu na neimunizirane kontrolne miševe ( $3,56 \pm 0,19$  mm,  $p=0,015$ , t test, Slika 29A). Izražaj gena *Mid1* bio je je značajno veći u mužjaka WT s artritisom u odnosu na neimuniziranu kontrolnu skupinu ( $p=0,007$ , t test, Slika 29A).



**Slika 29. Procjena artritisa i izražaja gena *Mid1* u koljenima mužjaka miševa divljeg tipa (WT) u artritisu potaknutom antigenom.** Miševi divljeg tipa (WT) su žrtvovani 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) u skupini miševa s artritisom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili otopine fosfatnog pufera (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) u skupini neimuniziranih miševa (NI). (A) Pri žrtvovanju je nakon odizanja kože kaliperom izmjeren promjer lijevog i desnog koljena. Mjerenje je za svaki zglob ponovljeno tri puta, a za analizu je korištena srednja vrijednost. (B) Za izolaciju RNA iz tkiva koljena, zglobovi su izolirani presijecanjem tibijalnih i femoralnih epifiznih hrskavica, te je nakon uklanjanja mišićnog tkiva koljeno prebačeno u 1 ml reagensa TRIzol te usitnjeno pomoću homogenizatora za tvrda tkiva. Izražaj gena *Mid1* procijenjen je postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR). Relativna količina RNA u uzorku izračunata je pomoću standardne krivulje za određeni gen napravljene pomoću pet serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzoraka analiziranog tkiva. Relativna količina RNA u uzorku izražena je u odnosu na relativnu količinu RNA gena  $\beta$  *aktin*. Pokusi su ponovljeni tri puta s minimalno 4 miša u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \*  $p < 0,05$  (t test).

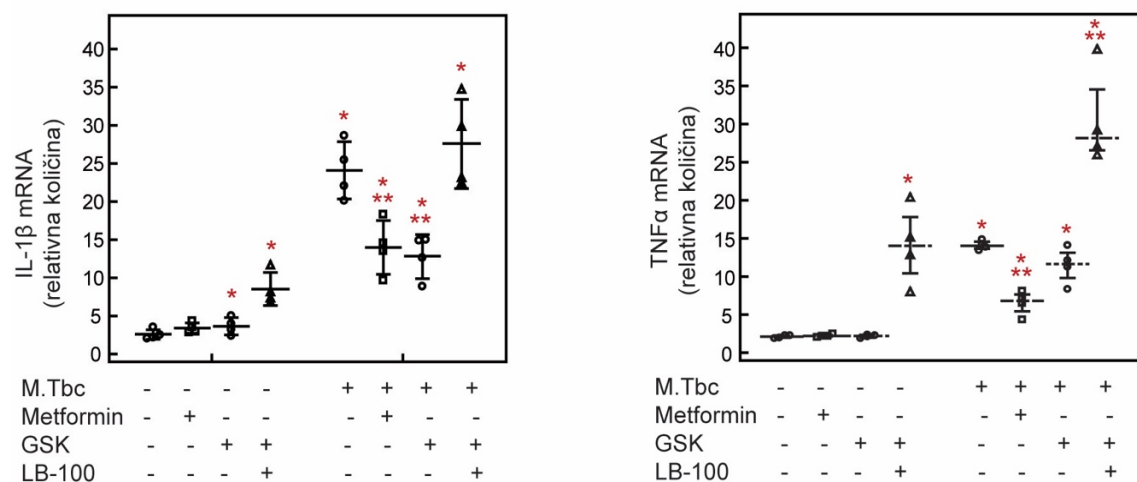
## 5.10. Učinak inhibicije Mid1 na upalna zbivanja *in vivo* i *in vitro*

S obzirom na dosadašnja istraživanja vezana uz izražaj Mid1 u upalnim bolestima, te na rezultate koji su pokazali povećanje izražaja gena *Mid1* u miševa WT s resorptivnom artritismom u odnosu na miševe Fas  $-/-$  s neresorptivnim artritismom, te na činjenicu da do povećanja izražaja *Mid1* dolazi neposredno nakon izazivanja artritisa, pretpostavka je da će inhibicija djelovanja Mid1 ublažiti artritis potaknut antigenom. Stoga je u četvrtoj fazi prvo u uvjetima *in vitro* procijenjen učinak inhibicije Mid1 na upalom potaknut izražaj proupalnih citokina u stanicama koštane srži. Potom je u dva seta pokusa *in vivo* na miševa WT procijenjen učinak inhibicije Mid1 na tijek artritisa potaknutog antigenom. U prvom setu pokusa Mid1 je inhibiran na razini mRNA, utišavanjem gena pomoću siRNA, a u drugom setu na razini bjelančevine, primjenom metformina.

### 5.10.1. Učinak inhibicije Mid1 na izražaj proupalnih citokina u upalno potaknutim stanicama koštane srži

Vežanje Mid1 za regulacijsku podjedinicu PP2A uzrokuje njenu ubikvitinilaciju i proteasomsku razgradnju. PP2A djeluje protuupalno, te je poticanje njene razgradnje pretpostavljeni mehanizam kojim Mid1 podržava upalu (288, 289). Stoga je učinak inhibicije interakcije između Mid1 i PP2A procijenjen *in vitro*, određivanjem izražaja proupalnih citokina u kulturi mišjih stanica koštane srži, koje su upalno potaknute pomoću bakterije *Mycobacterium tuberculosis* inaktivirane visokom temperaturom. *M. tuberculosis* aktivira receptor TLR2, a koristi se kao dio CFA u izazivanju artritisa. Djelovanje Mid1 je blokirano pomoću metformina ili peptida GSK'364A koji inhibiraju interakciju Mid1-PP2A (290, 291). Da bi potvrdili djelovanje Mid1 na PP2A, nakon primjene peptida GSK'364A set zdenaca je tretiran i inhibitorom aktivnosti PP2A LB-100. Izražaj gena za *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$*  je u neaktiviranim stanicama relativno nizak (Slika 30). U neaktiviranim stanicama tretiranim metforminom dolazi do blagog neznačajnog povećanja *IL-1 $\beta$* , dok se u stanicama tretiranim peptidom GSK'364A blago statistički značajno povećava izražaj *IL-1 $\beta$*  u odnosu na netretirane neaktivirane stanice ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis test, Slika 30). Izražaj *TNF- $\alpha$*  ne mijenja se nakon tretiranja stanica metforminom ili peptidom GSK'364A (Kruskal-Wallis test, Slika 30). Inhibicija aktivnosti PP2A dodavanjem LB-100 dovodi do statistički značajnog porasta izražaja gena *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$*  u odnosu na netretirane neaktivirane stanice ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis test, Slika 30).

Netretirane stanice aktivirane s *Mycobacterium tuberculosis* u usporedbi s netretiranim neaktiviranim stanicama značajno jače izražavaju *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$*  ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis test, Slika 34). Metformin značajno smanjuje izražaj *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$*  u aktiviranim stanicama ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis test, Slika 30), a peptid GSK'364 značajno smanjuje izražaj *IL-1 $\beta$*  ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis test, Slika 30) ali ne i izražaj *TNF- $\alpha$*  (Kruskal-Wallis test, Slika 30). LB-100 je u aktiviranim stanicama tretiranim peptidom GSK'364 značajno povećao izražaj *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$*  u odnosu na stanice tretirane samo peptidom GSK'364 ili metforminom. Izražaj *IL-1 $\beta$*  povećao se do razine u aktiviranim netretiranim stanicama, a izražaj *TNF- $\alpha$*  i iznad te razine ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis test, Slika 30).



**Slika 30. Učinak inhibicije međudjelovanja Mid1 i proteinske fosfataze 2A (PP2A) na izražaj proupalnih citokina u kulturi mišjih stanica koštane srži, aktiviranih bakterijom *Mycobacterium tuberculosis* inaktiviranom visokom temperaturom.** Stanice koštane srži dobivene su ispuhivanjem koštane srži bedrene i goljenične kosti miševa divljeg tipa medijem  $\alpha$ -MEM te su zasijane u pločicu sa 96 zdenaca u gustoći  $10^6$  stanica/200  $\mu$ L medija  $\alpha$ -MEM obogaćenog s 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*), 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomocina. Stanice su tretirane s 20 mM metformina ili 20  $\mu$ M peptida GSK'364A (GSK) ili 20  $\mu$ M peptida GSK'364A u kombinaciji sa 2,5  $\mu$ M LB-100. Stanice su potom inkubirane 1h na 37 °C uz 5% CO<sub>2</sub>, nakon čega su aktivirane dodavanjem 2  $\mu$ g/mL bakterije *Mycobacterium tuberculosis* inaktivirane visokom temperaturom (M.Tbc) te inkubirane preko noći na 37 °C uz 5% CO<sub>2</sub>. Izražaj gena za *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$*  određen je postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR). Relativna količina RNA u uzorku izračunata je pomoću standardne krivulje za određeni gen napravljene pomoću pet serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzorka analiziranih stanica. Relativna količina RNA u uzorku izražena je u odnosu na količinu RNA gena za  $\beta$ -aktin. U svaka pokusna skupina sastoji se od četiri uzorka dobivenih združivanjem stanica dvaju zdenaca. Prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa, koji je ponovljen tri puta. Relativna količina *IL-1 $\beta$*  mRNA je prikazana kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD), a *TNF- $\alpha$*  kao medijan  $\pm$  interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*). \*  $p < 0,05$  u odnosu na neaktivirane netretirane stanice, \*\*  $p < 0,05$  u odnosu na aktivirane netretirane stanice (Kruskal-Wallis test, post hoc test).

### 5.10.2. Učinak utišavanja gena *Mid1* *in vivo* na tijek artritisa potaknutog antigenom

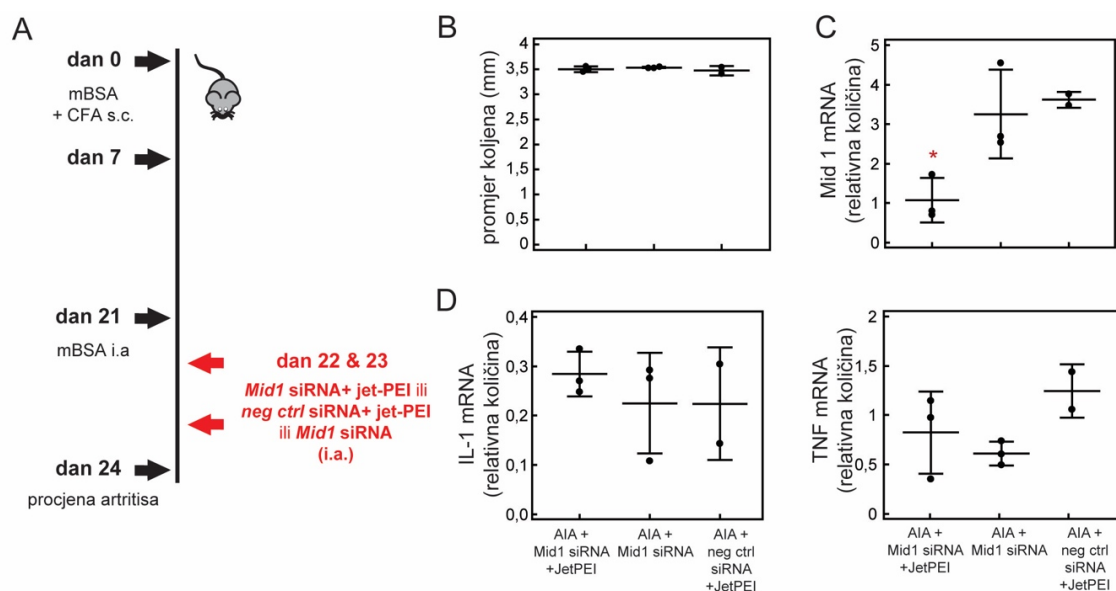
Za inhibiciju *Mid1 in vivo* na razini gena odabrana je siRNA, koja je primijenjena neposredno nakon indukcije artritisa. Proveden je set pokusa u kojima je siRNA primijenjena i.a. te pokus u kojem je siRNA primijenjena i.v..

Intraartikularno je siRNA primijenjena 1. i 2. dan nakon i.a. injekcije mBSA, odnosno 22. i 23. dan nakon primarne imunizacije (Slika 31A). Ovakav način primjene odabran je zbog najizrazitijeg povećanja izražaja gena *Mid1* rano u tijeku artritisa, a da bi se izbjeglo oštećenje zgloba brojnim i.a. injekcijama miševi su žrtvovani 3. dan artritisa (24. dan nakon primarne imunizacije), kad je izmjeren promjer koljena. Za potvrdu utišavanja gena *Mid1* te za procjenu upalne aktivnosti, u tkivnim ekstraktima koljena je postupkom qPCR određen izražaj gena *Mid1*, *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$* . Uz miševe u kojima je *Mid1* ili kontrolna siRNA injicirana pomoću sustava za primjenu *in vivo* (jet-PEI), u ovome setu pokusa korištena je i skupina miševa s artritismom kojima je injicirana samo *Mid1* siRNA, kako bih se procijenilo djelovanje sustava jet-PEI. Izražaj gena *Mid1* bio je značajno smanjen u koljenima miševa injiciranih s *Mid1* siRNA u kompleksima sa jet-PEI, u odnosu na miševa injicirane s kontrolnom siRNA u kompleksima sa jet-PEI te miševe injicirane s *Mid1* siRNA bez jet-PEI ( $p=0,027$ , ANOVA, Slika 31C). Unatoč tome, promjer koljena, kao ni izražaj gena *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$*  nisu se značajno razlikovali među pokusnim skupinama (ANOVA, Slika 31B, D).

U setu pokusa u kojima je siRNA primijenjena i.v., miševima je injicirana siRNA uz jet-PEI na dan i.a. injekcije mBSA i dva dana poslije toga, odnosno 21. i 23. dan nakon primarne imunizacije (Slika 32A). Miševi su žrtvovani 3. dan artritisa (24. dan nakon primarne imunizacije), kad je izmjeren promjer koljena. Za potvrdu lokalnog utišavanja gena *Mid1* uzeti su tkivni ekstrakti koljena, a za procjenu sustavnog utišavanja gena *Mid1* uzorci pluća i jetre. Izražaj gena *Mid1* procijenjen je postupkom qPCR. U ovome setu pokusa korišteni su samo miševi injicirani *Mid1* siRNA i kontrolnom siRNA u kompleksima sa jet-PEI, jer je u prethodnom setu pokusa potvrđena nedjelotvornost siRNA primjenjene samostalno.

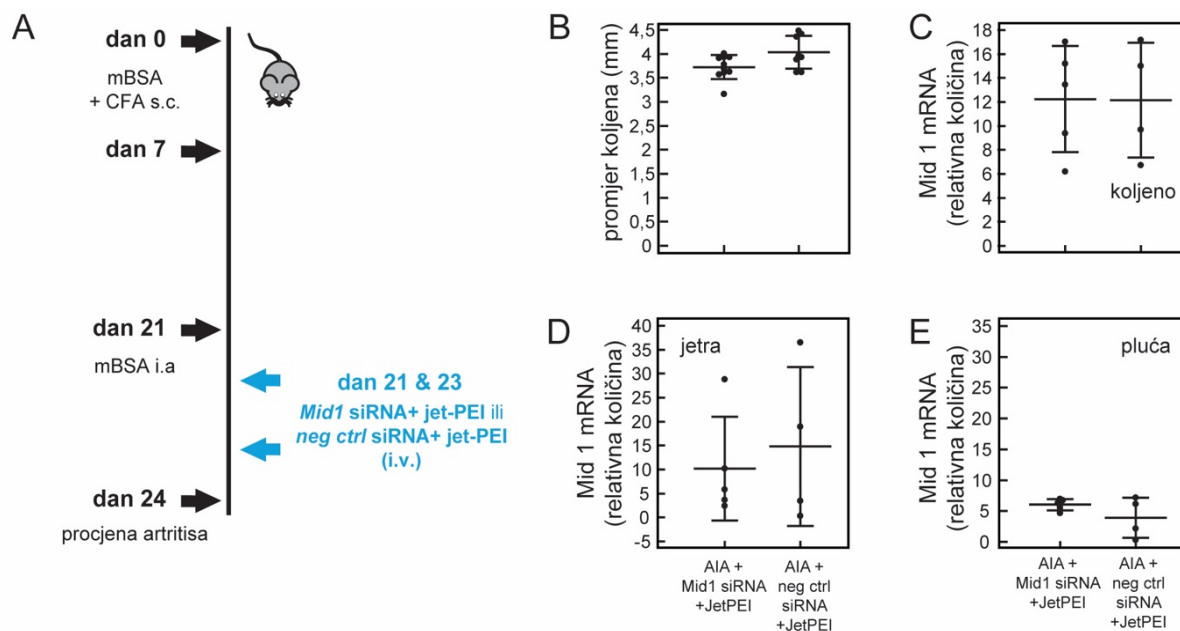
Sustavnom primjenom *Mid1* siRNA nije se smanjio izražaj *Mid1* u koljenim zglobovima u odnosu na miševe injicirane kontrolnom siRNA i netretirane miševe te nije bilo razlike u promjeru koljena miševa injiciranih s *Mid1* siRNA i kontrolnom siRNA (t test, Slika 32A). Stoga, sustavna primjena *Mid1* siRNA nije postigla smanjenje intenziteta artritisa (t test,

Slika 32B). Sustavna primjena nije imala učinka ni na izražaja gena *Mid1* u jetri (t test, Slika 32D) i plućima (t test, Slika 32E).



**Slika 31. Učinak utišavanja gena *Mid1* *in vivo* na razvoj artritisa potaknutog antigenom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) pomoću lokalne primjene male interferirajuće RNA (siRNA, prema engl. *small interfering RNA*).** (A) Miševi divljeg tipa (WT) su 1. i 2. dan nakon intra-artikularne (i.a.) injekcije metiliranog goveđeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*), odnosno 22. i 23. dan nakon primarne imunizacije sa mBSA potkožno (s.c) injicirane u potpunom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*), i.a. injicirani sa siRNA, te žrtvovani 3. dan nakon i.a. injekcije mBSA, odnosno 24. dan nakon primarne imunizacije. U dvije pokusne skupine je *Mid1* ili kontrolna (*neg ctrl*) siRNA injicirana u sustavu za primjenu *in vivo* (jet-PEI), dok je jednoj pokusnoj skupini injicirana samo *Mid1* siRNA. (B) Pri žrtvovanju je nakon odmicanja kože kaliperom izmjerena promjer lijevog i desnog koljena. Mjerenje je za svaki zglob ponovljeno tri puta, a za analizu je korištena srednja vrijednost. (C, D) Za izolaciju RNA iz tkivnih ekstrakata koljena, koljeni zglobovi su izolirani presijecanjem tibijalnih i femoralnih epifiznih ploča, te je nakon uklanjanja mišićnog tkiva koljeno prebačeno u 1 ml reagensa TRIzol te usitnjeno pomoću homogenizatora za tvrda tkiva. Izražaj gena (C) *Mid1* te (D) *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$*  procijenjen je postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR). Relativna količina RNA u uzorku izračunata je pomoću standardne krivulje za određeni gen napravljene pomoću pet serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzoraka analiziranih stanica. Relativna količina RNA u uzorku izražena je u odnosu na relativnu količinu RNA gena  *$\beta$  aktin*. Pokusi su ponovljeni tri puta s prosječno 3 miša u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa.. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \*  $p < 0,05$  (ANOVA).





**Slika 32. Učinak utišavanja gena *Mid1* in vivo na razvoj artritisa potaknutog antigenom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) pomoću sustavne primjene male interferirajuće RNA (siRNA, prema engl. *small interfering RNA*).** (A) Miševi divljeg tipa (WT) su na dan intra-artikularne (i.a.) injekcije metiliranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) i dva dana poslije toga, odnosno 21. i 23. dan nakon primarne imunizacije s mBSA potkožno (s.c) injiciranog u potpunom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*), intravenski (i.v.) injicirani sa siRNA, te žrtvovani 3. dan nakon i.a. injekcije mBSA, odnosno 24. dan nakon primarne imunizacije. Mid1 ili kontrolna (neg ctrl) siRNA injicirani su u sustavu za primjenu *in vivo* (jet-PEI). (B) Pri žrtvovanju je nakon odmicanja kože kaliperom izmjeren promjer lijevog i desnog koljena. Mjerenje je za svaki zglob ponovljeno tri puta, a za analizu je korištena srednja vrijednost. (C) Za izolaciju RNA iz tkivnih ekstrakata koljena, koljeni zglobovi su izolirani presijecanjem tibijalnih i femoralnih epifiznih ploča, te uklanjanjem mišićnog tkiva. Za izolaciju RNA iz tkiva koljena (D) jetre i (E) pluća, uzeti su komadi tkiva volumena 0,25 cm<sup>2</sup>. Izolirano tkivo je prebačeno u 1 ml reagensa TRIzol te usitnjeno pomoću homogenizatora za tvrda tkiva. Izražaj gena *Mid1* procijenjen je postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR). Relativna količina RNA u uzorku izračunata je pomoću standardne krivulje za određeni gen napravljene pomoću pet serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzoraka analiziranih stanica. Relativna količina RNA u uzorku izražena je u odnosu na relativnu količinu RNA gena *β aktin*. U pokusnim skupinama je 4-5 pokusnih životinja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD).

### 5.10.3. Učinak blokiranja bjelančevine Mid1 metforminom *in vivo* na tijek artritisa potaknutog antigenom

Aktivnost bjelančevine Mid1 blokirana je peroralnom primjenom metformina tijekom cijelog induksijskog protokola. Metformin je primijenjen u dozi od 1g/kg pomoću gastične sonde, svaka 24 sata počevši dan poslije primarne imunizacije, do žrtvovanja 10. dan artritisa (31. dan nakon primarne imunizacije) (Slika 33A). Kontrolnoj skupini miševa na isti način je primijenjena voda. Intenzitet artritisa procijenjen je pregledom koljena i mjerenjem promjera koljena na dan žrtvovanja te histološki. Učinak metformina na lokalno koštano razaranje procijenjen je analizom distalnih femoralnih epifiza postupkom  $\mu$ -CT. Izražaj gena *Mid1* i prouplanih citokina *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$*  procijenjen je pomoću qPCR, a protočnom citometrijom je analiziran udio mijeloidnih stanica.

U obje skupine miševa s artritismom promjer koljena bio je veći u odnosu na neimunizirane miševе (3,18 $\pm$ 0,1 mm), međutim promjer koljena u miševa s artritismom tretiranih metforminom (3,36 $\pm$ 0,12 mm) bio je značajno manji nego u netretiranih miševa s artritismom (3,69 $\pm$ 0,21 mm,  $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis, Tukey-Kramer post hoc, Slika 33B). Broj bodova na ljestvici vizualne procjene artritisa (0-4 boda) bio je značajno manji u miševa s artritismom tretiranih metforminom (1[0-1]) u odnosu na netretirane miševе s artritismom (3[2-3],  $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis, Tukey-Kramer post hoc, Slika 33C). Nadalje, broj bodova u skupini neimuniziranih miševima (0[0-0]) bio je značajno manji u odnosu na obje skupine s artritismom ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis, Tukey-Kramer post hoc, Slika 33C). Međutim, histološka procjena artritisa nije pokazala značajne razlike između miševa s artritismom tretiranih metforminom i netretiranih miševa, odnosno u objema skupinama bili su prisutni znakovi zglobne upale (7,5[6-9]) u AIA i 6,8[5,25-8,5]) u AIA+metformin, Kruskal-Wallis, Tukey-Kramer post hoc, Slika 33D).

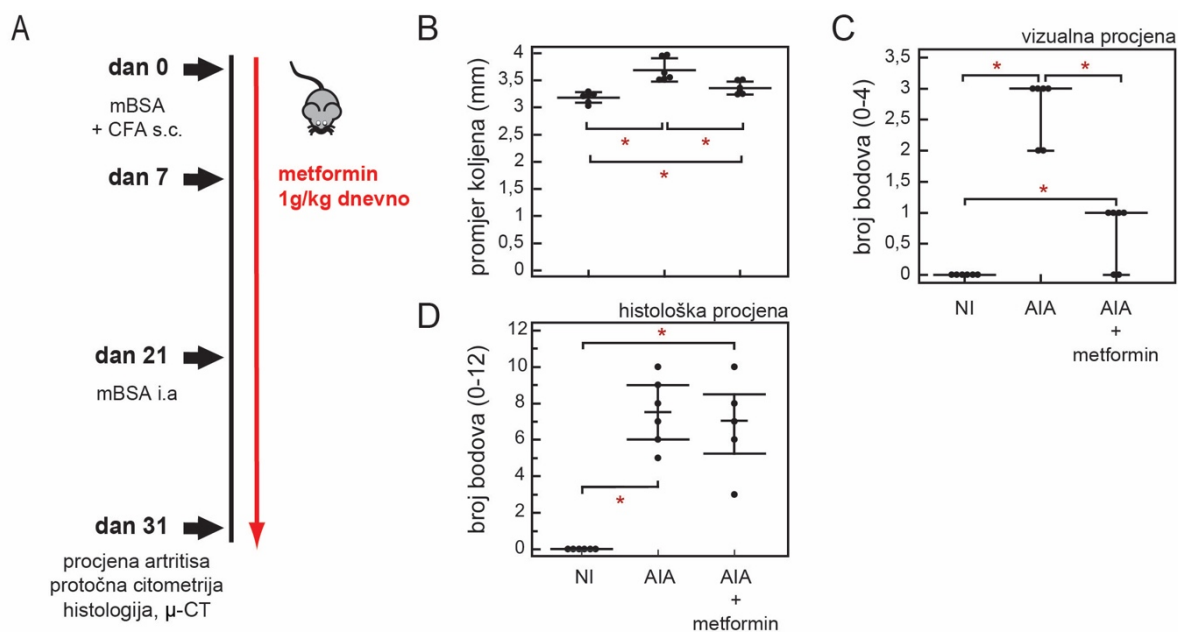
Međutim, usprkos histološki prisutnoj upali, udio volumena koštanih gredica u distalnim femoralnim epifizama je u miševa s artritismom tretiranih metforminom bio veći (42,3 $\pm$ 3,12%) u odnosu na netretirane miševе s artritismom (36,98 $\pm$ 5,8%), i nije se značajno razlikovao od udjela volumena gredica u neimuniziranih miševa (47,15 $\pm$ 4,04%, ANOVA, Slika 34). Broj gredica je u miševa s artritismom tretiranih metforminom (0,35 $\pm$ 0,01 / $\mu$ m) bio značajno veći u odnosu na netretirane miševе s artritismom (0,32 $\pm$ 0,02 / $\mu$ m, ANOVA, Slika 34), a debljina gredica je u obje skupine miševa s artritismom bila manje nego u skupini neimuniziranih miševa (1,38 $\pm$ 0,07  $\mu$ m u NI, 1,19 $\pm$ 0,08  $\mu$ m u AIA+metformin, 1,14 $\pm$ 0,13  $\mu$ m

u AIA). Razdvojenost gredica nije se značajno razlikovala među pokusnim skupinama (ANOVA, Slika 34).

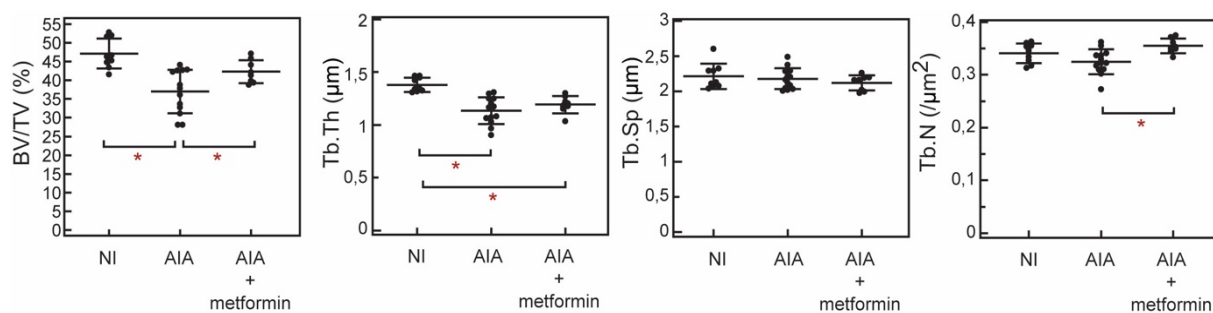
Prema očekivanjima, primjena metformina koji djeluje na razini bjelančevine u miševa s artritisom nije imala utjecaj na izražaj gena *Mid1*, koji je bio sličan izražaju u skupini netretiranih miševa s artritisom (Slika 35A). Primijećen je viši izražaj gena *Mid1* u obje skupine s artritisom u odnosu na skupinu neimuniziranih miševa, razlika nije bila statistički značajna (Kruskal-Wallis test, Slika 35A).

Izražaj gena za *TNF- $\alpha$*  bio je značajno manji u miševa s artritisom tretiranim metforminom u odnosu na netretirane miševe s artritisom ( $p < 0,03$ , t test, Slika 35B), ali primjena metformina nije značajno smanjila izražaj proupalnih citokina *IL-1 $\beta$*  i *IL-6* (t test, Slika 35B).

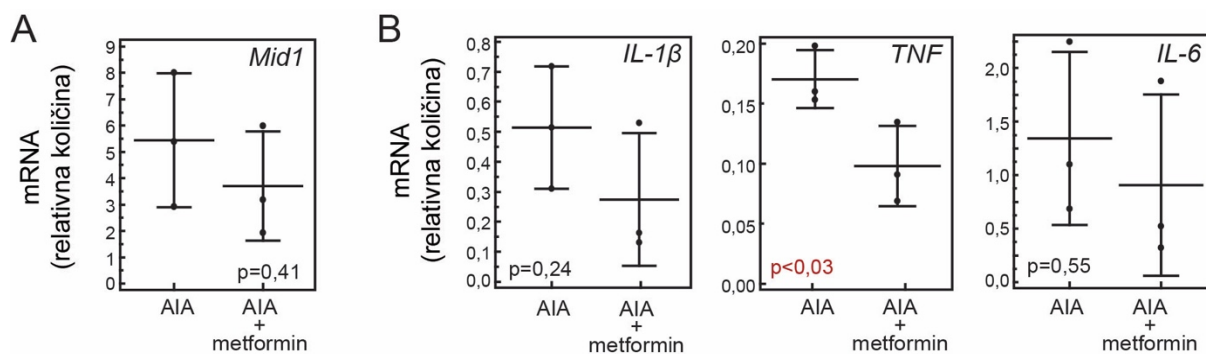
Udio zglobnih mijeloidnih stanica je u miševa tretiranim metforminom bio manji ( $36,1 \pm 1,05$ ) u odnosu na netretirane miševe s artritisom ( $46,77 \pm 11,94\%$ ), ali ova promjena nije dosegla razinu statističke značajnosti ( $p = 0,06$ , t test, Slika 36). Količinu katalitičke podjedinice određivali smo u ograničenom broju uzoraka bjelančevina izoliranih iz tkiva koljena ( $n = 3$ ) te iako je vidljivo blaže povećanje količine katalitičke podjedinice enzima PP2A (PP2Ac) razlika nije dosegla razinu statističke značajnosti (t test, Slika 37).



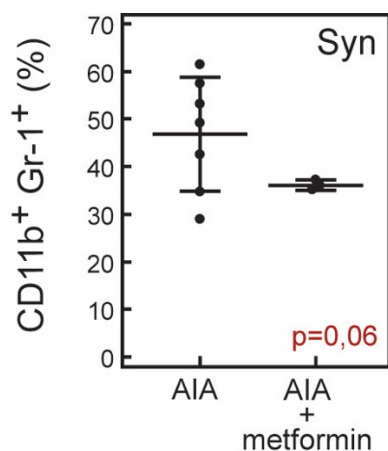
**Slika 33. Učinak metformina primjenjenog *in vivo* na intenzitet artritisa potaknutog antigenom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*).** (A) Metformin je u miševa divljeg tipa primijenjen u dozi od 1g/kg pomoću gastične sonde, u 200  $\mu$ l vode, svakih 24 sata počevši dan poslije primarne imunizacije s metiliranim goveđim serumskim albuminom (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) potkožno (s.c) injiciranim u potpunom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*), do žrtvovanja 10. dan nakon intra-artikularne (i.a.) injekcije mBSA, odnosno 31. dan nakon primarne imunizacije. Kontrolnoj skupini miševa s artritism (AIA) je tijekom imunizacijskog te indukcijuskog protokola na isti način pomoću gastične sonde primijenjena voda. Skupina neimuniziranih (NI) miševa divljeg tipa korištena je kao kontrola. (B) Pri žrtvovanju je nakon odizanja kože kaliperom izmjeren promjer lijevog i desnog koljena. Mjerenje je za svaki zglob ponovljeno tri puta, a za analizu je korištena srednja vrijednost. (C) Vizualna procjena artritisa pregledom provedena je za lijevo i desno koljeno prema sljedećem sustavu bodovanja: 0-nema upale, 1-bлаго lokalizirano zamućenje zglobne ovojnice, 2- blaža zglobna oteklina, gubitak konture patelarnog ligamenta, 3-jasna oteklina oteklina zgloba difuzno zamućenje ovojnice 4 -jaka oteklina zgloba s vidljivom deformacijom. (D) Histološka procjena artritisa napravljena je na frontalnim rezovima koljena debljine 6  $\mu$ m obojenim postupkom Goldner Masson trikrom i toluidinskom plavilom. Prema ljestvici prikazanoj u Tablici 1 su sa 0-3 boda u svakom koljenom zglobu procijenjena 4 parametra: celularnost sinovije, eksudat u zglobnom prostoru te oštećenje zglobne hrskavice i kosti. Zbrajanjem bodova pojedinih parametra zglobne upale izračunat je ukupni zbroj bodova, koji maksimalno iznosi 12. Pokusi su ponovljeni tri puta s najmanje 3 miša u svakoj pokusnoj skupini, a prikazani su rezultati reprezentativnog pokusa. Vrijednosti pomjera koljena su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) te broj bodova kao medijan  $\pm$  interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*). \*  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis test, Tukey-Kramer post hoc test).



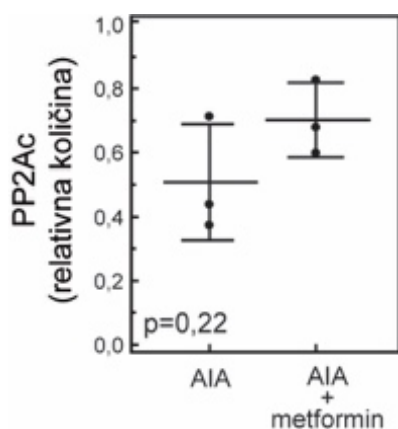
**Slika 34. Učinak metformina primjenjenog *in vivo* u tijeku artritisa potaknutog antigenom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) na subhondralnu kost procijenjenu mikro-kompjutoriziranom tomografijom ( $\mu$ -CT).** (A) Metformin je u miševa divljeg tipa primijenjen u dozi od 1g/kg pomoću gastrične sonde, u 200  $\mu$ l vode, svakih 24 sata počevši dan poslije primarne imunizacije s metiliranim goveđim serumskim albuminom (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) potkožno (s.c) injicirane u potpunom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*), do žrtvovanja 10. dan nakon intra-artikularne (i.a.) injekcije mBSA, odnosno 31. dan nakon primarne imunizacije. Kontrolnoj skupini miševa s artritismom (AIA) je tijekom imunizacijskog te induksijskog protokola pomoću gastrične sonde je primijenjena voda. Skupina neimuniziranih (NI) miševa divljeg tipa korištena je kao kontrola. Koljena su snimljena uređajem SkyScan 1076 (Bruker, Kontich, Belgija) na svakih 0.4° rotacije izvora, uz rezoluciju 9  $\mu$ m, i aluminijski filter debljine 0.5 mm, napon 50 kV te jakost struje 200  $\mu$ A. Snimke su rekonstruirane pomoću programa NRecon (Bruker) te analizirane pomoću programa CTAn (Bruker). U odsječku duljine 300  $\mu$ m, između epifizne hrskavice i visine razdvajanja femoralnih kondila određeni su udio volumena (BV/TV, prema engl. *bone volume/total volume*, %) te broj (Tb.N, prema engl. *trabecular number*, /mm), debljina (Tb.Th, prema engl. *trabecular thickness*,  $\mu$ m) i razdvojenost (Tb.Sp, prema engl. *trabecular separation*,  $\mu$ m) koštanih gredica. Prikazani su združeni rezultati 2 pokusa, a najmanji broj miševa po skupini je 8. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). \*  $p < 0,05$  (one-way ANOVA, Tukey-Kramer *post hoc* test).



**Slika 35. Učinak metformina primjenjenog *in vivo* u tijeku artritisa potaknutog antigenom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) na izražaj gena *Mid1*, *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$* .** (A) Metformin je u miševa divljeg tipa primijenjen u dozi od 1g/kg pomoću gastrične sonde, u 200  $\mu$ l vode, svakih 24 sata počevši dan poslije primarne imunizacije s metiliranim goveđim serumskim albuminom (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) potkožno (s.c) injicirane u potpunom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*), do žrtvovanja 10. dan nakon intra-artikularne (i.a.) injekcije mBSA, odnosno 31. dan nakon primarne imunizacije. Kontrolnoj skupini miševa s artritismom (AIA) je tijekom imunizacijskog te induksijskog protokola pomoću gastrične sonde je primijenjena voda. Za izolaciju RNA iz tkiva koljena, zglobovi su izolirani presijecanjem tibijalnih i femoralnih epifiznih hrskavica, te je nakon uklanjanja mišićnog tkiva koljeno odmah stavljeno u 1ml reagensa TRIzol te usitnjeno pomoću homogenizatora za tvrda tkiva. Izražaj gena (A) *Mid1* te (B) *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$*  i *IL-6* procijenjen je postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR). Relativna količina RNA u uzorku izračunata je pomoću standardne krivulje za određeni gen napravljene pomoću pet serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzoraka analiziranih stanica. Relativna količina RNA u uzorku izražena je u odnosu na količinu RNA  $\beta$  *actin* gena. U svakoj pokusnoj skupini su 3 životinje. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). p, t test.



**Slika 36. Učinak metformina primjenjenog *in vivo* u tijeku artritisa potaknutog antigenom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) na udio mijeloidnih stanica u zglobnom odjeljku.** (A) Metformin je u miševa divljeg tipa primijenjen u dozi od 1g/kg pomoću gastične sonde, u 200  $\mu$ l vode, svakih 24 sata počevši dan poslije primarne imunizacije s metiliranim goveđim serumskim albuminom (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) potkožno (s.c) injicirane u potpunom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*), do žrtvovanja 10. dan nakon intra-artikularne (i.a.) injekcije mBSA, odnosno 31. dan nakon primarne imunizacije. Kontrolnoj skupini miševa s artritismom (AIA) je tijekom imunizacijskog te indukcijuskog protokola pomoću gastične sonde je primijenjena voda. Nakon pripreme jednostanične suspenzije, stanice su obilježene protutijelima konjugiranim fluorescentnim bojama usmjerenim na mijeloidne biljege. Udio CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> stanica određen je u populaciji živih (7AAD<sup>-</sup>) stanica. U svakoj eksperimentalnoj skupini su najmanje 3 pokusne životinje. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). p, t test.



**Slika 37. Učinak metformina primjenjenog *in vivo* u tijeku artritisa potaknutog antigenom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) na količinu katalitičke podjedinice proteinske fosfataze 2A (PP2Ac) u koljenim zglobovima.** Metformin je u miševa divljeg tipa primijenjen u dozi od 1g/kg pomoću gastične sonde, u 200  $\mu$ l vode, svakih 24 sata počevši dan poslije primarne imunizacije s metiliranim goveđim serumskim albuminom (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) potkožno (s.c) injicirane u potpunom Freundovom adjuvansu (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*), do žrtvovanja 10. dan nakon intra-artikularne (i.a.) injekcije mBSA, odnosno 31. dan nakon primarne imunizacije. Kontrolnoj skupini miševa s artritismom (AIA) je tijekom imunizacijskog te indukcijuskog protokola pomoću gastične sonde je primijenjena voda. Za izolaciju bjelančevina iz tkiva koljena, zglobovi su izolirani presijecanjem tibijalnih i femoralnih epifiznih hrskavica, te je nakon uklanjanja mišićnog tkiva koljeno odmah stavljeni 600  $\mu$ l pufera za lizu stanica obogaćenog s inhibitorima proteaza i fosfataza. Tkivo je usitnjeno u homogenizatoru te su potom stanice lizirane sonikacijom. Količina PP2Ac u uzorcima je procijenjena metodom western blot. Relativna količina PP2Ac je određena u odnosu na količinu ukupnih bjelančevina u uzorku. U svakoj pokusnoj skupini su 3 životinje. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). p, t test.

## 6. Rasprava

### 6.1. Ublaženi oblik artritisa potaknutog antigenom u miševa Fas $-/-$ obilježavaju promjene u staničnom sastavu zglobnog odjeljka

Rezultati ovoga istraživanja potvrđuju ulogu funkcionalnog receptora Fas u mišjem artritisu potaknutom antigenom te pobliže određuju stanične populacije koje mijenjaju tijekom artritisa u miševa Fas  $-/-$ .

Uz našu istraživačku skupinu, ublažavajući učinak nedostatka sustava Fas/FasL u različitim pokusnim modelima artritisa pokazale su i druge skupine. Tu-Rapp i sur. pokazali su da miševi *lpr* soja DBA/J1 razvijaju blaži oblik CIA (280), koji nastaje zbog poremećenog proupalnog odgovora makrofaga na aktivaciju receptora za IL-1 i receptora TLR4, čime je u tim stanicama smanjena aktivacija signalnog puta NF $\kappa$ B (281). Nadalje, pokazano je, da inaktivacija receptora Fas u stanicama mijeloidne loze skraćuje kroničnu fazu artritisa K/BxN (282). Ublažavajući učinak nedostatka sustava Fas/FasL opisan je i u modelima drugih autoimunskih bolesti, primjerice u pokusnom autoimunskom encefalomijelitisu (283) te modelu dijabetesa tipa I (284). Ove studije upućuju na važnost receptora Fas u poticanju autoimunskog zbivanja djelovanjem na stanice imunskog sustava. Pored učinka na stanice imunskog sustava, sustav Fas/FasL može potaknuti i autoimunsko oštećenje tkiva u artritisu izravnim djelovanjem na kost i hrskavicu, primjerice izazivajući apoptozu kondrocita (279). Naša istraživačka skupina detaljno je karakterizirala ublaženi oblik AIA u miševa s genskom inaktivacijom receptora Fas (200) te opisala smanjenu apoptozu sinovijalnih koštano-hrskavičnih prethodnika kao jedan od mehanizama suprotstavljanja zglobnom oštećenju u tih miševa (141). Ovi rezultati u skladu su s rezultatima ranijih studija koje su opisale važnost sustava Fas/FasL u nadzoru nad koštanom homeostazom (231, 251-253).

S druge strane, opisani su i suprotni učinci sustava Fas/FasL na artritis i druge autoimunske bolesti. Primjerice, narušena periferna tolerancija u miševa s inaktivacijom receptora i liganda Fas dovodi do nakupljanja autoprotutijela (190, 193, 202), te u *lpr* i *gld* miševa temeljnog soja MRL čak do razvoja artritisa (326, 327). Na apoptozu posredovanu receptorom Fas osjetljivi su sinovijalni fibroblasti, koji u RA zglobovima podržavaju upalu i koštanu resorpciju (30, 35, 36, 285), te bi aktivacija receptora Fas u tim stanicama mogla imati povoljno djelovanje na tijek artritisa (285).

Razlike u rezultatima dosadašnjih istraživanja mogu se pripisati širokom izražaju receptora Fas na različitim tipovima stanica, pri čemu je poznato da njegova aktivacija može, ovisno o tipu stanice, stadiju sazrijevanja i okolišu u kojem se nalazi, aktivirati različite signalne puteve. Stoga je za točno definiranje uloge receptora Fas u artritisu ključno razjasniti njegovu ulogu u pojedinim staničnim populacijama uključenim u patogenezu RA te definirati lozno-specifične signalne puteve i molekularne posrednike uključene u prijenos signala. S obzirom da je koštano oštećenje u artritisu jedan od glavnih čimbenika koji uvjetuje razvoj trajnih deformacija, u ovom istraživanju smo se koncentrirali ne samo na međudnos pojedinih staničnih populacija sa zglobnom upalom već i na njihov odnos s lokalnim oštećenjem kosti. Lokalni gubitak kosti karakterističan je za RA, a manifestira se koštanim erozijama, odnosno fokalnim gubitkom kosti te periartikularnom osteopenijom (116). Uz lokalno oštećenje, gubitak kosti u RA odvija i na sustavnoj razini (116), a taj se gubitak pripisuje visokim koncentracijama proupalnih citokina, i pojavljuje se i u tijeku drugih autoimunskih bolesti (145). Lokalni gubitak koštanih gredica se u životinjskim modelima artritisa standardno procjenjuje u metafizama kostiju uz zahvaćeni zglob, no prema istraživanjima provedenim na mišjem modelu AIA u našem laboratoriju, u kojima su uspoređivani imunizirani kontrolni miševi s neimuniziranim miševima se osteopenija u metafizama razvija kao posljedica imunizacije, neovisno o postojanju artritisa, te je prema tome po nastanku slična sustavnoj osteopeniji koja prati autoimunosne bolesti (328). Međutim, lokalno koštano razaranje na koje se usredotočuje ovo istraživanje posljedica je lokalnih patoloških zbivanja koja su specifična za RA, a u modelu AIA bolje ga odražava stanje koštanih gredica u distalnim epifizama bedrenih kostiju (328).

Epifizne koštane promjene u miševa divljega tipa s AIA dobro odražavaju resorptivne promjene koje se pojavljuju u RA, dok su miševi Fas<sup>-/-</sup> zaštićeni od gubitka subhondralne kosti. Jedan od mogućih mehanizama je smanjen broj ili aktivnost stanica imunskog sustava te posljedično smanjeno lučenje upalnih posrednika, koji potiču koštanu resorpciju, dok je drugi mehanizam izostanak apoptoze koštanih stanica ili njihovih prethodnika. U zglobu zahvaćenom artritisom nalaze se brojne stanične populacije, primjerice stanice imunskog sustava i upalno promijenjeni sinovijalni fibroblasti, koji izražavanjem RANKL-a, lučenjem citokina koji potiču izražaj RANKL-a na drugim stanicama ili lučenjem citokina koji izravno djeluju na koštane stanice koče koštanu izgradnju ili potiču koštanu resorpciju (125). Receptor Fas izražen je na velikom broju stanica u upaljenom zglobu zbog čega ublažavanje artritisa može biti posljedica promjene u bilo kojoj populaciji stanica imunskog sustava. Fas



i FasL izraženi su i na osteoblastima (231-233, 235) i osteoklastima (231, 238-240), te aktivacija receptora Fas može potaknuti apoptozu oba tipa stanica, ili djelovati na njihovu diferencijaciju (231, 245, 246). U nekoliko studija provedenih na mišjim modelima pokazano je da nedostatak sustava Fas/FasL *in vivo* podržava koštanu izgradnju (231, 251-253), te djeluje zaštitno u drugim pokusnim modelima praćenim gubitkom kosti poput gubitka estrogena izazvanog ovarijektomijom ili mišjeg modela CIA (231, 251, 280). Ovi rezultati sukladni su s izostankom koštanog razaranja u AIA miševa Fas  $-/-$ .

S obzirom da zaštitna uloga inaktivacije receptora Fas može biti posredovana promjenama u bilo kojoj od opisanih staničnih populacija u zglobnom odjeljku ili periartikularnoj koštanoj srži, prvi korak u utvrđivanju staničnih posrednika koštane resorpcije bio je analiza staničnog sastava zglobnog odjeljka i periartikularne koštane srži miševa divljeg tipa s resorptivnim artritismom te njegova usporedba sa staničnim sastavom istih odjeljaka u miševa Fas  $-/-$ , i procjena povezanosti udjela promijenjenih populacija s oštećenjem subhondralne kosti.

#### **6.1.1. Promjene u hematopoetskim populacijama u artritisu miševa Fas $-/-$**

Rezultati ovog istraživanja su pokazali, da u miševa Fas  $-/-$ , za razliku od miševa divljega tipa, u artritisu izostaje nakupljanje stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup> i makrofaga (F4/80<sup>+</sup>). Populaciju CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> čine granulociti, većinom neutrofili, te klasični monociti, makrofagi, neki tipovi dendritičkih stanica i MDSC (329, 330), dok u populaciji CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup> dominiraju neklasični monociti. Smanjen izražaj biljega Gr-1 također je karakterističan za nezrele prethodnike mijeloidne loze, poput prethodnika granulocita, monocita i osteoklasta, u koštanoj srži (331, 332).

Nakupljanje stanica mijeloidne loze već je opisano u pokusnim mišjim modelima artritisa. Wipke i sur. pokazali su da su neutrofili dominantna populacija u zahvaćenom zglobu miševa s artritismom izazvanim prijenosom seruma miševa K/BxN (65), a Tanaka i sur. pokazali su dominaciju neutrofila u zglobu miševa s artritismom potaknutom protutijelima na kolagen II i LPS-om (66). Nakupljanje stanica mijeloidne loze, posebice neutrofila i makrofaga opisano je i u sinoviji bolesnika s RA u akutnoj, subakutnoj i kroničnoj fazi bolesti (45, 333). U akutnom RA, neutrofili čine čak 80-90% sinovijalnog staničnog eksudata (56), a njihova se prisutnost opisuje i u panusu (334) te u zadebljanoj sinovijalnoj ovojnici (45). Nadalje,

nekoliko studija opisalo je smanjenu apoptozu te povećano preživljavanje neutrofila u reumatoidnom zglobu, što doprinosi njihovom nakupljanju (63, 335).

Iako znamo da su za razvoj RA, zbog prepoznavanja auto-antigena i stvaranja auto-protutijela ključni limfociti T i B (68), poznato je da je za započinjanje i održavanje upale u autoimunskim bolestima važan čimbenik upalna aktivacija stanica urođene imunosti, poput granulocita i makrofaga (336). Važnost neutrofila u započinjanju i održavanju zglobne upale u RA potvrđuju radovi koji u različitim mišjim modelima pokazuju učinak deplecije neutrofila na sprječavanje ili ublažavanje artritisa. Deplecija neutrofila u potpunosti sprječava razvoj artritisa K/BxN (65). U artritisu potaknutom protutijelima na kolagen II i LPS-om, blokada Gr-1 sprječava razvoj artritisa, a njegova primjena u fazi potpuno razvijene bolesti ublažava njezin tijek (66). Miševi s izbačenim genom za G-CSF u modelu CIA imaju smanjenu mobilizaciju granulocita iz koštane srži, te smanjenu aktivaciju mijeloidnih stanica u zglobu, te su zaštićeni od razvoja akutnog i kroničnog artritisa, a primjena protutijela protu-G-CSF u već razvijenom artritisu koči njegovo napredovanje (337). Blokada M-CSF (338) i blokada adhezijske molekule Mac-1, u čijem je sastavu biljeg CD11b, također ublažuju tijek CIA (339). Primjena G-CSF u pacijenata s aktivnim RA, te primjena M-CSF u miševa i G-CSF u miševa ili štakora s CIA izazivaju pogoršanje bolesti (338, 340, 341).

Rezultati ovog istraživanja također upućuju na izravnu povezanost zastupljenosti mijeloidne populacije zglobu s jačinom zglobne upale, a udio stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> povezan je i sa subhondralnim gubitkom kosti, što upućuje na uključenost stanica mijeloidne loze u poticanju i održavanju zglobne upale i važnost granulocita u koštanom oštećenju. Potencijal neutrofila za izazivanje zglobnog oštećenja u RA prepoznat je u brojnim studijama a uključuje lučenje kemotaksijskih citokina, enzima koji razgrađuju izvanstanični matriks te ROS (57, 342). Štoviše, pokazano je da neutrofilu u određenim uvjetima izražavaju RANKL (59), a prema nekim autorima čak su glavni izvor RANKL u RA sinoviji (343).

U resorptivnom AIA, u sinovijalnom prostoru povećan je i udio ostalih stanica mijeloidne loze, primjerice makrofaga i monocita što je sukladno rezultatima istraživanja, koja pokazuju da ove stanice lučenjem citokina i kemokina pojačavaju zglobnu upalu (48). Broj makrofaga u sinoviji povezan je kliničkom slikom RA (45, 47, 344). Nadalje, makrofazi luče ROS i MMP (51), i glavni su izvor proupalnog i proresorptivnog citokina TNF- $\alpha$  u RA sinoviji (48). Sukladno tomu je udio makrofaga u našem istraživanju bio povezan sa zglobnom upalom i gubitkom subhondralne kosti.

Izostanak nakupljanja mijeloidnih stanica u zglobovima miševa bez funkcionalnog receptora Fas upućuje na važnost sustava Fas/FasL u aktivaciji stanica prirodene imunosti u tijeku artritisa te je u skladu s ranijim studijama koje opisuju blaži oblik CIA u miševa *lpr* i skraćenje kronične faze artritisa K/BxN u miševa s mijeloidno-specifičnom inaktivacijom receptora Fas (280-282).

Uz mijeloidne stanice, u miševa Fas  $-/-$  izostaje i nakupljanje limfocita T u zglobovima, pri čemu je njihov udio povezan s gubitkom subhondralne kosti, ali ne i sa zglobnom upalom. Autoreaktivni limfociti T nužni su za razvoj RA, a u zglobovima predstavljaju nisko zastupljenu populaciju (0-5% stanica) odnosno dominaciju upalne u odnosu na autoimunostu komponentu bolesti. Udio limfocita B u sinoviji smanjen je u artritisu i to podjednako u miševa oba soja, što je najvjerojatnije posljedica opisane predominacije mijeloidnih stanica, koje istiskuju ostale loze. Za razliku od zglobova, hematopoetske populacije u periartikularnoj koštanoj srži nisu bile značajno promijenjene u miševa Fas  $-/-$  s artritisom u odnosu na miševe divljeg tipa. Periartikularna koštana srž miševa Fas  $-/-$  sadržavala je više limfocita T, što je u skladu s njihovim opisanim fenotipom (202). Udio stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> u periartikularnoj srži bio je manji u miševa Fas  $-/-$ . Izostanak promjena u udjelima stanica periartikularne srži objasnili smo u izdvojenoj studiji koja je uspoređivala njen sastav u imuniziranih miševa sa sastavom perartikularne koštane srži neimuniziranih miševa, pri čemu smo utvrdili da imunizacijski protokol, koji uključuje primjenu CFA, izaziva upalnu aktivaciju i višestruko povećanje udjela stanica CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> u koštanoj srži, koje je bilo povezano s gubitkom metafiznih koštanih gređica, odnosno pojavom sustavne osteopenije (328). S indukcijom artritisa taj se udio dalje ne povećava. Smanjenje udjela limfocita B i makrofaga u periartikularnoj koštanoj srži u suprotnosti su sa studijama provedenim na uzorcima bolesnika s RA koje opisuju dominantno limfocitno-makrofagni infiltrat (85-89). Razlog tomu je s jedne strane predominacija granulocita u subakutnom AIA, a i činjenica da su istraživanja provedena na citološkom materijalu bolesnika s RA uglavnom provode u kroničnoj fazi bolesti RA, koji ne odgovara našem pokusnom modelu.

### 6.1.2. Promjene u mezenhimalnim populacijama u artritisu miševa Fas –/–

Uz promjene udjela upalnih mijeloidnih stanica ovo istraživanje je detaljnije karakteriziralo populacije koje fenotipski odgovaraju populacijama koštano hrskavičnih prethodnika u zglobnom odjeljku te su utvrđene njihove razlike u odgovoru na artritis. Udio stanica CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> u ukupnoj nehematopoetskoj populaciji bio je smanjen u artritisu miševa divljeg tipa s artritisom, a nepromijenjen u artritisu miševa Fas –/–. Te su promjene bile praćene odgovarajućom, suprotnom promjenom udjela stanica CD200<sup>-</sup>. Stanice CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> u odnosu na populaciju CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> karakterizira pojačan izražaj gena vezanih uz regulaciju i diferencijaciju koštanog sustava te gena vezanih uz biologiju matičnih stanica, što upućuje na to da te stanice predstavljaju koštano-hrskavične prethodnike zglobnog odjeljka, slično mSSC čiji su fenotip u koštano tkivu detaljno karakterizirali Chan i sur. i u njima opisali sličan transkripcijski profil (43). Za razliku od koštanih CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> mSSC, stanice opisane u ovom istraživanju pojačano izražavaju antagonist bjelančevina BMP *Gremlin 1*, što je s druge strane sukladno s prethodno opisanim izražajem tog gena u periostalnoj populaciji mSSC, te u koštanoj srži kao i u metafizama dugih kostiju (345-347). Nadalje, zglobna populacija mSSC karakterizirana u ovome istraživanju pokazuje pojačan izražaj gena *LepR*, također opisanog i korištenog kao biljega za mSSC u koštanoj srži (348, 349), što dodatno potvrđuje prethodnički identitet analiziranih stanica. Ova populacija također ima značajno veći izražaj gena za receptor Fas koji upućuje na njihovu veću osjetljivost na apoptozu. Iako je udio ove populacije smanjen u resorptivnom artritisu miševa WT, njezin se transkriptom u artritisu u usporedbi sa zdravim životinjama ne mijenja, što upućuje na očuvanu funkciju tih stanica. Karakterizirajući populaciju CD200<sup>+</sup>CD105<sup>-</sup> izdvojenu iz mišjih zglobova *in vitro* pokazali smo njihov pojačan membranski izražaj receptora Fas te funkcionalno, veću osjetljivost na apoptozu potaknutu agonističkim protu-Fas protutijelom (141). Međutim funkcionalno istraživanje ove populacije *in vivo* otežano je zbog njezine niske frekvencije. Ovo istraživanje stoga izravno *in vivo* potvrđuje pretpostavku ranije objavljene studije da su najraniji zglobni koštani prethodnici osjetljivi na apoptozu posredovanu receptorom Fas zbog koje se u artritisu pojačano uklanjaju, što smanjuje sposobnost obnove subhondralne kosti djelovanjem osteoblasta, za koju je poznato da je u artritisu nedostatna (350, 351). U miševa Fas –/– povećan je udio stanica CD200<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup> za koje nismo transkriptomskom analizom potvrdili prethodnički karakter, iako fenotipski ta populacija odgovara populaciji usmjerenih koštanih prethodnika. Reaktivni sinovijalni fibroblasti također mogu izražavati CD105 te se ova populacija najvjerojatnije sastoji od

kombinacije usmjerenih prethodnika i sinovijalnih fibroblasta čije je udjele tek potrebno odrediti detaljnijom fenotipskom i funkcionalnom analizom. Ova populacija izražava značajno manje gena Fas te njena smanjena apoptoza barem dijelom utječe na brzinu umnažanja, usmjeravanja i sazrijevanja prethodničkih stanica miševa Fas  $-/-$  u odnosu na miševa divljega tipa (141).

## 6.2. Mijeloidno-specifični geni promijenjeni u neresorptivnom artritisu miševa Fas $-/-$

Mijeloidne stanice koje u resorptivnom artritisu predstavljaju najbrojniju staničnu populaciju, a čije nakupljanje konzistentno izostaje u miševa Fas  $-/-$  transkriptomski su analizirane pomoću genskih čipova.

Analiza je pokazala podudarnost genskog izražaja mijeloidnih stanica kontrolnih imuniziranih miševa i miševa s artritisom te stoga možemo zaključiti da je upalna aktivacija mijeloidnih stanica potaknuta imunizacijom ključni faktor za započinjanje i održavanje autoimunskog oštećenja posredovanim stanicama specifične stečene imunosti. Dodatna istraživanja provedena u našem laboratoriju, potvrdila su da je nakupljanje CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup> u slezeni, u periartikularnoj koštanoj srži i sinoviji većim dijelom posredovano imunizacijom (328). Nakupljene i aktivirane mijeloidne stanice stvaraju mikrookoliš koji je preduvjet za aktivaciju stanica stečene imunosti i razvoj autoimunosno-posredovane upale.

Hijerarhijsko grupiranje podijelilo je uzorke u dvije skupine, pri čemu se je u skupinu s jače izraženim genima vezanim uz progresiju staničnog ciklusa i mitotičku aktivnost svrstala većina uzoraka miševa divljega tipa, što upućuje na intenzivnije umnožavanje stanica te skupine i u skladu je s njihovim većim udjelom u artritisu, u odnosu na uzorke miševa Fas  $-/-$ . Usporedba transkriptoma miševa divljeg tipa i miševa Fas  $-/-$  utvrdila je 3 konzistentno različito izražena gena: *Mid1*, *Erdr1* i *Thsp1*.

*Erdr1* je dobio ime zbog sposobnosti poticanja sinteze hemoglobina u nekim mišjim i ljudskim staničnim linijama, a izlučuje se u vezikulama iz stanica izloženih stresu (352). Ovaj je gen u fiziološkim okolnostima izražen na brojnim staničnim populacijama, a njegova je sekvenca ista u miša i u čovjeka. Djelovanje *Erdr1* opisano je u ograničenom broju studija. Kim i sur. (353) pokazali su da davanje rekombinantnog *Erdr1* smanjuje stvaranje autoprotutijela i koncentraciju IL-18 u sinoviji te ublažava mišji CIA. Nadalje, opisano je djelovanje *Erdr1* u smislu poticanja apoptoze limfocita T posredovane receptorom Fas čime pomaže uklanjanju autoreaktivnih limfocita T (354, 355). Opisana je i njegova zaštitna uloga

u upalnim bolestima kože (356, 357). Ova istraživanja upućuju na ulogu *Erdr1* u kočenju autoimunosti, što je u suprotnosti s našim rezultatima, a može upućivati na njegovo različito djelovanje na mijeloidnim stanicama. Sve navedeno kao i činjenica da je validacija rezultata dobivenih genskim čipovima potvrdila razlike u izražaju u ovisnosti o genotipu miševa, te da je pronađen visok izražaj *Erdr1* u neimuniziranim miševima, donekle isključuje sudjelovanje ovog posrednika u patogenezi artritisa.

*Thsp1* kodira matricelularnu glikoziliranu bjelančevinu Thrombospondin-1, izraženu na brojnim tipovima normalnih i malignih stanica, a njegova je uloga opsežno opisana u angiogenezi i razvoju malignih bolesti (358). Thrombospondin-1 aktivira čimbenik TGF- $\beta$ 1, pa miševi s izbačenim genom za *Thsp1* razvijaju blaži fenotip sličan fenotipu miševa s izbačenim genom za *TGF- $\beta$ 1*, koji je među ostalim karakteriziran nastankom upalnih infiltrata u nekoliko organa (359, 360). Fenotip miševa i nekoliko studija upućuje na ulogu Thrombospondin-1 u ograničavanju upalnog odgovora. Njegov receptor CD47 u nekim je staničnim linijama nužan za apoptozu potaknutu receptorom Fas (361). Prijenos izražaja *Thsp1* u zglob ublažuje CIA (362), što je sukladno s našim istraživanjima koja pokazuju viši izražaj *Thsp1* miševa Fas  $-/-$  s neresorptivnim artritismom. Suprotno tome, kompetitivni inhibitor bjelančevine Thrombospondin-1 ublažuje artritisa izazvan peptidoglikan-polisaharidom u štakora (363). Također je pokazano da je izražaj *Thsp1* povišen u monocitima i plazmi pacijenata s RA (364, 365), te korelira s izražajem proupalnih citokina, a sugerirano je i potencijalno terapijsko djelovanje blokade Thrombospondin-1 (366). Prema našim rezultatima, *Thsp1* bilo je različito regulirana u mijeloidnim stanicama i ukupnom zglobnom tkivu miševa Fas  $-/-$ , što upućuje na višestruku ulogu u patogenezi artritisa djelovanjem na različitim razinama.

Gen *Mid1* (*Fxy*, *Trim18*) kodira bjelančevinu Mid1 iz obitelji TRIM povezanu sa staničnim mikrotubulima. Bjelančevina Mid1 je E3 ubikvitinska ligaza (367) koja posreduje ubikvitinilaciju i potiče proteasomsku razgradnju enzima proteinske fosfataze 2A (PP2A) (368). Interakciju s PP2A posreduje njezina regulacijska podjedinica  $\alpha$ 4, koja se veže za domenu Bbox1 na bjelančevini Mid1 (321). Mid1 je tako nazvan zbog simptoma sindroma Opitz G/BBB, koji je posljedica mutacije njegova gena, a karakteriziran je malformacijama središnjih struktura, poput hipertelorizma, rascjepa usne i nepca, laringotrahealnih malformacija, malformacija srca, genitourinarnog sustava, zaostatom u razvoju i intelektualnim poteškoćama (369, 370). Miševi s izbačenim genom za *Mid1* također razvijaju fenotip karakteriziran malformacijama središnjih struktura, primjerice hipoplazijom

cerebelarnog vermisa koji su praćeni poteškoćama u učenju (371). *Mid1* je konzerviran u miša i čovjeka (372). Rezultati našeg istraživanja upućuju na pro-upalnu ulogu *Mid1* u artritisu koja je do sada karakterizirana u ograničenom broju studija. *Mid1* je pojačano izražen u citotoksičnih limfocita T nakon aktivacije TCR, te je u njima nužan za lučenje citotoksičnih granula, polarizaciju i migraciju (373, 374). Isti autori opisuju ublažavanje mišjeg modela kontaktne preosjetljivosti zbog nedostatka *Mid1* (373). Iako se pretpostavlja da *Mid1* djeluje uglavnom putem razgradnje i smanjenja aktivnosti PP2A, Aranda-Orgillés i sur. pokazali su vezanje bjelančevine *Mid1* na nekoliko molekula mRNA kojima potom povećava izražaj. Iako su geni koje *Mid1* tako regulira većinom vezani uz embrionalni razvoj, *Mid1* može povećati translaciju malog broja gena uključenih u homeostazu imunskog sustava (375). Slično našim rezultatima, pojačan izražaj gena *Mid1* su pokazali Collison i sur. (289) na mišjem modelu alergijske upale dišnog sustava. Izražaj *Mid1* u tom modelu ovisan je o funkcionalnom ligandu TRAIL, receptoru TLR4 i adaptoru MyD88. Utišavanje gena *Mid1* u istom modelu povećava količinu PP2A, koči aktivaciju NF $\kappa$ B, p38 MAPK i JNK i smanjuje izražaj citokina i kemokina poput IL-25, IL-33, CCL20, IL-5, IL-13. Proupalnu ulogu *Mid1* ista je istraživačka skupina potvrdila i u ljudskom eozinofilnom ezofagitisu (EoE) te njegovom mišjem modelu (288). Autori pokazuju da i u ovom modelu mehanizam ovisi o ligandu TRAIL. Naime, miševi bez funkcionalnog liganda TRAIL (TRAIL  $-/-$ ) razvijaju ublaženi EoE u kojem je izražaj *Mid1* smanjen te je održana normalna razina PP2A, a smanjen je i izražaj CCL11, CCL24, IL-5, IL-13, IL-25, TGF- $\beta$  i TSLP. Isti autori nedavno su pokazali i povišen izražaj TRAIL u serumu i *Mid1* u plućnom tkivu, te smanjenu aktivnost PP2Ac u plućnom tkivu bolesnika s plućnom fibrozom. U miševa bez funkcionalnog liganda TRAIL izostaje porast *Mid1* i smanjenje PP2Ac te je ublažen razvoj plućne fibroze potaknute bleomicinom, a rekombinantni ligand TRAIL u plućnim fibroblastima povećava izražaj *Mid1* i proizvodnju kolagena (376). TRAIL, slično FasL, pripada obitelji liganada smrtonosnih receptora, a veže se na receptore DR4 i 5, čiji je unutarstanični signalni ustroj sličan receptoru Fas. Pretpostavku proupalnog djelovanja *Mid1* kroz inhibiciju PP2A dodatno potvrđuje činjenica, da je uloga PP2A u ograničavanju imunskog odgovora detaljno opisana. PP2A pripada skupini proteinskih fosfataza koje uklanjaju fosfatne skupine s aminokiselina serin ili treonin, fosforiliranih djelovanjem kinaza. Na taj se način održava ravnoteža fosforilacije i defosforilacije bjelančevina, koja regulira stanični metabolizam i signalizaciju. PP2A se pojavljuje u obliku nekoliko heterodimeričnih ili heterotrimeričnih enzima, koji se sastoje od katalitičke podjedinice C (PP2Ac) te dviju regulacijskih podjedinica, A i B, pri čemu podjedinica B određuje specifičnost za supstrat.

Umjesto regulacijskih podjedinica A i B PPA2c može vezati bjelančevinu  $\alpha 4$  (377), koja posreduje njezinu interakciju s Mid1 (321). PP2A je široko rasprostranjena te regulira razvoj mnogih organskih sustava (378), djeluje kao supresor tumora (379) i nadzire stanični ciklus (380). Sukladno s pretpostavkom ovoga istraživanja, da razgradnja PP2A posredovana bjelančevinom Mid1 posreduje nastanak resorptivnog artritisa, opsežno je opisana njezina uloga u regulaciji imunskog sustava, gdje suprimira upalu defosforilacijom posrednika signalnih puteva NF $\kappa$ B i MAPK (381, 382). PP2A je nužna za pravilnu aktivnost, razvoj i homeostazu limfocita T<sub>reg</sub>, a njezin nedostatak u toj populaciji u miša uzrokuje razvoj autoimunskog i limfoproliferativnog poremećaja (383, 384). Također, postoji nekoliko radova koji opisuju njezinu ulogu u upalnoj aktivaciji mijeloidnih stanica. Poticanje alveolarnih makrofaga LPS-om smanjuje izražaj PP2A, a inaktivacija gena koji kodira katalitičku podjedinicu u mijeloidnim stanicama pojačava lučenje IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, i CCL2 nakon sustavne ili intrapulmonalne primjene LPS, zbog povećane fosforilacije, odnosno aktivacije NF $\kappa$ B i MAPK signalnih puteva (385, 386). Makrofazi podrijetlom iz koštane srži u ovih miševa pojačano izražavaju gene vezane uz signalne puteve posredovane adaptorima MyD88 i TRIF (385). Nadalje, PP2A sudjeluje u razvoju tolerancije makrofaga na endotoksin, kočeći signalizaciju putem sklopa TLR4-MyD88 te smanjuje lučenje IFN- $\gamma$  iz makrofaga u virusnim infekcijama (387-389). U respiratornom epitelu PP2A *in vitro* smanjuje lučenje IL-8 izazvano primjenom TNF- $\alpha$  inhibicijom signalnih puteva MAPK (390) te *in vivo* u upali pluća potaknutoj pomoću LPS-a ili inhalacijom *Pseudomonas aeruginosa*, gdje smanjuje infiltraciju neutrofila, tkivno oštećenje te lokalno lučenje kemokina (391), a u alergijskoj upali pluća aktivacija PP2A smanjuje nakupljanje eozinofila (392). Suprotno našim rezultatima, postoje istraživanja koja opisuju pojačan izražaj i funkciju PP2A u SLE (393), povezanost polimorfizma gena za katalitičku podjedinicu s razvojem SLE (394), te pozitivno povezanost izražaja PP2A s intenzitetom bolesti u SLE, te pokazuju da nedostatak PP2Ac u T<sub>h</sub>17 stanicama uzrokuje smanjenje intenziteta eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (395), što može biti posljedica različite uloge PP2A u različitim staničnim populacijama ili njezine suprotne uloge u SLE.

Uz opisano inhibicijsko djelovanje Mid1 na aktivnost PP2A i njenu poznatu ulogu u regulaciji aktivnosti stanica imunskog sustava razlog za daljnju funkcionalnu analizu uloge Mid1 u artritisu bili su i rezultati validacije rezultata hibridizacije genskih čipova. Tijekom validacije korištena je skupina neimuniziranih miševa u kojih je izražaj gena *Mid1* vrlo nizak,



a pojačano se izražava tek pri upalnoj aktivaciji. Analiza izražaja *Mid1* u tijeku AIA pokazala je značajno povećanje izražaja tek nakon i.a. injekcije, u akutnoj fazi artritisa (3. dan), a potom smanjenje prema kraju akutne faze. Izražaj *Mid1* u tijeku imunizacije nije se značajno razlikovao od izražaja u neimuniziranih miševa, što je pomalo iznenađujuće, jer se *Mid1* prema rezultatima genskih čipova nije izdvojio kao različito izražen između kontrolnih miševa divljeg tipa te odgovarajućih miševa s artritismom. Moguće objašnjenje toga nalaza je korištenje 4 pojedinačna uzorka za analizu genskim čipovima, pri čemu, zbog individualnih varijacija, ta razlika na čipovima nije detektirana kao značajna. Drugi mogući razlog je i to da su za punu aktivaciju mijeloidnih stanica i njihovo nakupljanje potrebne dvije imunizacijske doze. Naime, u setu pokusa provedenih u našem laboratoriju izvan okvira ovoga istraživanja utvrdili smo da imunizacija jednom dozom nije dovoljna da bi se izazvao artritis. Moguće je da je i samo oštećenje zglobne ovojnice tijekom injekcija pufera PBS dovoljno da se reaktiviraju imunizacijom potaknute mijeloidne stanice u zglobovima imuniziranih miševa, čime se potiče izražaj *Mid1* ali artritis se ne razvija zbog izostanka aktivacije stanica specifične imunosti u odsutnosti antigena. U tijeku validacije dalje smo utvrdili da izražaj *Mid1* slijedi vremenski obrazac izražaja *IL-1 $\beta$*  te da je 10. dana artritisa povezan sa zglobnom oteklinom te izražajem proupalnih citokina *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  i *IL-6*. Sve navedeno govori u prilog uloge *Mid1* u patogenezi AIA koja je dalje istraživana njegovim blokiranjem *in vitro* i *in vivo*, te procjenom artritisa, odnosno upalne stanične aktivacije.

Kromosomski smještaj gena *Mid1* mijenjao se tijekom evolucije (372, 396, 397). U čovjeka je smješten na kromosomu X, te je sindrom Opitz G/BBB X-vezana bolest (369). U miševa se smještaj razlikuje u ovisnosti o vrsti i podvrsti, te se u miševa *Mus musculus castaneus* nalazi u pseudoautosomalnoj regiji (PAR) kromosoma X i Y, u *Mus musculus domesticus* premošćuje granicu regije PAR na kromosomu X i Y, dok se u *Mus spretus* cijeli zapis nalazi samo na kromosomu X, izvan PAR (396). Regija PAR smještena je na krajnjim dijelovima krakova kromosoma X i Y, gdje u mejozi dolazi do homologne rekombinacije između ova dva kromosoma, pa se tako geni koji se nalaze u tim regijama nasljeđuju kao autosomalni geni i u žena nisu podloženi inaktivaciji kromosoma X. U *Mus musculus domesticus* (kojem pripada i soj C57BL/6) prva 3 od 10 egzona nalaze se isključivo na kromosomu X, dok je preostalih 7 smješteno u PAR, te se nalaze na kromosomu X i Y (372). Pošto se zapisi za domene RING i Bbox, koje uvjetuju funkciju ubikvitinske ligaze E3 nalaze na egzonu 2, pretpostavlja se da zapis gena *Mid1* na Y kromosomu te dio koji u ženama sa dvije kopije

gena na kromosomima X izbjegne inaktivaciju nije funkcionalan (372). Stoga se prepisivanje gena *Mid1* koji kodira funkcionalnu bjelančevinu usprkos lokaciji u regiji PAR regulira kao X vezani gen. Lanconi i sur. su pokazali da u mužjacima miševa, koji imaju izbačeni gen za *Mid1* samo na kromosomu X nema bjelančevine Mid1 (371). Budući da su geni smješteni na kromosomu X podložni spolnom dimorfizmu, te da je viši izražaj gena *Mid1* pronađen u neonatalnom korteksu ženki u odnosu na mužjake (398), u setu pokusa provedenim na mužjacima isključen je spolni dimorfizam gena *Mid1* u AIA. Mužjaci miševa divljeg tipa, jednako kao i ženke razvijaju AIA koji je praćen porastom izražaja gena *Mid1* u artritisu u odnosu na neimunizirane miševe.

### **6.3. Inhibicija djelovanja bjelančevine Mid1 koči upalna zbivanja**

#### **6.3.1. Inhibicija djelovanja bjelančevine Mid1 koči izražaj proupalnih citokina nakon aktivacije stanica koštane srži *in vitro***

Precizno definiranje učinaka farmakološke blokade bjelančevine Mid1 provedeno je u setu pokusa pokusa *in vitro*, u kojima su mišje stanice koštane srži aktivirane pomoću bakterije, *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* inaktivirana visokom temperaturom sastavnica je CFA koji se koristi tijekom imunizacije u modelu AIA, a potiče stanice urođenog imunskog sustava djelovanjem na receptor TLR2, čiji unutarstanični signalni put ovisi o MyD88, a rezultira aktivacijom signalnih puteva NF $\kappa$ B te MAPK (399). Nekoliko studija opisalo je sposobnost antidijabetičkog lijeka metformina da zapriječi vezanje bjelančevine Mid1 za regulacijsku podjedinicu PP2A, bjelančevinu  $\alpha$ 4, i tako zakoči proteasomsku razgradnju PP2A posredovanu bjelančevinom Mid1 (290, 400-402). Većina ranije opisanih učinaka metformina temelji se na inhibiciji kompleksa I u lancu prijenosa elektrona tijekom oksidativne fosforilacije, što aktivira proteinsku kinazu aktiviranu adenozin monofosfatom (AMPK, prema engl. *AMP-activated protein kinase*) (403). Inhibicija proteasomske razgradnje PP2A kao mehanizam djelovanja metformina do sada je opisana u neurodegenerativnim (290, 400, 402) i malignim bolestima (401, 404), te u upalnoj aktivaciji makrofaga (405). Budući da većina istraživanja koja opisuju protuupalne učinke metformina nisu procjenjivala njegovo djelovanje na interakciju Mid1 i PP2A, te ih pripisuju djelovanju AMPK (406), da bi se isključili učinci metformina na druge signalne puteve, primijenjen je i peptid GSK'364A. Peptid GSK'364A sadrži C terminalni slijed bjelančevine  $\alpha$ 4, koji odgovara njegovom veznom mjestu na bjelančevini Mid1, te tako kompetitivno istiskuje

autologni  $\alpha 4$  s Mid1 i priječi razgradnju PP2A. Ovaj peptid uspješno je zakočio djelovanje Mid1 na PP2A u nekoliko istraživanja (290, 291, 407). Primjena GSK'364A u kulturi primarnih mišjih neurona smanjila je fosforilaciju bjelančevine Tau te *Mid1*-posredovanu translaciju preteča amiloidnog proteina (APP, prema engl. *amyloid precursor protein*) (290, 291). Primjena metformina i peptida GSK'364A zakočila je povećanje izražaja proupalnih citokina *IL-1 $\beta$*  i *TNF- $\alpha$*  u upalno aktiviranim stanicama mišje koštane srži, a dodavanjem inhibitora aktivnosti PP2A, LB-100, poništen je inhibicijski učinak GSK'364A. Ovaj nalaz potvrđuje da je kočenje proupalnog djelovanja Mid1 putem razgradnje PP2A, dovoljno da se zakoči upalna aktivacija stanica urođene imunosti.

### **6.3.2. Inhibicija djelovanja bjelančevine Mid1 koči razvoj artritisa potaknutog antigenom *in vitro***

U ovome istraživanju korištena su dva načina inhibicije Mid1 *in vivo* tijekom AIA, utišavanje gena i blokiranje vezanja bjelančevine Mid1 na PP2A.

Utišavanje gena prvo je provedeno i.a. injekcijom siRNA 1. i 2. dan nakon izazivanja artritisa, a artritis je procijenjen u akutnoj fazi, odnosno 3. dan artritisa, zbog činjenice da se gen *Mid1* pojačano izražava već u prvim danima artritisa, a miševi su žrtvovani ranije nego u prethodnim pokusima sa svrhom izbjegavanja oštećenja zgloba ponavljanim injiciranjem siRNA. siRNA je primijenjena u kompleksima s polimerom PEI koji je nužan za njen ulazak u stanice (408). Tim pristupom postignuto je 50% sniženje razine *Mid1* mRNA, međutim nije se smanjio intenzitet artritisa, niti izražaj proupalnih citokina u zglobu. Doza siRNA za ovo istraživanje određena je prema prethodnim istraživanjima u kojima je siRNA uspješno korištena za utišavanje *Mid1* izražaja u jednjaku i plućima (288, 289), no čak ni primjena 4 puta veće doze nije promijenila ishod pokusa (nije prikazano). Mogući razlog za nepotpunu inhibiciju izražaja *Mid1* te neuspješnost ovoga pristupa u sprječavanju razvoja artritisa je mehaničko oštećenje zgloba zbog triju uzastopnih i.a. injekcija, onemogućeno stvaranje kompleksa siRNA-PEI u upalnom eksudatu te negativno djelovanje mBSA, koji se nakon i.a. injekcije zadržava u zglobu, na siRNA komplekse. Također je moguće da upalni odgovor, koji je u zglobu potaknut prije injiciranja siRNA, privlači stanice imunskog sustava iz sustavnog krvotoka, u kojima gen za *Mid1* nije utišan. Sukladno toj hipotezi su Kramer i sur. (409) u istraživanju i.a. primjene siRNA u zglobovima injiciranim s CFA pokazali da se stanice, u kojima utišavanje nije uspješno nalaze u perivaskularnim područjima. Osim

neuspješnosti utišavanja, moguće je i da je zglobna upala dodatno pogoršana dodavanjem PEI. Iako bi taj spoj prema proizvođaču trebao minimalno utjecati na imunski sustav, pokazano je da primjena PEI može potaknuti izražaj gena vezanih uz upalni odgovor (410). Do sada postoji samo jedno istraživanje, u kojem je izražaj gena, u ovom slučaju *FcγRIII*, u upaljenom zglobu uspješno utišano primjenom siRNA u kombinaciji s PEI (409).

Sljedeći korak bila je sustavna primjena siRNA, s ciljem dopreme kompleksa u upaljeni zglob putem sustavne cirkulacije. Ovim putem primjene nije postignuta inhibicija izražaja *Mid1* u upaljenom zglobu, niti djelovanje na tijek artritisa. Prema proizvođaču PEI, najveći dio siRNA nakon primjene kompleksa u repnu venu miša, zadrži se u plućima a moguće je i njihovo zadržavanje u jetri (411), međutim u oba navedena organa nije primijećeno utišavanje gena *Mid1*.

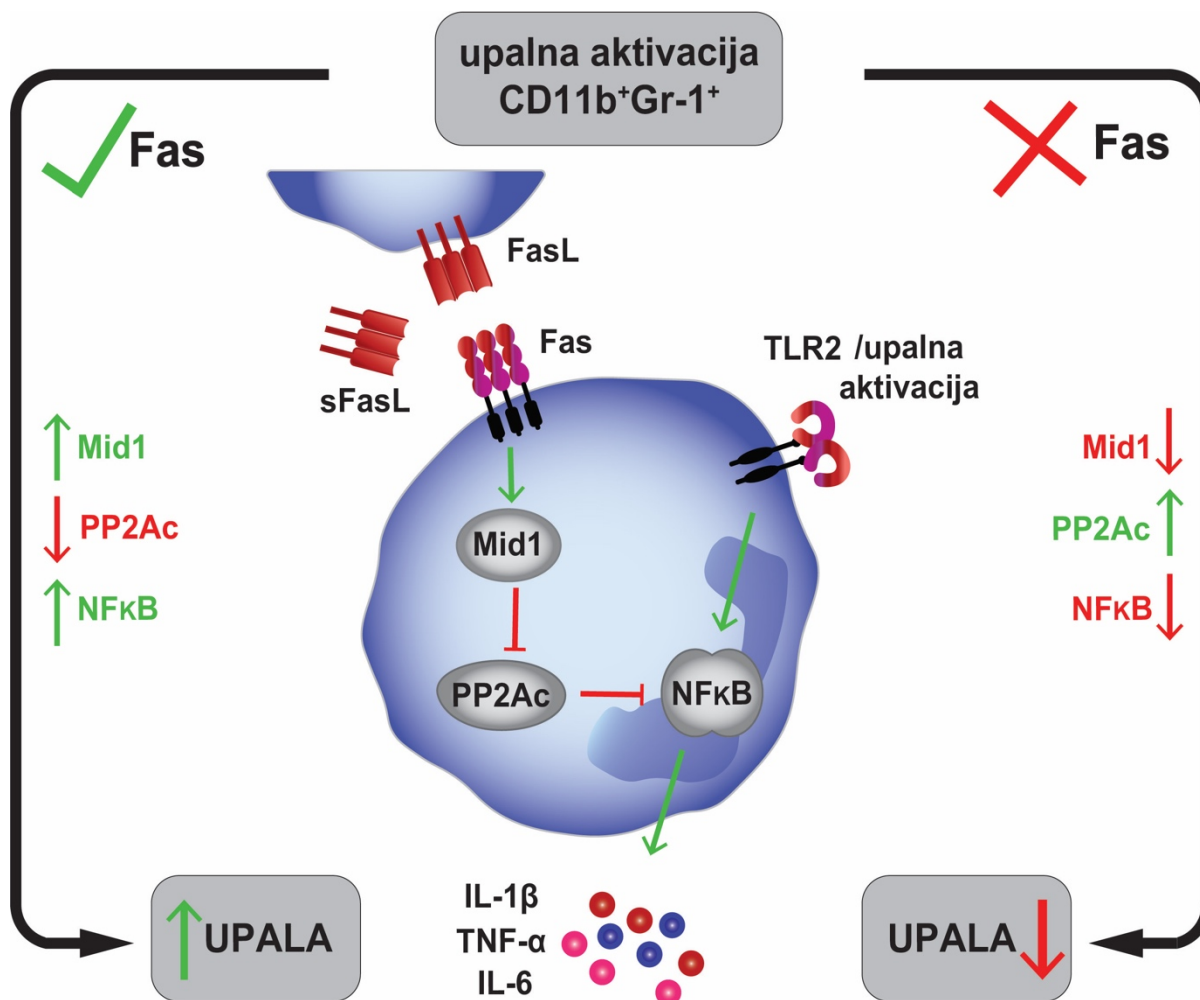
*Mid1* siRNA je u ovom istraživanju primijenjena nakon izazivanja artritisa te je moguće da je unutar 24 sata nakon i.a. injekcije mBSA u zglobu već potaknut imunski odgovor kojeg inhibicija izražaja *Mid1* više ne može zaustaviti. Stoga bi početak utišavanja ranije u tijeku imunizacijskog protokola bio bolji pristup, međutim zbog visoke cijene i ograničene količine oligonukleotida raniji početak i višestruko injiciranje nije bilo moguće u okviru ovoga istraživanja.

Peptid GSK'364A za sada je jedini dostupni specifični inhibitor bjelančevine *Mid1*, no njegova primjena nije optimizirana *in vivo*, te je stoga za inhibiciju na razini bjelančevine tijekom AIA korišten metformin. Svakodnevna primjena metformina *in vivo*, u modelu AIA smanjila je zglobnu oteklinu i gubitak subhondralnih koštanih gredica u artritisu, a primijećen je i nešto manji izražaj proupalnih citokina i udio sinovijalnih mijeloidnih stanica u zglobovima, iako ovaj učinak za sve citokine, osim TNF- $\alpha$ , nije bio statistički značajan. Pretpostavljamo da je zaštitno djelovanje metformina barem djelomično posredovano njegovim djelovanjem na sklop *Mid1*-PP2A. Zaštitno djelovanje PP2A opisano je u pokusnom modelu artritisa izazvanog prijenosom seruma životinja K/BxN, u kojem aktivacija PP2A ublažuje artritis, smanjuje izražaj IL-6 i CCL2 u zglobu te sprječava nastanak koštanih erozija (412). Nadalje, pokazano je da se pri gubitku koštanog tkiva potaknutom LPS-om u osteoklastima smanjenjuje PP2A, što povećava aktivaciju NF $\kappa$ B, te stoga ubrzava sazrijevanje i pojačava aktivnost osteoklasta (413). Ovo istraživanje također nije prvo koje opisuje ublažavajuće učinke metformina u pokusnom modelu artritisa. Naime istraživačka grupa iz Koreje je u svojim istraživanjima provedenim na modelu CIA pokazala da metformin smanjuje zglobnu upalu te koštano oštećenje. Protuupalne učinke pripisuju

smanjenom sazrijevanju limfocita T<sub>h</sub>17 putem inhibicije sklopa 1 ciljne molekule rapamicina u sisavaca (mTORC1, prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1*) posredovane kinazom AMPK i smanjene fosforilacije pretvarača signala i aktivatora transkripcije (STAT, prema engl. *signal transducer and activator of transcription*)<sup>3</sup>, a zaštitni učinak na kost pripisuju smanjenoj osteoklastogenezi (414-416). Protuupalni učinci metformina opisani su i u drugim autoimunim bolestima. Primjerice, u pokusnom mišjem encefalomijelitisu metformin ublažuje tijek bolesti, a autori u dvije studije predlažu da je učinak posredovan smanjenjem aktivnosti limfocita T, odnosno inhibiciju ciljne molekule rapamicina u sisavaca (mTOR, prema engl. *mammalian/mechanistic target of rapamycin*) posredovanu AMPK (417, 418). Metformin primijenjen u pacijenata koji uz metabolički sindrom imaju i multiplu sklerozu smanjuje broj novonastalih lezija (419), a njegova primjena uz klasičnu terapiju u SLE smanjuje učestalost epizoda pogoršanja bolesti (420). Kliničko ispitivanje u kojem će se procijeniti učinak metformina uz klasičnu terapiju DMARD u RA je u fazi upisivanja pacijenata. Zasad je pokazano da terapijski učinak metformina u autoimunim bolestima može biti posredovan njegovim utjecajem na nekoliko posrednika i signalnih puteva, primjerice AMPK, putem koje djeluje na mTOR i STAT3, izravnim djelovanjem na mTOR neovisno o AMPK, te djelovanjem na signalni put NFκB i MAPK (406). PP2A, čiju razgradnju metformin blokira djelovanjem na Mid1, također regulira mTOR, i posredno utječe na signalne puteve NFκB i MAPK (381, 382). Većina istraživanja pripisuje protu-upalne učinke metformina aktivaciji AMPK, međutim u tim istraživanjima nije analizirana PP2A. Zhao i sur. su u bubrežnim epitelnim stanicama pokazali inhibicijski učinak metformina na NFκB, koji je posredovan aktivacijom PP2A (421). Zhang i sur. pokazali su da metformin sprječava aktivaciju signalnog puta NFκB i inflamasona u makrofazima nakon stimulacije s oksidiranim lipoproteinom male gustoće (LDL, prema engl. *low density lipoprotein*). Ovaj učinak samo je djelomično poništen inhibicijom AMPK, a u velikoj mjeri spriječen blokiranjem aktivnosti PP2A, što potvrđuje da metformin može djelovati kroz oba enzima u istoj stanici (405).

Zaključno, ovo istraživanje potvrđuje proupalno djelovanje receptora Fas u artritisu putem novootkrivene signalne osi u kojoj aktivacija receptora Fas na stanicama urođene imunosti potiče izražaj Mid1. Mid1 potom, potičući razgradnju PP2A pojačava signalizaciju proupalnih citokina i time omogućuje stvaranje upalnog mikrookoliša koji je nužan za započinjanje i održavanje autoimunosno-posredovanog zglobnog oštećenja (Slika 38).

Budući da većina dostupnih lijekova djeluje na signalne puteve drugih receptora, daljnja karakterizacija ovog signalnog puta može otvoriti dodatne pristupe liječenju RA.



**Slika 38. Proupalno djelovanje receptora Fas u artritisu putem novootkrivene signalne osi Fas-Mid1-PP2Ac u stanicama urođene imunosti.** Aktivacija receptora Fas vezivanjem liganda Fas u membranskom (FasL) ili topljivom (sFasL, prema engl. *soluble FasL*) obliku potiče izražaj Mid1, E3 ubikvitinske ligaze, koja uzrokuje proteasomsku razgradnju katalitičke podjedinice proteinske fosfataze 2A (PP2Ac). Razgradnja PP2Ac potom omogućuje aktivaciju jezgrinog čimbenika κB (NFκB, prema engl. *nuclear factor κB*) i pojačava lučenje proupalnih citokina poput IL-1β, TNF-α, IL-6, te time potiče upalu (lijevo). Nedostatak funkcionalnog receptora Fas, primjerice u miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas<sup>-/-</sup>), onemogućuje porast izražaja Mid1 pri upalnoj aktivaciji, te se količina PP2Ac u upali ne smanjuje. PP2Ac defosforilacijom inaktivira posrednike signalnog puta NFκB, te smanjuje NFκB-posredovano lučenje proupalnih citokina, što dovodi do smanjenja upale (desno). Funkcionalni receptor Fas ovim novootkrivenim signalnim putem pojačava upalni odgovor stanica urođene imunosti nakon upalne aktivacije. U ovome istraživanju djelovanje opisanog signalnog puta prvo je potvrđeno u uvjetima *in vitro*, nakon stimulacije receptora TLR (prema engl. *Toll-like receptor*)<sup>2</sup> u stanica koštane srži. Potom je u uvjetima *in vivo*, u artritisu potaknutom antigenom, zabilježeno smanjenje upale, prethodno primijećeno u miševa s nedostatkom receptora Fas, i nakon inhibicije vezivanja Mid1 na PP2A pomoću metformina. Zaključno, aktivacija novootkrivene signalne osi Fas-Mid1-PP2Ac podržava stvaranje upalnog mikrookoliša koji je nužan za započinjanje i održavanje autoimunosno-posredovanog zglobnog oštećenja.

## 7. Zaključci

1. Miševi Fas  $-/-$  razvijaju blaži oblik pokusnog modela AIA, karakteriziran blažom kliničkom slikom te smanjenjem sinovijalne upale, manje eksudata u zglobnoj šupljini te nedostatkom oštećenja zglobne hrskavice i invazije panusa u subhondralnu kost.
2. U miševa Fas  $-/-$  u artritisu nema gubitka subhondralne kosti karakterističnog za miševe divljeg tipa, što je vidljivo očuvanjem udjela volumena, debljine i razmaka koštanih gredica u distalnim femoralnim epifizama uz zahvaćeni zglob.
3. U zglobovima miševa Fas  $-/-$ , u tijeku AIA je smanjeno nakupljanje stanica mijeloidne loze ( $CD11b^{+}Gr-1^{+}$ ,  $F4/80^{+}$  i  $CD11b^{+}Gr-1^{-}$ ) i limfocita T ( $CD3^{+}$ ). Mijeloidne stanice ( $CD11b^{+}Gr-1^{+}$ ) u artritisu miševa divljeg tipa čine čak 50-60% svih stanica u zglobnom odjeljku. U zglobovima miševa divljeg tipa, artritis izaziva smanjenje udjela stanica  $CD45^{-}CD31^{-}TER119^{-}CD51^{+}CD200^{+}CD105^{-}$ , dok se u miševa Fas  $-/-$  ova populacija u artritisu ne mijenja. Promjene udjela te populacije praćene su odgovarajućom, suprotnom promjenom u udjela stanica  $CD45^{-}CD31^{-}TER119^{-}CD51^{+}CD200^{-}$ . Promjene hematopoetskih populacija u periartikularnoj koštanoj srži u artritisu nisu različite u miševa Fas  $-/-$  u odnosu na miševe divljeg tipa.
4. U miševa divljega tipa, udio stanica  $CD11b^{+}Gr-1^{+}$ ,  $F4/80^{+}$  i  $CD11b^{+}Gr-1^{-}$  pozitivno je povezan s oteklinom koljena, a udio stanica  $CD11b^{+}Gr-1^{+}$ ,  $F4/80^{+}$ ,  $CD11b^{+}Gr-1^{-}$  i  $CD3^{+}$  je negativno povezan s volumenom epifiznih koštanih gredica. Udio stanica  $CD45^{-}CD31^{-}TER119^{-}CD51^{+}CD200^{-}$  pozitivno je povezan s oteklinom koljena, i negativno povezan s volumenom epifiznih koštanih gredica, a udio stanica  $CD45^{-}CD31^{-}TER119^{-}CD51^{+}CD200^{+}CD105^{-}$  negativno je povezan s oteklinom koljena, te pozitivno s volumenom epifiznih koštanih gredica.
5. Transkriptom zglobnih mijeloidnih stanica ( $CD11b^{+}Gr-1^{+/\text{low}}$ ) ne mijenja se u miševa s artritisom u odnosu na kontrolne imunizirane miševe, pa možemo zaključiti da je upalna aktivacija mijeloidnih stanica u AIA uvjetovana samom imunizacijom i stvara mikrookoliš koji je preduvjet za aktivaciju stanica stečene imunosti i razvoj autoimunosno-posredovane upale.
6. Zglobne mijeloidne stanice miševa divljeg tipa karakterizira jači izražaj gena vezanih uz napredovanje staničnog ciklusa i mitotičku aktivnost, što upućuje na njihovo intenzivnije

umnožavanje i u skladu je s njihovim većim udjelom u artritisu, u odnosu na stanice miševa Fas  $-/-$ .

7. Iako je transkriptom zglobnih mijeloidnih stanica sličan u miševa WT i Fas  $-/-$ , tri su gena konzistentno različito izražena. Izražaj gena *Mid1* i *Erdr1* veći je u zglobnim mijeloidnim stanicama WT u odnosu na miševe Fas  $-/-$ , a izražaj *Thbs1* veći je miševa Fas  $-/-$  u odnosu na miševe WT.
8. Stanice CD45 $^-$ CD31 $^-$ TER119 $^-$ CD51 $^+$ CD200 $^+$ CD105 $^-$  u odnosu na populaciju CD45 $^-$ CD31 $^-$ TER119 $^-$ CD51 $^+$ CD200 $^-$ CD105 $^+$  karakterizira pojačan izražaj gena vezanih uz regulaciju i diferencijaciju koštanog sustava te gena vezanih uz biologiju matičnih stanica, što potvrđuje njihov koštano-hrskavični prethodnički karakter u zglobnom odjeljku. Iako je udio populacije CD45 $^-$ CD31 $^-$ TER119 $^-$ CD51 $^+$ CD200 $^+$ CD105 $^-$  u resorptivnom artritisu smanjen ona se u artritisu funkcijski ne mijenja. Populacija CD45 $^-$ CD31 $^-$ TER119 $^-$ CD51 $^+$ CD200 $^-$ CD105 $^+$ , za koju sekvencioniranjem nije potvrđen prethodnički karakter, najvjerojatnije se sastoji od kombinacije usmjerenih prethodnika i sinovijalnih fibroblasta.
9. Veći izražaj receptora Fas na stanicama CD45 $^-$ CD31 $^-$ TER119 $^-$ CD51 $^+$ CD200 $^+$ CD105 $^-$ , zajedno s našim prethodnim istraživanjem potvrđuje osjetljivost ovih stanica na apoptozu, što u artritisu povećava njihovo uklanjanje i doprinosi smanjenoj obnovi subhondralne kosti. Izražaj receptora Fas smanjen je u populaciji CD45 $^-$ CD31 $^-$ TER119 $^-$ CD51 $^+$ CD200 $^-$ CD105 $^+$ . Ovi rezultati ukazuju na promijenjenu brzinu umnažanja, usmjeravanja i sazrijevanja prethodničkih stanica kosti i hrskavice u miševa Fas  $-/-$ .
10. Viši izražaj gena *Mid1* u zglobnim mijeloidnim stanicama miševa divljeg tipa u odnosu na miševe Fas  $-/-$  potvrđen je i u ukupnom tkivu koljenih zglobova. *Mid1* slabije je izražen u zglobnim mijeloidnim stanicama i u tkivu koljena neimuniziranih miševa divljeg tipa. Izražaj gena *Erdr1* u tkivu koljenih zglobova viši je u miševa divljeg tipa, te tako odgovara izražaju u zglobnim mijeloidnim stanicama, a njegova se količina u neimuniziranih miševa u odnosu na miševe s artritisom ne razlikuje. Izražaj gena *Thbs1* viši je u tkivu koljenih zglobova miševa Fas  $-/-$ , a različito je reguliran u mijeloidnim stanicama i ukupnom zglobnom tkivu. Promjene u izražaju upućuju na ulogu *Mid1* u patogenezi upalnog oštećenja zglobova u artritisu.



11. Izražaj *Mid1* u zglobu najviši je rano (3. dan) nakon izazivanja artritisa, te je povezan s izražajem proupalnih citokina *IL-1 $\beta$* , *IL-6* i *TNF- $\alpha$*  u zahvaćenom zglobu i intenzitetom artritisa.
12. Usprkos položaju na kromosomu X, izražaj *Mid1* u artritisu nije podložan spolnome dimorfizmu te je, kao u ženka, pojačano izražen i u koljenima mužjaka miševa divljeg tipa s artritisom.
13. U uvjetima *in vitro*, specifična inhibicija djelovanja bjelančevine *Mid1* u stanicama koštane srži primjenom peptida GSK'364A i metformina, koji sprječavaju vezivanje *Mid1* i time potaknutu razgradnju PP2A, smanjuje izražaj proupalnih citokina potaknut upalom. Učinak poništava inhibicija PP2A, što potvrđuje uključenost tog enzima u proupalno djelovanje *Mid1*. Rezultati ovog dijela pokazuju da je kočenje proupalnog djelovanja *Mid1* putem razgradnje PP2A dovoljno da se zakoči upalna aktivacija stanica urođene imunosti.
14. U uvjetima *in vivo*, inhibicija djelovanja bjelančevine *Mid1* primjenom metformina u tijeku pokusnog modela AIA rezultira njegovom kliničkom slikom, smanjenim izražajem *TNF- $\alpha$*  u zahvaćenom zglobu te manjim gubitkom epifiznih koštanih gredica. Inhibicija *Mid1* na razini gena u ovom istraživanju nije uspješno optimizirana.
15. Rezultati funkcionalnih studija *in vitro* i *in vivo* ukazuju na proupalno djelovanje receptora Fas u artritisu putem novootkrivene signalne osi Fas-*Mid1*-PP2Ac u stanicama urođene imunosti. Aktivacija receptora Fas u tim stanicama potiče izražaj *Mid1*, koji potom, potičući razgradnju PP2A pojačava signalizaciju proupalnih citokina i time omogućuje stvaranje upalnog mikrookoliša koji je nužan za započinjanje i održavanje autoimunosno-posredovanog zglobnog oštećenja.

## 8. Sažetak

Reumatoidni artritis (RA) je kronična sustavna autoimuna bolest koja zahvaća sinovijalne zglobove te uzrokuje razaranje zglobne hrskavice i kosti, što dovodi do trajne invalidnosti. Iako postojeća terapija ublažuje tijek bolesti, za liječenje koštanog razaranja nije u potpunosti učinkovita, a dio bolesnika na terapiju ne odgovara.

Cilj ovog istraživanja bio je u mišjem modelu RA, artritisu potaknutom antigenom (AIA), uspoređivanjem miševa divljega tipa (WT) s resorptivnim artritisom, te miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ), zaštićenih od koštanog gubitka u artritisu, odrediti koja stanična populacija u zglobovima ili periartikularnoj koštanoj srži posreduje lokalno razaranje kosti te u toj populaciji odrediti molekularne posrednike koštane resorpcije.

Blaži oblik artritisa u miševa Fas  $-/-$  karakteriziran je promijenjenim staničnim sastavom zglobnog odjeljka. Smanjen je udio zglobnih mijeloidnih (CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>) stanica, čije je nakupljanje u resorptivnom artritisu miševa WT povezano s gubitkom subhondralnih koštanih gredica i karakterizirano pojačanim izražajem Mid1. Izražaj Mid1 u zglobu povezan je s intenzitetom artritisa i izražajem proupalnih citokina. *In vitro* inhibicija Mid1 smanjuje upalnu aktivaciju stanica urođene imunosti iz koštane srži, a *in vivo* ublažuje tijek artritisa te štiti od gubitaka subhondralnih koštanih gredica.

Zaključno, ovo istraživanje opisuje proupalno djelovanje receptora Fas u artritisu putem novootkrivene signalne osi u kojoj aktivacija Fas na stanicama urođene imunosti potiče izražaj Mid1, koji potičući razgradnju PP2A pojačava signalizaciju proupalnih citokina i time omogućuje stvaranje upalnog mikrookoliša koji je nužan za razvoj zglobnog oštećenja.

## 9. Summary

Cellular and molecular mediators of subchondral bone destruction in arthritis

Nina Lukač, 2020

Rheumatoid arthritis is a chronic systemic autoimmune disease affecting synovial joints, characterized by cartilage and bone destruction, and subsequent permanent disability. Available therapeutics improve prognosis but have a limited effect on bone destruction.

The aim of this study was to define joint and periarticular bone marrow cell populations and population-specific molecular mediators driving local bone destruction in a murine model, antigen induced arthritis (AIA), by comparing wild type (WT) mice with destructive arthritis, and mice deficient for Fas gene (Fas  $-/-$ ), protected from subchondral bone loss in AIA.

Ameliorated arthritis in Fas  $-/-$  mice is characterized by altered cell population frequencies in the affected joint. Fas  $-/-$  mice lack accumulation of myeloid cells. In WT mice, myeloid cell accumulation is associated with loss of subchondral bone and is marked by up-regulation of Mid1 in the joint, which is associated with arthritis intensity. *In vitro* inhibition of Mid1 decreases inflammatory activation of innate immune cells. *In vivo*, it attenuates the course of AIA and protects from subchondral bone loss.

In conclusion, this study describes a proinflammatory effect of Fas in arthritis through upregulation Mid1, which enhances cytokine secretion and enables development of microenvironment necessary for development of joint destruction.

## 10. Popis literature

1. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S265-72.
2. Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J. Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol.* 1986;13(5):899-902.
3. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, i sur. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol.* 1993;32(10):903-7.
4. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, i sur. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):30-7.
5. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987;30(11):1205-13.
6. Ling S, Li Z, Borschukova O, Xiao L, Pumpens P, Holoshitz J. The rheumatoid arthritis shared epitope increases cellular susceptibility to oxidative stress by antagonizing an adenosine-mediated anti-oxidative pathway. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):R5.
7. Gibert M, Balandraud N, Touinssi M, Mercier P, Roudier J, Reviron D. Functional categorization of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis: the protective effect. *Hum Immunol.* 2003;64(10):930-5.
8. Kuo SJ, Huang CC, Tsai CH, Hsu HC, Su CM, Tang CH. Chemokine C-C Motif Ligand 4 Gene Polymorphisms Associated with Susceptibility to Rheumatoid Arthritis. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9181647.
9. Rui H, Yan T, Hu Z, Liu R, Wang L. The association between caspase-5 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Gene.* 2018;642:307-12.
10. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, i sur. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 2004;75(2):330-7.
11. Al-Rayes H, Al-Swailem R, Albelawi M, Arfin M, Al-Asmari A, Tariq M. TNF-alpha and TNF-beta Gene Polymorphism in Saudi Rheumatoid Arthritis Patients. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.* 2011;4:55-63.

12. Jahid M, Rehan Ul H, Chawla D, Avasthi R, Ahmed RS. Association of polymorphic variants in IL1B gene with secretion of IL-1beta protein and inflammatory markers in north Indian rheumatoid arthritis patients. *Gene*. 2018;641:63-7.
13. El-Sayed EH, Saleh MH, Al-Shahaly MH, Toraih EA, Fathy A. IL-37 gene variant (rs3811047): A marker of disease activity in rheumatoid arthritis: A pilot study. *Autoimmunity*. 2018;51(8):378-85.
14. Jahid M, Rehan Ul H, Avasthi R, Ahmed RS. Interleukin10-1082 A/G polymorphism: Allele frequency, correlation with disease markers, messenger RNA and serum levels in North Indian rheumatoid arthritis patients. *Clin Biochem*. 2018;55:80-5.
15. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Hesselberg E, Runarsson A, i sur. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat Biotechnol*. 2013;31(2):142-7.
16. Criswell LA, Merlino LA, Cerhan JR, Mikuls TR, Mudano AS, Burma M, i sur. Cigarette smoking and the risk of rheumatoid arthritis among postmenopausal women: results from the Iowa Women's Health Study. *Am J Med*. 2002;112(6):465-71.
17. Gianfrancesco MA, Trupin L, Shiboski S, van der Laan M, Graf J, Imboden J, i sur. Smoking Is Associated with Higher Disease Activity in Rheumatoid Arthritis: A Longitudinal Study Controlling for Time-varying Covariates. *J Rheumatol*. 2019;46(4):370-5.
18. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, i sur. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(10):1488-92.
19. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, i sur. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18001.
20. Ceccarelli F, Orru G, Pilloni A, Bartosiewicz I, Perricone C, Martino E, i sur. Porphyromonas gingivalis in the tongue biofilm is associated with clinical outcome in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Immunol*. 2018;194(2):244-52.
21. Kharlamova N, Jiang X, Sherina N, Potempa B, Israelsson L, Quirke AM, i sur. Antibodies to Porphyromonas gingivalis Indicate Interaction Between Oral Infection, Smoking, and Risk Genes in Rheumatoid Arthritis Etiology. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(3):604-13.
22. Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, i sur. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2016;8(369):369ra176.

23. Chen J, Wright K, Davis JM, Jeraldo P, Marietta EV, Murray J, i sur. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Med.* 2016;8(1):43.
24. Kudaeva FM, Speechley MR, Pope JE. A systematic review of viral exposures as a risk for rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2019;48(4):587-96.
25. Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ, Xu J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res.* 2018;6:15.
26. Schett G, Firestein GS. Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(5):787-9.
27. Kurowska W, Kuca-Warnawin EH, Radzikowska A, Maslinski W. The role of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Cent Eur J Immunol.* 2017;42(4):390-8.
28. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, i sur. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004;50(2):380-6.
29. Smith MD. The normal synovium. *Open Rheumatol J.* 2011;5:100-6.
30. Tu J, Hong W, Zhang P, Wang X, Korner H, Wei W. Ontology and Function of Fibroblast-Like and Macrophage-Like Synoviocytes: How Do They Talk to Each Other and Can They Be Targeted for Rheumatoid Arthritis Therapy? *Front Immunol.* 2018;9:1467.
31. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010;233(1):233-55.
32. Orr C, Vieira-Sousa E, Boyle DL, Buch MH, Buckley CD, Canete JD, i sur. Synovial tissue research: a state-of-the-art review. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(8):463-75.
33. Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):10895-900.
34. Miyazawa K, Mori A, Yamamoto K, Okudaira H. Constitutive transcription of the human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-kappaB and CBF1. *Am J Pathol.* 1998;152(3):793-803.
35. Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU, i sur. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(2):R120-8.

36. Leizer T, Cebon J, Layton JE, Hamilton JA. Cytokine regulation of colony-stimulating factor production in cultured human synovial fibroblasts: I. Induction of GM-CSF and G-CSF production by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Blood*. 1990;76(10):1989-96.
37. Jackson JR, Minton JA, Ho ML, Wei N, Winkler JD. Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1beta. *J Rheumatol*. 1997;24(7):1253-9.
38. Yoo SA, Yoon HJ, Kim HS, Chae CB, De Falco S, Cho CS, i sur. Role of placenta growth factor and its receptor flt-1 in rheumatoid inflammation: a link between angiogenesis and inflammation. *Arthritis Rheum*. 2009;60(2):345-54.
39. Wehmeyer C, Pap T, Buckley CD, Naylor AJ. The role of stromal cells in inflammatory bone loss. *Clin Exp Immunol*. 2017;189(1):1-11.
40. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1928-42.
41. Bianco P. "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:677-704.
42. Roelofs AJ, Zupan J, Riemen AHK, Kania K, Ansboro S, White N, i sur. Joint morphogenetic cells in the adult mammalian synovium. *Nat Commun*. 2017;8:15040.
43. Chan CK, Seo EY, Chen JY, Lo D, McArdle A, Sinha R, i sur. Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell*. 2015;160(1-2):285-98.
44. Song N, Scholtemeijer M, Shah K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends Pharmacol Sci*. 2020.
45. Tak PP, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, Meijers KA, Brand R, i sur. Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum*. 1997;40(2):217-25.
46. Kurko J, Vida A, Glant TT, Scanzello CR, Katz RS, Nair A, i sur. Identification of myeloid-derived suppressor cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis: a pilot study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014;15:281.
47. Baeten D, Demetter P, Cuvelier C, Van Den Bosch F, Kruithof E, Van Damme N, i sur. Comparative study of the synovial histology in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, and osteoarthritis: influence of disease duration and activity. *Ann Rheum Dis*. 2000;59(12):945-53.
48. Kurowska-Stolarska M, Alivernini S. Synovial tissue macrophages: friend or foe? *RMD Open*. 2017;3(2):e000527.

49. Kennedy A, Fearon U, Veale DJ, Godson C. Macrophages in synovial inflammation. *Front Immunol.* 2011;2:52.
50. Alivernini S, Tolusso B, Ferraccioli G, Gremese E, Kurowska-Stolarska M, McInnes IB. Driving chronicity in rheumatoid arthritis: perpetuating role of myeloid cells. *Clin Exp Immunol.* 2018;193(1):13-23.
51. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity.* 2017;46(2):183-96.
52. Singh JA, Arayssi T, Duray P, Schumacher HR. Immunohistochemistry of normal human knee synovium: a quantitative study. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(7):785-90.
53. Moret FM, Hack CE, van der Wurff-Jacobs KM, de Jager W, Radstake TR, Lafeber FP, et al. Intra-articular CD1c-expressing myeloid dendritic cells from rheumatoid arthritis patients express a unique set of T cell-attracting chemokines and spontaneously induce Th1, Th17 and Th2 cell activity. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R155.
54. Ramwadhoebe TH, Ramos MI, Maijer KI, van Lienden KP, Maas M, Gerlag DM, et al. Myeloid Dendritic Cells Are Enriched in Lymph Node Tissue of Early Rheumatoid Arthritis Patients but not in At Risk Individuals. *Cells.* 2019;8(7).
55. Rollet-Labelle E, Vaillancourt M, Marois L, Newkirk MM, Poubelle PE, Naccache PH. Cross-linking of IgGs bound on circulating neutrophils leads to an activation of endothelial cells: possible role of rheumatoid factors in rheumatoid arthritis-associated vascular dysfunction. *J Inflamm (Lond).* 2013;10(1):27.
56. Quayle JA, Watson F, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc gamma RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression. *Immunology.* 1997;91(2):266-73.
57. Sopata I, Wize J, Filipowicz-Sosnowska A, Stanislawska-Biernat E, Brzezinska B, Maslinski S. Neutrophil gelatinase levels in plasma and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Rheumatol Int.* 1995;15(1):9-14.
58. O'Neil LJ, Kaplan MJ. Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: Breaking Immune Tolerance and Fueling Disease. *Trends Mol Med.* 2019;25(3):215-27.
59. Chakravarti A, Raquil MA, Tessier P, Poubelle PE. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood.* 2009;114(8):1633-44.



60. Assi LK, Wong SH, Ludwig A, Raza K, Gordon C, Salmon M, i sur. Tumor necrosis factor alpha activates release of B lymphocyte stimulator by neutrophils infiltrating the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.* 2007;56(6):1776-86.
61. Cross A, Bucknall RC, Cassatella MA, Edwards SW, Moots RJ. Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(10):2796-806.
62. Raza K, Scheel-Toellner D, Lee CY, Pilling D, Curnow SJ, Falciani F, i sur. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(4):R120.
63. Parsonage G, Filer A, Bik M, Hardie D, Lax S, Howlett K, i sur. Prolonged, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNFalpha. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(2):R47.
64. Zhang L, Yuan Y, Xu Q, Jiang Z, Chu CQ. Contribution of neutrophils in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Biomed Res.* 2019;34(2):86-93.
65. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2001;167(3):1601-8.
66. Tanaka D, Kagari T, Doi H, Shimozato T. Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis. *Immunology.* 2006;119(2):195-202.
67. Sucur A, Jajic Z, Artukovic M, Matijasevic MI, Anic B, Flegar D, i sur. Chemokine signals are crucial for enhanced homing and differentiation of circulating osteoclast progenitor cells. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):142.
68. Yap HY, Tee SZ, Wong MM, Chow SK, Peh SC, Teow SY. Pathogenic Role of Immune Cells in Rheumatoid Arthritis: Implications in Clinical Treatment and Biomarker Development. *Cells.* 2018;7(10).
69. Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA, i sur. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* 2004;50(2):650-9.
70. Al-Saadany HM, Hussein MS, Gaber RA, Zaytoun HA. Th-17 cells and serum IL-17 in rheumatoid arthritis patients: Correlation with disease activity and severity. *The Egyptian Rheumatologist.* 2016;38(1):1-7.

71. Chen DY, Chen YM, Chen HH, Hsieh CW, Lin CC, Lan JL. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(4):R126.
72. Ciccia F, Guggino G, Rizzo A, Manzo A, Vitolo B, La Manna MP, i sur. Potential involvement of IL-9 and Th9 cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2015;54(12):2264-72.
73. Chowdhury K, Kumar U, Das S, Chaudhuri J, Kumar P, Kanjilal M, i sur. Synovial IL-9 facilitates neutrophil survival, function and differentiation of Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(1):18.
74. Ponchel F, Vital E, Kingsbury SR, El-Sherbiny MY. CD4+ T-cell subsets in rheumatoid arthritis. *Int J Clin Rheumatol.* 2012;7:37–53.
75. Gravallese EM, Goldring SR. Cellular mechanisms and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(10):2143-51.
76. Meednu N, Zhang H, Owen T, Sun W, Wang V, Cistrone C, i sur. Production of RANKL by Memory B Cells: A Link Between B Cells and Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(4):805-16.
77. Bollow M, Fischer T, Reisschauer H, Backhaus M, Sieper J, Hamm B, i sur. Quantitative analyses of sacroiliac biopsies in spondyloarthropathies: T cells and macrophages predominate in early and active sacroiliitis- cellularity correlates with the degree of enhancement detected by magnetic resonance imaging. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(2):135-40.
78. Wang D, Hou Z, Gong Y, Chen S, Lin L, Xiao Z. Bone edema on magnetic resonance imaging is highly associated with low bone mineral density in patients with ankylosing spondylitis. *PLoS One.* 2017;12(12):e0189569.
79. Taljanovic MS, Graham AR, Benjamin JB, Gmitro AF, Krupinski EA, Schwartz SA, i sur. Bone marrow edema pattern in advanced hip osteoarthritis: quantitative assessment with magnetic resonance imaging and correlation with clinical examination, radiographic findings, and histopathology. *Skeletal Radiol.* 2008;37(5):423-31.
80. Zanetti M, Bruder E, Romero J, Hodler J. Bone marrow edema pattern in osteoarthritic knees: correlation between MR imaging and histologic findings. *Radiology.* 2000;215(3):835-40.
81. Sudol-Szopinska I, Kontny E, Maslinski W, Prochorec-Sobieszek M, Warczynska A, Kwiatkowska B. Significance of bone marrow edema in pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Pol J Radiol.* 2013;78(1):57-63.

82. Haavardsholm EA, Boyesen P, Ostergaard M, Schildvold A, Kvien TK. Magnetic resonance imaging findings in 84 patients with early rheumatoid arthritis: bone marrow oedema predicts erosive progression. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(6):794-800.
83. McQueen FM, Benton N, Perry D, Crabbe J, Robinson E, Yeoman S, i sur. Bone edema scored on magnetic resonance imaging scans of the dominant carpus at presentation predicts radiographic joint damage of the hands and feet six years later in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(7):1814-27.
84. Braun J, Landewe R, Hermann KG, Han J, Yan S, Williamson P, i sur. Major reduction in spinal inflammation in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled magnetic resonance imaging study. *Arthritis Rheum.* 2006;54(5):1646-52.
85. Kuca-Warnawin E, Burakowski T, Kurowska W, Prochorec-Sobieszek M, Radzikowska A, Chorazy-Massalska M, i sur. Elevated number of recently activated T cells in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: a role for interleukin 15? *Ann Rheum Dis.* 2011;70(1):227-33.
86. Dalbeth N, Smith T, Gray S, Doyle A, Antill P, Lobo M, i sur. Cellular characterisation of magnetic resonance imaging bone oedema in rheumatoid arthritis; implications for pathogenesis of erosive disease. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(2):279-82.
87. Jimenez-Boj E, Redlich K, Turk B, Hanslik-Schnabel B, Wanivenhaus A, Chott A, i sur. Interaction between synovial inflammatory tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2005;175(4):2579-88.
88. Jimenez-Boj E, Nobauer-Huhmann I, Hanslik-Schnabel B, Dorotka R, Wanivenhaus AH, Kainberger F, i sur. Bone erosions and bone marrow edema as defined by magnetic resonance imaging reflect true bone marrow inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(4):1118-24.
89. Bugatti S, Caporali R, Manzo A, Vitolo B, Pitzalis C, Montecucco C. Involvement of subchondral bone marrow in rheumatoid arthritis: lymphoid neogenesis and in situ relationship to subchondral bone marrow osteoclast recruitment. *Arthritis Rheum.* 2005;52(11):3448-59.
90. Flegar D. Karakterizacija reakcije osteoklastnih progenitora i pojačane osteoresorpcije u mišjem modelu reumatoidnoga artritisa [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2018.

91. Silvagni E, Giollo A, Sakellariou G, Ughi N, D'Amico ME, Scirè CA, i sur. One year in review 2020: novelties in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2020;38(2):181-94.
92. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Optimisation of a treat-to-target approach in rheumatoid arthritis: strategies for the 3-month time point. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(8):1479-85.
93. Smolen JS, Landewe RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, i sur. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis*. 2020.
94. Balogh E, Madruga Dias J, Orr C, Mullan R, Harty L, FitzGerald O, i sur. Comparison of remission criteria in a tumour necrosis factor inhibitor treated rheumatoid arthritis longitudinal cohort: patient global health is a confounder. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6):R221.
95. Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001;1(4):377-85.
96. Wang H, Kadlec TA, Au-Yeung BB, Goodfellow HE, Hsu LY, Freedman TS, i sur. ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(5):a002279.
97. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S, i sur. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*. 2003;426(6965):454-60.
98. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell*. 1996;87(5):811-22.
99. Christensen AD, Haase C, Cook AD, Hamilton JA. K/BxN Serum-Transfer Arthritis as a Model for Human Inflammatory Arthritis. *Front Immunol*. 2016;7:213.
100. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslari E, Kioussis D, i sur. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo j*. 1991;10(13):4025-31.
101. Butler DM, Malfait AM, Mason LJ, Warden PJ, Kollias G, Maini RN, i sur. DBA/1 mice expressing the human TNF-alpha transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition. *J Immunol*. 1997;159(6):2867-76.

102. Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, i sur. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191(2):313-20.
103. Niki Y, Yamada H, Seki S, Kikuchi T, Takaishi H, Toyama Y, i sur. Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 alpha transgenic mice. *J Clin Invest.* 2001;107(9):1127-35.
104. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2001;70(6):849-60.
105. Pearson CM. Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956;91(1):95-101.
106. Vingsbo C, Sahlstrand P, Brun JG, Jonsson R, Saxne T, Holmdahl R. Pristane-induced arthritis in rats: a new model for rheumatoid arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes. *Am J Pathol.* 1996;149(5):1675-83.
107. Kimpel D, Dayton T, Kannan K, Wolf RE. Streptococcal cell wall arthritis: kinetics of immune cell activation in inflammatory arthritis. *Clin Immunol.* 2002;105(3):351-62.
108. Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology.* 2005;12(3):167-81.
109. Dumonde DC, Glynn LE. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. *Br J Exp Pathol.* 1962;43:373-83.
110. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum.* 1977;20(3):841-50.
111. van den Berg W, Joosten LAB, van Lent PLEM. Murine antigen-induced arthritis. In: Cope A, editor. *Methods in molecular medicine: Arthritis research.* 2. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2007. p. 243-53.
112. Williams RO. Rodent models of arthritis: relevance for human disease. *Clin Exp Immunol.* 1998;114(3):330-2.
113. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 2009;39(8):2040-4.
114. Engdahl C, Lindholm C, Stubelius A, Ohlsson C, Carlsten H, Lagerquist MK. Periarticular bone loss in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2013;65(11):2857-65.
115. Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature.* 2000;408(6812):535-6.
116. Deal C. Bone loss in rheumatoid arthritis: systemic, periarticular, and focal. *Curr Rheumatol Rep.* 2012;14(3):231-7.

117. Shim JH, Stavre Z, Gravallesse EM. Bone Loss in Rheumatoid Arthritis: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Calcif Tissue Int.* 2018;102(5):533-46.
118. Ideguchi H, Ohno S, Hattori H, Senuma A, Ishigatsubo Y. Bone erosions in rheumatoid arthritis can be repaired through reduction in disease activity with conventional disease-modifying antirheumatic drugs. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(3):R76.
119. Redlich K, Gortz B, Hayer S, Zwerina J, Doerr N, Kostenuik P, i sur. Repair of local bone erosions and reversal of systemic bone loss upon therapy with anti-tumor necrosis factor in combination with osteoprotegerin or parathyroid hormone in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Am J Pathol.* 2004;164(2):543-55.
120. Solomon DH, Kay J, Duryea J, Lu B, Bolster MB, Yood RA, i sur. Effects of Teriparatide on Joint Erosions in Rheumatoid Arthritis: A Randomized Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(9):1741-50.
121. Cohen SB, Dore RK, Lane NE, Ory PA, Peterfy CG, Sharp JT, i sur. Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2008;58(5):1299-309.
122. Scott DL, Pugner K, Kaarela K, Doyle DV, Woolf A, Holmes J, i sur. The links between joint damage and disability in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2000;39(2):122-32.
123. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, i sur. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569-81.
124. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 1998;152(4):943-51.
125. Flegar D, Sucur A, Markotic A, Kovacic N, Greecic D. Osteoporosis in the view of osteoimmunology: common feature underlined by different pathogenic mechanisms. *Periodicum Biologorum.* 2015;117(1):35-43.
126. Hecht C, Englbrecht M, Rech J, Schmidt S, Araujo E, Engelke K, i sur. Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann Rheum Dis.* 2015;74(12):2151-6.
127. Steffen U, Schett G, Bozec A. How Autoantibodies Regulate Osteoclast Induced Bone Loss in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol.* 2019;10:1483.

128. Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Muller R, Goldring SR, Choi Y, *i sur.* TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol.* 2001;159(5):1689-99.
129. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, *i sur.* Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000;191(2):275-86.
130. Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, Sawa S, Armaka M, Kollias G, *i sur.* RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(6):1187-95.
131. Matzelle MM, Gallant MA, Condon KW, Walsh NC, Manning CA, Stein GS, *i sur.* Resolution of inflammation induces osteoblast function and regulates the Wnt signaling pathway. *Arthritis Rheum.* 2012;64(5):1540-50.
132. Yeremenko N, Zwerina K, Rigter G, Pots D, Fonseca JE, Zwerina J, *i sur.* Tumor necrosis factor and interleukin-6 differentially regulate Dkk-1 in the inflamed arthritic joint. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(8):2071-5.
133. Idriss NK, Gamal RM, Gaber MA, El-Hakeim EH, Hammam N, Ghandour AM, *i sur.* Joint remodeling outcome of serum levels of Dickkopf-1 (DKK1), cartilage oligomeric matrix protein (COMP), and C-telopeptide of type II collagen (CTXII) in rheumatoid arthritis. *Cent Eur J Immunol.* 2020;45(1):73-9.
134. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, *i sur.* Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007;13(2):156-63.
135. Marenzana M, Vugler A, Moore A, Robinson M. Effect of sclerostin-neutralising antibody on periarticular and systemic bone in a murine model of rheumatoid arthritis: a microCT study. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R125.
136. Chen XX, Baum W, Dwyer D, Stock M, Schwabe K, Ke HZ, *i sur.* Sclerostin inhibition reverses systemic, periarticular and local bone loss in arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(10):1732-6.
137. Wehmeyer C, Frank S, Beckmann D, Bottcher M, Cromme C, Konig U, *i sur.* Sclerostin inhibition promotes TNF-dependent inflammatory joint destruction. *Sci Transl Med.* 2016;8(330):330ra35.
138. Courbon G, Lamarque R, Gerbaix M, Caire R, Linossier MT, Laroche N, *i sur.* Early sclerostin expression explains bone formation inhibition before arthritis onset in the rat adjuvant-induced arthritis model. *Sci Rep.* 2018;8(1):3492.

139. Zhang T, Ding GJ, Yang W, Xiao ZY. Tumor Necrosis Factor-alpha Inhibits Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Osteoblasts by Inhibiting Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Protein Kinase B (AKT) Pathway. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 2020;10(1):127-32.
140. Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, Higuchi C, Hirao M, Okamoto M, i sur. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. *J Bone Miner Metab*. 2014;32(4):378-92.
141. Lazic Mosler E, Lukac N, Flegar D, Fadljevic M, Radanovic I, Cvija H, i sur. Fas receptor induces apoptosis of synovial bone and cartilage progenitor populations and promotes bone loss in antigen-induced arthritis. *Faseb j*. 2019;33(3):3330-42.
142. Mosler EL, Jelusic-Drazic M, Grcevic D, Marusic A, Kovacic N. Decreased plating efficiency, proliferation and osteogenic differentiation of synovial fluid mesenchymal progenitors as a marker of severity of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(1):P35.
143. Deodhar AA, Woolf AD. Bone mass measurement and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a review. *Br J Rheumatol*. 1996;35(4):309-22.
144. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int*. 2008;19(4):385-97.
145. Straub RH, Cutolo M, Pacifici R. Evolutionary medicine and bone loss in chronic inflammatory diseases--A theory of inflammation-related osteopenia. *Semin Arthritis Rheum*. 2015;45(2):220-8.
146. Lin MS, Chen PH, Wang PC, Lin HS, Huang TJ, Chang ST, i sur. Association between hepatitis C virus infection and osteoporotic fracture risk among postmenopausal women: a cross-sectional investigation in Taiwan. *BMJ Open*. 2019;9(1):e021990.
147. van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39(12):1383-9.
148. Orlinick JR, Vaishnav AK, Elkon KB. Structure and function of Fas/Fas ligand. *Int Rev Immunol*. 1999;18(4):293-308.
149. Hughes DP, Crispe IN. A naturally occurring soluble isoform of murine Fas generated by alternative splicing. *J Exp Med*. 1995;182(5):1395-401.
150. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, i sur. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 1994;263(5154):1759-62.



151. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *Faseb j.* 2009;23(6):1625-37.
152. French LE, Hahne M, Viard I, Radlgruber G, Zanone R, Becker K, et al. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J Cell Biol.* 1996;133(2):335-43.
153. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med.* 1995;182(6):1777-83.
154. Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F, et al. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol.* 2003;23(4):1428-40.
155. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 1998;187(8):1205-13.
156. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med.* 1997;186(12):2045-50.
157. Hohlbaum AM, Moe S, Marshak-Rothstein A. Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J Exp Med.* 2000;191(7):1209-20.
158. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med.* 1998;4(1):31-6.
159. Stenqvist AC, Nagaeva O, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Exosomes secreted by human placenta carry functional Fas ligand and TRAIL molecules and convey apoptosis in activated immune cells, suggesting exosome-mediated immune privilege of the fetus. *J Immunol.* 2013;191(11):5515-23.
160. Lundy SK, Klinker MW, Fox DA. Killer B lymphocytes and their fas ligand positive exosomes as inducers of immune tolerance. *Front Immunol.* 2015;6:122.
161. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med.* 2002;195(10):1303-16.
162. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med.* 1996;2(12):1361-6.

163. Uckan D, Steele A, Cherry, Wang BY, Chamizo W, Koutsonikolis A, i sur. Trophoblasts express Fas ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. *Mol Hum Reprod.* 1997;3(8):655-62.
164. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.* 1995;270(5239):1189-92.
165. Yu KY, Kwon B, Ni J, Zhai Y, Ebner R, Kwon BS. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274(20):13733-6.
166. Voss M, Lettau M, Paulsen M, Janssen O. Posttranslational regulation of Fas ligand function. *Cell Commun Signal.* 2008;6:11.
167. Sun M, Ames KT, Suzuki I, Fink PJ. The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals. *J Immunol.* 2006;177(3):1481-91.
168. Luckerath K, Kirkin V, Melzer IM, Thalheimer FB, Siele D, Milani W, i sur. Immune modulation by Fas ligand reverse signaling: lymphocyte proliferation is attenuated by the intracellular Fas ligand domain. *Blood.* 2011;117(2):519-29.
169. Paulsen M, Valentin S, Janssen O. Reverse signaling by FasL inhibits primary human T cell activation. *Cell Communication and Signaling.* 2009;7(1):A23.
170. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(3-4):193-209.
171. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, i sur. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo j.* 1995;14(22):5579-88.
172. Yamada A, Arakaki R, Saito M, Kudo Y, Ishimaru N. Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Front Immunol.* 2017;8:403.
173. Siegmund D, Lang I, Wajant H. Cell death-independent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2. *Febs j.* 2017;284(8):1131-59.
174. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(6):725-31.
175. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, i sur. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo j.* 1998;17(6):1675-87.
176. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 2000;7(12):1166-73.

177. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 2):265-7.
178. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol.* 2000;1(6):489-95.
179. Wajant H, Haas E, Schwenzler R, Muhlenbeck F, Kreuz S, Schubert G, et al. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem.* 2000;275(32):24357-66.
180. Ahn JH, Park SM, Cho HS, Lee MS, Yoon JB, Vilcek J, et al. Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J Biol Chem.* 2001;276(50):47100-6.
181. Mandal M, Maggirwar SB, Sharma N, Kaufmann SH, Sun SC, Kumar R. Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF-kappaB signaling pathway. *J Biol Chem.* 1996;271(48):30354-9.
182. Buchbinder JH, Pischel D, Sundmacher K, Flassig RJ, Lavrik IN. Quantitative single cell analysis uncovers the life/death decision in CD95 network. *PLoS Comput Biol.* 2018;14(9):e1006368.
183. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(1):53-66.
184. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, et al. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell.* 2007;129(3):447-50.
185. Chang HY, Yang X, Baltimore D. Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1252-6.
186. Zhang J, Xu X, Liu Y. Activation-induced cell death in T cells and autoimmunity. *Cell Mol Immunol.* 2004;1(3):186-92.
187. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature.* 1995;373(6513):438-41.
188. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature.* 1995;373(6513):441-4.

189. Wong B, Arron J, Choi Y. T cell receptor signals enhance susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med.* 1997;186(11):1939-44.
190. Murphy ED, Roths JB. A Single gene model for massive lymphoproliferation with immune complex disease in new mouse strain MRL. *Faculty Research 1970-1979.* 1978:955.
191. Adachi M, Watanabe-Fukunaga R, Nagata S. Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(5):1756-60.
192. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* 1992;356(6367):314-7.
193. Roths JB, Murphy ED, Eicher EM. A new mutation, gld, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med.* 1984;159(1):1-20.
194. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, i sur. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell.* 1994;76(6):969-76.
195. Hahne M, Peitsch MC, Irmeler M, Schröter M, Lowin B, Rousseau M, i sur. Characterization of the non-functional Fas ligand of gld mice. *Int Immunol.* 1995;7(9):1381-6.
196. Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:243-69.
197. Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, i sur. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med.* 1978;148(5):1198-215.
198. Allen RD, Marshall JD, Roths JB, Sidman CL. Differences defined by bone marrow transplantation suggest that lpr and gld are mutations of genes encoding an interacting pair of molecules. *J Exp Med.* 1990;172(5):1367-75.
199. Mariani SM, Matiba B, Armandola EA, Krammer PH. The APO-1/Fas (CD95) receptor is expressed in homozygous MRL/lpr mice. *Eur J Immunol.* 1994;24(12):3119-23.
200. Adachi M, Suematsu S, Kondo T, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, i sur. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet.* 1995;11(3):294-300.
201. Karray S, Kress C, Cuvellier S, Hue-Beauvais C, Damotte D, Babinet C, i sur. Complete loss of Fas ligand gene causes massive lymphoproliferation and early death, indicating a residual activity of gld allele. *J Immunol.* 2004;172(4):2118-25.

202. Adachi M, Suematsu S, Suda T, Watanabe D, Fukuyama H, Ogasawara J, et al. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(5):2131-6.
203. Hao Z, Hampel B, Yagita H, Rajewsky K. T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis. *J Exp Med*. 2004;199(10):1355-65.
204. Hang L, Theofilopoulos AN, Balderas RS, Francis SJ, Dixon FJ. The effect of thymectomy on lupus-prone mice. *J Immunol*. 1984;132(4):1809-13.
205. Steinberg AD, Roths JB, Murphy ED, Steinberg RT, Raveche ES. Effects of thymectomy or androgen administration upon the autoimmune disease of MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J Immunol*. 1980;125(2):871-3.
206. Wu J, Zhou T, Zhang J, He J, Gause WC, Mountz JD. Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated lpr gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-lpr/lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(6):2344-8.
207. Shlomchik MJ, Madaio MP, Ni D, Trounstein M, Huszar D. The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity. *J Exp Med*. 1994;180(4):1295-306.
208. Stranges PB, Watson J, Cooper CJ, Choisy-Rossi CM, Stonebraker AC, Beighton RA, et al. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity*. 2007;26(5):629-41.
209. Hao Z, Duncan GS, Seagal J, Su YW, Hong C, Haight J, et al. Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis. *Immunity*. 2008;29(4):615-27.
210. Cuda CM, Agrawal H, Misharin AV, Haines GK, 3rd, Hutcheson J, Weber E, et al. Requirement of myeloid cell-specific Fas expression for prevention of systemic autoimmunity in mice. *Arthritis Rheum*. 2012;64(3):808-20.
211. Rouvier E, Luciani MF, Golstein P. Fas involvement in Ca<sup>2+</sup>-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med*. 1993;177(1):195-200.
212. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med*. 1998;188(12):2375-80.
213. Screpanti V, Wallin RP, Grandien A, Ljunggren HG. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol*. 2005;42(4):495-9.

214. Sinha P, Chornoguz O, Clements VK, Artemenko KA, Zubarev RA, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells express the death receptor Fas and apoptose in response to T cell-expressed FasL. *Blood*. 2011;117(20):5381-90.
215. Alenzi FQ, Marley SB, Lewis JL, Chandrashekrana A, Warrens AN, Goldman JM, et al. A role for the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in regulating myeloid progenitor cell kinetics. *Exp Hematol*. 2002;30(12):1428-35.
216. Traver D, Akashi K, Weissman IL, Lagasse E. Mice defective in two apoptosis pathways in the myeloid lineage develop acute myeloblastic leukemia. *Immunity*. 1998;9(1):47-57.
217. Takeuchi T, Ueki T, Nishimatsu H, Kajiwara T, Ishida T, Jishage K, et al. Accelerated rejection of Fas ligand-expressing heart grafts. *J Immunol*. 1999;162(1):518-22.
218. Kang SM, Schneider DB, Lin Z, Hanahan D, Dichek DA, Stock PG, et al. Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat Med*. 1997;3(7):738-43.
219. Ottonello L, Tortolina G, Amelotti M, Dallegri F. Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol*. 1999;162(6):3601-6.
220. Seino K, Iwabuchi K, Kayagaki N, Miyata R, Nagaoka I, Matsuzawa A, et al. Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *J Immunol*. 1998;161(9):4484-8.
221. Abreu-Martin MT, Vidrich A, Lynch DH, Targan SR. Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-alpha and ligation of Fas antigen. *J Immunol*. 1995;155(9):4147-54.
222. Gao L, Gülcüler GS, Golbach L, Block H, Zarbock A, Martin-Villalba A. Endothelial cell-derived CD95 ligand serves as a chemokine in induction of neutrophil slow rolling and adhesion. *Elife*. 2016;5.
223. Sekine C, Yagita H, Kobata T, Hasunuma T, Nishioka K, Okumura K. Fas-mediated stimulation induces IL-8 secretion by rheumatoid arthritis synoviocytes independently of CPP32-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;228(1):14-20.
224. Rescigno M, Piguet V, Valzasina B, Lens S, Zubler R, French L, et al. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med*. 2000;192(11):1661-8.

225. Bossaller L, Chiang PI, Schmidt-Lauber C, Ganesan S, Kaiser WJ, Rathinam VA, et al. Cutting edge: FAS (CD95) mediates noncanonical IL-1 $\beta$  and IL-18 maturation via caspase-8 in an RIP3-independent manner. *J Immunol*. 2012;189(12):5508-12.
226. Miwa K, Asano M, Horai R, Iwakura Y, Nagata S, Suda T. Caspase 1-independent IL-1 $\beta$  release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med*. 1998;4(11):1287-92.
227. Schaub FJ, Han DK, Liles WC, Adams LD, Coats SA, Ramachandran RK, et al. Fas/FADD-mediated activation of a specific program of inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells. *Nat Med*. 2000;6(7):790-6.
228. Choi C, Gillespie GY, Van Wagoner NJ, Benveniste EN. Fas engagement increases expression of interleukin-6 in human glioma cells. *J Neurooncol*. 2002;56(1):13-9.
229. Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, et al. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med*. 1993;178(6):2231-5.
230. Josefsen D, Myklebust JH, Lynch DH, Stokke T, Blomhoff HK, Smeland EB. Fas ligand promotes cell survival of immature human bone marrow CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> hematopoietic progenitor cells by suppressing apoptosis. *Exp Hematol*. 1999;27(9):1451-9.
231. Kovacic N, Lukić IK, Grcević D, Katavić V, Croucher P, Marusić A. The Fas/Fas ligand system inhibits differentiation of murine osteoblasts but has a limited role in osteoblast and osteoclast apoptosis. *J Immunol*. 2007;178(6):3379-89.
232. Lepri E, Delfino DV, Migliorati G, Moraca R, Ayroldi E, Riccardi C. Functional expression of Fas on mouse bone marrow stromal cells: upregulation by tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$ . *Exp Hematol*. 1998;26(13):1202-8.
233. Ozeki N, Mogi M, Nakamura H, Togari A. Differential expression of the Fas-Fas ligand system on cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cells. *Arch Oral Biol*. 2002;47(7):511-7.
234. Hatakeyama S, Tomichi N, Ohara-Nemoto Y, Satoh M. The immunohistochemical localization of Fas and Fas ligand in jaw bone and tooth germ of human fetuses. *Calcif Tissue Int*. 2000;66(5):330-7.
235. Bu R, Borysenko CW, Li Y, Cao L, Sabokbar A, Blair HC. Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts. *Bone*. 2003;33(5):760-70.
236. Qiao C, Xu W, Zhu W, Hu J, Qian H, Yin Q, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Int*. 2008;32(1):8-15.

237. Wiczorek G, Steinhoff C, Schulz R, Scheller M, Vingron M, Ropers HH, i sur. Gene expression profile of mouse bone marrow stromal cells determined by cDNA microarray analysis. *Cell Tissue Res.* 2003;311(2):227-37.
238. Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM. Osteoclast apoptosis: the role of Fas in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 2003;144(12):5545-55.
239. Park H, Jung YK, Park OJ, Lee YJ, Choi JY, Choi Y. Interaction of Fas ligand and Fas expressed on osteoclast precursors increases osteoclastogenesis. *J Immunol.* 2005;175(11):7193-201.
240. Ogawa Y, Ohtsuki M, Uzuki M, Sawai T, Onozawa Y, Nakayama J, i sur. Suppression of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis by induction of apoptosis in activated CD4+ T cells. *Arthritis Rheum.* 2003;48(12):3350-8.
241. Krum SA, Miranda-Carboni GA, Hauschka PV, Carroll JS, Lane TF, Freedman LP, i sur. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *Embo j.* 2008;27(3):535-45.
242. Wang L, Liu S, Zhao Y, Liu D, Liu Y, Chen C, i sur. Osteoblast-induced osteoclast apoptosis by fas ligand/FAS pathway is required for maintenance of bone mass. *Cell Death Differ.* 2015;22(10):1654-64.
243. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, i sur. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell.* 2007;130(5):811-23.
244. Kovacic N, Grcevic D, Katavic V, Lukic IK, Marusic A. Targeting Fas in osteoresorptive disorders. *Expert Opin Ther Targets.* 2010;14(10):1121-34.
245. Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T, Matsuoka N, Urayama S, Kawabe Y, i sur. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *J Lab Clin Med.* 1999;134(3):222-31.
246. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Koji T, Urayama S, i sur. Fas and Fas ligand interaction is necessary for human osteoblast apoptosis. *J Bone Miner Res.* 1997;12(10):1637-46.
247. Duque G, El Abdaimi K, Henderson JE, Lomri A, Kremer R. Vitamin D inhibits Fas ligand-induced apoptosis in human osteoblasts by regulating components of both the mitochondrial and Fas-related pathways. *Bone.* 2004;35(1):57-64.
248. Kovacic N, Grcevic D, Katavic V, Lukic IK, Grubisic V, Mihovilovic K, i sur. Fas receptor is required for estrogen deficiency-induced bone loss in mice. *Lab Invest.* 2010;90(3):402-13.



249. Kohara H, Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Morita Y, Eguchi T, i sur. IFN- $\gamma$  directly inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteoclastogenesis in vitro and in vivo and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions. *Immunol Lett.* 2011;137(1-2):53-61.
250. Garcia AJ, Tom C, Guemes M, Polanco G, Mayorga ME, Wend K, i sur. ER $\alpha$  signaling regulates MMP3 expression to induce FasL cleavage and osteoclast apoptosis. *J Bone Miner Res.* 2013;28(2):283-90.
251. Katavić V, Lukić IK, Kovacić N, Grcević D, Lorenzo JA, Marusić A. Increased bone mass is a part of the generalized lymphoproliferative disorder phenotype in the mouse. *J Immunol.* 2003;170(3):1540-7.
252. Svandova E, Vesela B, Lesot H, Sadoine J, Poliard A, Matalova E. FasL Modulates Expression of Mmp2 in Osteoblasts. *Front Physiol.* 2018;9:1314.
253. Mori S, Nose M, Chiba M, Narita K, Kumagai M, Kosaka H, i sur. Enhancement of ectopic bone formation in mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis. *Pathol Int.* 1997;47(2-3):112-6.
254. Katavić V, Grcević D, Lukić IK, Vucenik V, Kovacić N, Kalajzić I, i sur. Non-functional Fas ligand increases the formation of cartilage early in the endochondral bone induction by rhBMP-2. *Life Sci.* 2003;74(1):13-28.
255. Al-Sebaei MO, Daukss DM, Belkina AC, Kakar S, Wigner NA, Cusher D, i sur. Role of Fas and Treg cells in fracture healing as characterized in the fas-deficient (lpr) mouse model of lupus. *J Bone Miner Res.* 2014;29(6):1478-91.
256. Lukić IK, Kovacić N, Katavić V, Grcević D, Ivcević S, Marusić A. Shared circulation in parabiosis leads to the transfer of bone phenotype from gld to the wild-type mice. *Cell Immunol.* 2005;233(2):133-9.
257. García-Moreno C, Catalán MP, Ortiz A, Alvarez L, De la Piedra C. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women. *Bone.* 2004;35(1):170-7.
258. Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, i sur. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature.* 1993;364(6440):806-9.
259. Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, Kunitake R, Fujita M, Kawasaki M, i sur. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;17(3):272-8.
260. Hill LL, Ouhtit A, Loughlin SM, Kripke ML, Ananthaswamy HN, Owen-Schaub LB. Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science.* 1999;285(5429):898-900.

261. Petri S, Kiaei M, Wille E, Calingasan NY, Flint Beal M. Loss of Fas ligand-function improves survival in G93A-transgenic ALS mice. *J Neurol Sci.* 2006;251(1-2):44-9.
262. Desbarats J, Newell MK. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med.* 2000;6(8):920-3.
263. Desbarats J, Birge RB, Mimouni-Rongy M, Weinstein DE, Palerme JS, Newell MK. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol.* 2003;5(2):118-25.
264. Zuliani C, Kleber S, Klussmann S, Wenger T, Kenzelmann M, Schreglmann N, i sur. Control of neuronal branching by the death receptor CD95 (Fas/Apo-1). *Cell Death Differ.* 2006;13(1):31-40.
265. Jelaska A, Korn JH. Anti-Fas induces apoptosis and proliferation in human dermal fibroblasts: differences between foreskin and adult fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1998;175(1):19-29.
266. Freiberg RA, Spencer DM, Choate KA, Duh HJ, Schreiber SL, Crabtree GR, i sur. Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1997;108(2):215-9.
267. Aggarwal BB, Singh S, LaPushin R, Totpal K. Fas antigen signals proliferation of normal human diploid fibroblast and its mechanism is different from tumor necrosis factor receptor. *FEBS Lett.* 1995;364(1):5-8.
268. Legembre P, Schickel R, Barnhart BC, Peter ME. Identification of SNF1/AMP kinase-related kinase as an NF-kappaB-regulated anti-apoptotic kinase involved in CD95-induced motility and invasiveness. *J Biol Chem.* 2004;279(45):46742-7.
269. Cai Z, Yang F, Yu L, Yu Z, Jiang L, Wang Q, i sur. Activated T cell exosomes promote tumor invasion via Fas signaling pathway. *J Immunol.* 2012;188(12):5954-61.
270. Barnhart BC, Legembre P, Pietras E, Bubici C, Franzoso G, Peter ME. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *Embo j.* 2004;23(15):3175-85.
271. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med.* 1999;130(7):591-601.
272. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med.* 1997;3(4):409-13.

273. Abe R, Shimizu T, Shibaki A, Nakamura H, Watanabe H, Shimizu H. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome are induced by soluble Fas ligand. *Am J Pathol.* 2003;162(5):1515-20.
274. Volpe E, Sambucci M, Battistini L, Borsellino G. Fas-Fas Ligand: Checkpoint of T Cell Functions in Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2016;7:382.
275. Shustov A, Nguyen P, Finkelman F, Elkon KB, Via CS. Differential expression of Fas and Fas ligand in acute and chronic graft-versus-host disease: up-regulation of Fas and Fas ligand requires CD8<sup>+</sup> T cell activation and IFN-gamma production. *J Immunol.* 1998;161(6):2848-55.
276. Stassi G, Zeuner A, Di Liberto D, Todaro M, Ricci-Vitiani L, De Maria R. Fas-FasL in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Immunol.* 2001;21(1):19-23.
277. Calmon-Hamaty F, Audo R, Combe B, Morel J, Hahne M. Targeting the Fas/FasL system in Rheumatoid Arthritis therapy: Promising or risky? *Cytokine.* 2015;75(2):228-33.
278. Kim HA, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42(7):1528-37.
279. Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, Lotz M. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1997;40(10):1749-55.
280. Tu-Rapp H, Hammermüller A, Mix E, Kreutzer HJ, Goerlich R, Köhler H, i sur. A proinflammatory role for Fas in joints of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(5):R404-14.
281. Ma Y, Liu H, Tu-Rapp H, Thiesen HJ, Ibrahim SM, Cole SM, i sur. Fas ligation on macrophages enhances IL-1R1-Toll-like receptor 4 signaling and promotes chronic inflammation. *Nat Immunol.* 2004;5(4):380-7.
282. Huang QQ, Birkett R, Koessler RE, Cuda CM, Haines GK, 3rd, Jin JP, i sur. Fas signaling in macrophages promotes chronicity in K/BxN serum-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(1):68-77.
283. Malipiero U, Frei K, Spanaus KS, Agresti C, Lassmann H, Hahne M, i sur. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis is chronic/relapsing in perforin knockout mice, but monophasic in Fas- and Fas ligand-deficient *lpr* and *gld* mice. *Eur J Immunol.* 1997;27(12):3151-60.
284. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA, Jr., i sur. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell.* 1997;89(1):17-24.
285. Peng SL. Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45(1):26-30.

286. Kim SH, Kim S, Oligino TJ, Robbins PD. Effective treatment of established mouse collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express FasL. *Mol Ther.* 2002;6(5):584-90.
287. Zhang H, Yang Y, Horton JL, Samoilova EB, Judge TA, Turka LA, i sur. Amelioration of collagen-induced arthritis by CD95 (Apo-1/Fas)-ligand gene transfer. *J Clin Invest.* 1997;100(8):1951-7.
288. Collison AM, Sokulsky LA, Sherrill JD, Nightingale S, Hatchwell L, Talley NJ, i sur. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) regulates midline-1, thymic stromal lymphopoietin, inflammation, and remodeling in experimental eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(4):971-82.
289. Collison A, Hatchwell L, Verrills N, Wark PA, de Siqueira AP, Tooze M, i sur. The E3 ubiquitin ligase midline 1 promotes allergen and rhinovirus-induced asthma by inhibiting protein phosphatase 2A activity. *Nat Med.* 2013;19(2):232-7.
290. Matthes F, Hettich MM, Schilling J, Flores-Dominguez D, Blank N, Wiglenda T, i sur. Inhibition of the MID1 protein complex: a novel approach targeting APP protein synthesis. *Cell Death Discov.* 2018;4:4.
291. Schweiger S, Matthes F, Posey K, Kickstein E, Weber S, Hettich MM, i sur. Resveratrol induces dephosphorylation of Tau by interfering with the MID1-PP2A complex. *Sci Rep.* 2017;7(1):13753.
292. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007;39(2):175-91.
293. Odobasic D, Leech MT, Xue JR, Holdsworth SR. Distinct in vivo roles of CD80 and CD86 in the effector T-cell responses inducing antigen-induced arthritis. *Immunology.* 2008;124(4):503-13.
294. Lewis JS, Hembree WC, Furman BD, Tippets L, Cattell D, Huebner JL, i sur. Acute joint pathology and synovial inflammation is associated with increased intra-articular fracture severity in the mouse knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(7):864-73.
295. Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(5):1663-7.
296. Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics.* 2010;26(19):2363-7.

297. Carvalho B. pd.mogene.2.0.st: Platform Design Info for Affymetrix MoGene-2\_0-st [R package]. 3.14.1. ed2015.
298. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, i sur. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47.
299. MacDonald JW. affycoretools: Functions useful for those doing repetitive analyses with Affymetrix GeneChips [R package]. 1.60.0 ed2020.
300. MacDonald JW. mogene20stranscriptcluster.db: Affymetrix mogene20 annotation data (chip mogene20stranscriptcluster) [R package]. 8.7.0. ed2017.
301. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics.* 2012;16(5):284-7.
302. Gentleman R, Carey V, Huber W, Hahne F. genefilter: genefilter: methods for filtering genes from high-throughput experiments [R package]. 1.70.0. ed2020.
303. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3:Article3.
304. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological).* 1995;57(1):289-300.
305. Boyle EI, Weng S, Gollub J, Jin H, Botstein D, Cherry JM, i sur. GO::TermFinder-- open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics.* 2004;20(18):3710-5.
306. Picelli S, Björklund Å K, Faridani OR, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods.* 2013;10(11):1096-8.
307. Ramsköld D, Luo S, Wang YC, Li R, Deng Q, Faridani OR, i sur. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol.* 2012;30(8):777-82.
308. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. 2011. 2011;17(1):3 %J EMBnet.journal.
309. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods.* 2015;12(4):357-60.
310. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, i sur. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-9.

311. Wang L, Wang S, Li W. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics*. 2012;28(16):2184-5.
312. Pertea M, Pertea GM, Antonescu CM, Chang TC, Mendell JT, Salzberg SL. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol*. 2015;33(3):290-5.
313. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26(1):139-40.
314. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*. 2010;11(3):R25.
315. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol*. 2014;15(2):R29.
316. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-50.
317. Collison A, Li J, Pereira de Siqueira A, Zhang J, Toop HD, Morris JC, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand regulates hallmark features of airways remodeling in allergic airways disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;51(1):86-93.
318. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*. 2012;14(1):22-9.
319. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(16):7297-301.
320. Akinc A, Thomas M, Klibanov AM, Langer R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J Gene Med*. 2005;7(5):657-63.
321. Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, Winter J, Krauss S, Ropers HH, et al. MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet*. 2001;29(3):287-94.
322. Debaisieux S, Rayne F, Yezid H, Beaumelle B. The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic*. 2012;13(3):355-63.
323. Ståhlberg A, Håkansson J, Xian X, Semb H, Pfaffl P, Åman P, et al. Advanced quantitative real-time PCR in clinical diagnostics and cDNA microarray validation. 1st European Conference in Functional Genomics and Diseases; Prague, Czech Republic 2003.

324. Rojewski MT, Weber BM, Schrezenmeier H. Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. *Transfus Med Hemother*. 2008;35(3):168-84.
325. Sung JH, Yang HM, Park JB, Choi GS, Joh JW, Kwon CH, i sur. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*. 2008;40(8):2649-54.
326. Ito MR, Terasaki S, Itoh J, Katoh H, Yonehara S, Nose M. Rheumatic diseases in an MRL strain of mice with a deficit in the functional Fas ligand. *Arthritis Rheum*. 1997;40(6):1054-63.
327. Kamogawa J, Terada M, Mizuki S, Nishihara M, Yamamoto H, Mori S, i sur. Arthritis in MRL/lpr mice is under the control of multiple gene loci with an allelic combination derived from the original inbred strains. *Arthritis Rheum*. 2002;46(4):1067-74.
328. Fadljević M, Radanović I. Procjena učinka imunizacije na generalizirani i subkondralni gubitak kosti u tijeku artritisa potaknutog antigenom [studentski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2017.
329. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, i sur. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*. 2016;7:12150.
330. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem*. 2005;280(2):1336-45.
331. Mackey JBG, Coffelt SB, Carlin LM. Neutrophil Maturity in Cancer. *Front Immunol*. 2019;10:1912.
332. Hestdal K, Ruscetti FW, Ihle JN, Jacobsen SE, Dubois CM, Kopp WC, i sur. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J Immunol*. 1991;147(1):22-8.
333. Kontinen YT, Bergroth V, Nordström D, Koota K, Skrifvars B, Hagman G, i sur. Cellular immunohistopathology of acute, subacute, and chronic synovitis in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1985;44(8):549-55.
334. Mohr W, Westerhellweg H, Wessinghage D. Polymorphonuclear granulocytes in rheumatic tissue destruction. III. an electron microscopic study of PMNs at the pannus-cartilage junction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1981;40(4):396-9.
335. Weinmann P, Moura RA, Caetano-Lopes JR, Pereira PA, Canhão H, Queiroz MV, i sur. Delayed neutrophil apoptosis in very early rheumatoid arthritis patients is abrogated by methotrexate therapy. *Clin Exp Rheumatol*. 2007;25(6):885-7.

336. Morell M, Varela N, Marañón C. Myeloid Populations in Systemic Autoimmune Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;53(2):198-218.
337. Lawlor KE, Campbell IK, Metcalf D, O'Donnell K, van Nieuwenhuijze A, Roberts AW, i sur. Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(31):11398-403.
338. Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Hamilton JA. The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J Leukoc Biol*. 2000;68(1):144-50.
339. Eyles JL, Hickey MJ, Norman MU, Croker BA, Roberts AW, Drake SF, i sur. A key role for G-CSF-induced neutrophil production and trafficking during inflammatory arthritis. *Blood*. 2008;112(13):5193-201.
340. Miyahara H, Hotokebuchi T, Saikawa I, Arita C, Takagishi K, Sugioka Y. The effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on passive collagen-induced arthritis transferred with anti-type II collagen antibody. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993;69(1):69-76.
341. Snowden JA, Biggs JC, Milliken ST, Fuller A, Staniforth D, Passuello F, i sur. A randomised, blinded, placebo-controlled, dose escalation study of the tolerability and efficacy of filgrastim for haemopoietic stem cell mobilisation in patients with severe active rheumatoid arthritis. *Bone Marrow Transplant*. 1998;22(11):1035-41.
342. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(10):593-601.
343. Poubelle PE. Neutrophils present in synovial fluids and tissues of rheumatoid arthritis are a major source of RANKL [pismo uredniku]. *Ann Rheum Dis*. 2011. [pristupljeno 05.05.2020.]. Dostupno na: <https://ard.bmj.com/content/neutrophils-present-synovial-fluids-and-tissues-rheumatoid-arthritis-are-major-source-rankl>.
344. Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1996;39(1):115-24.
345. Duchamp de Lageneste O, Julien A, Abou-Khalil R, Frangi G, Carvalho C, Cagnard N, i sur. Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. *Nat Commun*. 2018;9(1):773.
346. Ortinau LC, Wang H, Lei K, Deveza L, Jeong Y, Hara Y, i sur. Identification of Functionally Distinct Mx1+ $\alpha$ SMA+ Periosteal Skeletal Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2019;25(6):784-96.e5.



347. Worthley DL, Churchill M, Compton JT, Tailor Y, Rao M, Si Y, i sur. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. *Cell*. 2015;160(1-2):269-84.
348. Yue R, Zhou BO, Shimada IS, Zhao Z, Morrison SJ. Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow. *Cell Stem Cell*. 2016;18(6):782-96.
349. Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):154-68.
350. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(11):656-64.
351. Schett G, Stolina M, Dwyer D, Zack D, Uderhardt S, Krönke G, i sur. Tumor necrosis factor alpha and RANKL blockade cannot halt bony spur formation in experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(9):2644-54.
352. Dormer P, Spitzer E, Moller W. EDR is a stress-related survival factor from stroma and other tissues acting on early haematopoietic progenitors (E-Mix). *Cytokine*. 2004;27(2-3):47-57.
353. Kim KE, Kim S, Park S, Houh Y, Yang Y, Park SB, i sur. Therapeutic effect of erythroid differentiation regulator 1 (*Erdr1*) on collagen-induced arthritis in DBA/1J mouse. *Oncotarget*. 2016;7(47):76354-61.
354. Weis AM, Soto R, Round JL. Commensal regulation of T cell survival through *Erdr1*. *Gut Microbes*. 2018;9(5):458-64.
355. Soto R, Petersen C, Novis CL, Kubinak JL, Bell R, Stephens WZ, i sur. Microbiota promotes systemic T-cell survival through suppression of an apoptotic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(21):5497-502.
356. Houh YK, Kim KE, Park HJ, Cho D. Roles of Erythroid Differentiation Regulator 1 (*Erdr1*) on Inflammatory Skin Diseases. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12).
357. Kim KE, Houh Y, Lee J, Kim S, Cho D, Park HJ. Downregulation of erythroid differentiation regulator 1 (*Erdr1*) plays a critical role in psoriasis pathogenesis. *Exp Dermatol*. 2016;25(7):570-2.
358. Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(6):961-8.
359. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, i sur. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*. 1998;93(7):1159-70.

360. Murphy-Ullrich JE, Lu A, Lei W, Suto MJ. TGF-beta Regulation by the Matricellular Protein Thrombospondin 1. *Faseb j.* 2020;34(S1):1-.
361. Manna PP, Dimitry J, Oldenborg PA, Frazier WA. CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2005;280(33):29637-44.
362. Jou IM, Shiau AL, Chen SY, Wang CR, Shieh DB, Tsai CS, i sur. Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52(1):339-44.
363. Manns JM, Uknis AB, Rico MC, Agelan A, Castaneda J, Arango I, i sur. A peptide from thrombospondin 1 modulates experimental erosive arthritis by regulating connective tissue growth factor. *Arthritis Rheum.* 2006;54(8):2415-22.
364. Rico MC, Manns JM, Driban JB, Uknis AB, Kunapuli SP, Dela Cadena RA. Thrombospondin-1 and transforming growth factor beta are pro-inflammatory molecules in rheumatoid arthritis. *Transl Res.* 2008;152(2):95-8.
365. Stuhlmuller B, Ungethum U, Scholze S, Martinez L, Backhaus M, Kraetsch HG, i sur. Identification of known and novel genes in activated monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(4):775-90.
366. Rico MC, Rough JJ, Del Carpio-Cano FE, Kunapuli SP, DeLa Cadena RA. The axis of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor: an emerging therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2010;8(3):338-43.
367. Han X, Du H, Massiah MA. Detection and characterization of the in vitro e3 ligase activity of the human MID1 protein. *J Mol Biol.* 2011;407(4):505-20.
368. Baldini R, Mascaro M, Meroni G. The MID1 gene product in physiology and disease. *Gene.* 2020;747:144655.
369. Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EI, Berger W, i sur. Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet.* 1997;17(3):285-91.
370. Robin NH, Opitz JM, Muenke M. Opitz G/BBB syndrome: clinical comparisons of families linked to Xp22 and 22q, and a review of the literature. *Am J Med Genet.* 1996;62(3):305-17.
371. Lancioni A, Pizzo M, Fontanella B, Ferrentino R, Napolitano LM, De Leonibus E, i sur. Lack of Mid1, the mouse ortholog of the Opitz syndrome gene, causes abnormal development of the anterior cerebellar vermis. *J Neurosci.* 2010;30(8):2880-7.

372. Dal Zotto L, Quaderi NA, Elliott R, Lingerfelter PA, Carrel L, Valsecchi V, i sur. The mouse *Mid1* gene: implications for the pathogenesis of Opitz syndrome and the evolution of the mammalian pseudoautosomal region. *Hum Mol Genet.* 1998;7(3):489-99.
373. Boding L, Hansen AK, Nielsen MM, Meroni G, Braunstein TH, Woetmann A, i sur. *Midline 1* controls polarization and migration of murine cytotoxic T cells. *Immun Inflamm Dis.* 2014;2(4):262-71.
374. Boding L, Hansen AK, Meroni G, Johansen BB, Braunstein TH, Bonefeld CM, i sur. *Midline 1* directs lytic granule exocytosis and cytotoxicity of mouse killer T cells. *Eur J Immunol.* 2014;44(10):3109-18.
375. Aranda-Orgilles B, Rutschow D, Zeller R, Karagiannidis AI, Kohler A, Chen C, i sur. Protein phosphatase 2A (PP2A)-specific ubiquitin ligase MID1 is a sequence-dependent regulator of translation efficiency controlling 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK-1). *J Biol Chem.* 2011;286(46):39945-57.
376. Collison AM, Li J, de Siqueira AP, Lv X, Toop HD, Morris JC, i sur. TRAIL signals through the ubiquitin ligase MID1 to promote pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2019;19(1):31.
377. Kong M, Ditsworth D, Lindsten T, Thompson CB. Alpha4 is an essential regulator of PP2A phosphatase activity. *Mol Cell.* 2009;36(1):51-60.
378. Reynhout S, Janssens V. Physiologic functions of PP2A: Lessons from genetically modified mice. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019;1866(1):31-50.
379. Mazhar S, Taylor SE, Sangodkar J, Narla G. Targeting PP2A in cancer: Combination therapies. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019;1866(1):51-63.
380. Wlodarchak N, Xing Y. PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2016;51(3):162-84.
381. Witt J, Barisic S, Schumann E, Allgower F, Sawodny O, Sauter T, i sur. Mechanism of PP2A-mediated IKK beta dephosphorylation: a systems biological approach. *BMC Syst Biol.* 2009;3:71.
382. Clark AR, Ohlmeyer M. Protein phosphatase 2A as a therapeutic target in inflammation and neurodegeneration. *Pharmacol Ther.* 2019;201:181-201.
383. Sharabi A, Li H, Kasper IR, Pan W, Meidan E, Tsokos MG, i sur. PP2A enables IL-2 signaling by preserving IL-2Rbeta chain expression during Treg development. *JCI Insight.* 2019;5.

384. Apostolidis SA, Rodriguez-Rodriguez N, Suarez-Fueyo A, Dioufa N, Ozcan E, Crispin JC, i sur. Phosphatase PP2A is requisite for the function of regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2016;17(5):556-64.
385. Sun L, Pham TT, Cornell TT, McDonough KL, McHugh WM, Blatt NB, i sur. Myeloid-Specific Gene Deletion of Protein Phosphatase 2A Magnifies MyD88- and TRIF-Dependent Inflammation following Endotoxin Challenge. *J Immunol.* 2017;198(1):404-16.
386. He Z, Du L, Ke Y, Wen C, Zhang Y. PP2A $\alpha$  of Alveolar Macrophages Is a Novel Protective Factor for LPS-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *Inflammation.* 2019;42(3):1004-14.
387. Long L, Deng Y, Yao F, Guan D, Feng Y, Jiang H, i sur. Recruitment of phosphatase PP2A by RACK1 adaptor protein deactivates transcription factor IRF3 and limits type I interferon signaling. *Immunity.* 2014;40(4):515-29.
388. Xie L, Liu C, Wang L, Gunawardena HP, Yu Y, Du R, i sur. Protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha plays a MyD88-dependent, central role in the gene-specific regulation of endotoxin tolerance. *Cell Rep.* 2013;3(3):678-88.
389. Yoza BK, Wells JD, McCall CE. Interleukin-1 $\beta$  expression after inhibition of protein phosphatases in endotoxin-tolerant cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5(3):281-7.
390. Cornell TT, Hinkovska-Galcheva V, Sun L, Cai Q, Hershenson MB, Vanway S, i sur. Ceramide-dependent PP2A regulation of TNF $\alpha$ -induced IL-8 production in respiratory epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;296(5):L849-56.
391. McHugh WM, Russell WW, Fleszar AJ, Rodenhouse PE, Rietberg SP, Sun L, i sur. Protein phosphatase 2A activation attenuates inflammation in murine models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016;311(5):L903-112.
392. Nair PM, Starkey MR, Haw TJ, Liu G, Horvat JC, Morris JC, i sur. Targeting PP2A and proteasome activity ameliorates features of allergic airway disease in mice. *Allergy.* 2017;72(12):1891-903.
393. Katsiari CG, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC. Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 2005;115(11):3193-204.
394. Tan W, Sunahori K, Zhao J, Deng Y, Kaufman KM, Kelly JA, i sur. Association of PPP2CA polymorphisms with systemic lupus erythematosus susceptibility in multiple ethnic groups. *Arthritis Rheum.* 2011;63(9):2755-63.
395. Xu Q, Jin X, Zheng M, Rohila D, Fu G, Wen Z, i sur. Phosphatase PP2A is essential for TH17 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(3):982-7.

396. White MA, Ikeda A, Payseur BA. A pronounced evolutionary shift of the pseudoautosomal region boundary in house mice. *Mamm Genome*. 2012;23(7-8):454-66.
397. Raudsepp T, Chowdhary BP. The Eutherian Pseudoautosomal Region. *Cytogenet Genome Res*. 2015;147(2-3):81-94.
398. Armoskus C, Mota T, Moreira D, Tsai HW. Effects of Prenatal Testosterone Exposure on Sexually Dimorphic Gene Expression in the Neonatal Mouse Cortex and Hippocampus. *J Steroids Horm Sci*. 2014;5(3):1000139.
399. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol*. 2012;3:79.
400. Hettich MM, Matthes F, Ryan DP, Griesche N, Schroder S, Dorn S, i sur. The anti-diabetic drug metformin reduces BACE1 protein level by interfering with the MID1 complex. *PLoS One*. 2014;9(7):e102420.
401. Demir U, Koehler A, Schneider R, Schweiger S, Klocker H. Metformin anti-tumor effect via disruption of the MID1 translational regulator complex and AR downregulation in prostate cancer cells. *BMC Cancer*. 2014;14:52.
402. Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, Rutschow D, Zeller R, Sharkey J, i sur. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21830-5.
403. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577-85.
404. Kawashima I, Kirito K. Metformin inhibits JAK2V617F activity in MPN cells by activating AMPK and PP2A complexes containing the B56alpha subunit. *Exp Hematol*. 2016;44(12):1156-65.e4.
405. Zhang L, Lu L, Zhong X, Yue Y, Hong Y, Li Y, i sur. Metformin reduced NLRP3 inflammasome activity in Ox-LDL stimulated macrophages through adenosine monophosphate activated protein kinase and protein phosphatase 2A. *Eur J Pharmacol*. 2019;852:99-106.
406. Ursini F, Russo E, Pellino G, D'Angelo S, Chiaravalloti A, De Sarro G, i sur. Metformin and Autoimmunity: A "New Deal" of an Old Drug. *Front Immunol*. 2018;9:1236.
407. Monteiro O, Chen C, Bingham R, Argyrou A, Buxton R, Pancevac Jonsson C, i sur. Pharmacological disruption of the MID1/alpha4 interaction reduces mutant Huntingtin levels in primary neuronal cultures. *Neurosci Lett*. 2018;673:44-50.

408. Gao S, Dagnaes-Hansen F, Nielsen EJ, Wengel J, Besenbacher F, Howard KA, *i sur.* The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice. *Mol Ther.* 2009;17(7):1225-33.
409. Kramer PR, Puri J, Bellinger LL. Knockdown of Fcγ receptor III in an arthritic temporomandibular joint reduces the nociceptive response in rats. *Arthritis Rheum.* 2010;62(10):3109-18.
410. Raof NA, Rajamani D, Chu HC, Gurav A, Johnson JM, LoGerfo FW, *i sur.* The effects of transfection reagent polyethyleneimine (PEI) and non-targeting control siRNAs on global gene expression in human aortic smooth muscle cells. *BMC Genomics.* 2016;17:20.
411. Larson SD, Jackson LN, Chen LA, Rychahou PG, Evers BM. Effectiveness of siRNA uptake in target tissues by various delivery methods. *Surgery.* 2007;142(2):262-9.
412. Ross EA, Naylor AJ, O'Neil JD, Crowley T, Ridley ML, Crowe J, *i sur.* Treatment of inflammatory arthritis via targeting of tristetraptolin, a master regulator of pro-inflammatory gene expression. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(3):612-9.
413. Park HJ, Gholam Zadeh M, Suh JH, Choi HS. Dauricine Protects from LPS-Induced Bone Loss via the ROS/PP2A/NF-κB Axis in Osteoclasts. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(7).
414. Kim EK, Lee SH, Lee SY, Kim JK, Jhun JY, Na HS, *i sur.* Metformin ameliorates experimental-obesity-associated autoimmune arthritis by inducing FGF21 expression and brown adipocyte differentiation. *Exp Mol Med.* 2018;50(1):e432.
415. Son HJ, Lee J, Lee SY, Kim EK, Park MJ, Kim KW, *i sur.* Metformin attenuates experimental autoimmune arthritis through reciprocal regulation of Th17/Treg balance and osteoclastogenesis. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:973986.
416. Kang KY, Kim YK, Yi H, Kim J, Jung HR, Kim IJ, *i sur.* Metformin downregulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *Int Immunopharmacol.* 2013;16(1):85-92.
417. Nath N, Khan M, Paintlia MK, Singh I, Hoda MN, Giri S. Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009;182(12):8005-14.
418. Sun Y, Tian T, Gao J, Liu X, Hou H, Cao R, *i sur.* Metformin ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating T helper 17 and regulatory T cells in mice. *J Neuroimmunol.* 2016;292:58-67.
419. Negrotto L, Farez MF, Correale J. Immunologic Effects of Metformin and Pioglitazone Treatment on Metabolic Syndrome and Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2016;73(5):520-8.

420. Wang H, Li T, Chen S, Gu Y, Ye S. Neutrophil Extracellular Trap Mitochondrial DNA and Its Autoantibody in Systemic Lupus Erythematosus and a Proof-of-Concept Trial of Metformin. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(12):3190-200.
421. Zhao Y, Sun M. Metformin rescues Parkin protein expression and mitophagy in high glucose-challenged human renal epithelial cells by inhibiting NF- $\kappa$ B via PP2A activation. *Life Sci.* 2020;246:117382.

## 11. Životopis

Nina Lukač rođena je 14. 9. 1991. godine u Ljubljani, gdje je završila osnovnu i srednju školu. 2010. godine upisala je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (Program „Medical Studies in English“) te diplomirala 2016. godine, s prosječkom ocjena 4,77. Iste godine upisala je doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ te je zaposlena kao doktorand na projektu Hrvatske zaklade za znanost “Molekularni posrednici koštane resorpcije uvjetovane receptorom Fas u artritisu“, voditeljice prof. dr. sc. Nataše Kovačić. Istraživački rad provodi na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, u Laboratoriju za molekularnu imunologiju, i na Zavodu za anatomiju sudjeluje u nastavi anatomije na hrvatskom i engleskom jeziku. Tijekom rada na projektu redovito je izlagala rezultate na domaćim te stranim znanstvenim skupovima, te je prvi je autor na dva i koautor na tri međunarodno indeksirana znanstvena rada. 2017. godine posjetila je suradni laboratorij dr. Nives Zimmermann u Cincinnati Childrens Hospital u SAD, gdje je provedena praktična izobrazba u različitim istraživačkim postupcima s naglasom na bioinformatičku analizu. Od 2006. do 2013. godine primala je Zoisovu stipendiju Republike Slovenije za talentirane učenike i studente te od 2013. do 2016. godine, stipendiju Republike Slovenije za studij u inozemstvu. 2018. godine dobitnica je Akademske mobilnosti Sveučilišta u Zagrebu i potpore European Federation of Immunological Societies za boravak na međunarodnom skupu.

### Popis publikacija autorice:

1. **Lukač N**, Katavić V, Novak S, Šućur A, Filipović M, Kalajzić I, Grčević D, Kovačić N, What do we know about bone morphogenetic proteins and osteochondroprogenitors in inflammatory conditions? *Bone*. 2020 May 1 doi: 10.1016/j.bone.2020.115403. [Epub ahead of print]
2. Šućur A, Filipović M, Flegar D, Kelava T, Šisl D, **Lukač N**, Kovačić N, Grčević D. Notch receptors and ligands in inflammatory arthritis - a systematic review. *Immunol Lett*. 2020 Apr 20. doi: 10.1016/j.imlet.2020.04.010. [Epub ahead of print]
3. Markotic A, Flegar D, Grčević D, Sucur A, Lalic H, Turcic P, Kovacic N, **Lukac N**, Pravdic D, Vukojevic H, Cavar I. LPS-induced inflammation desensitizes hepatocytes to Fas-induced apoptosis through Stat3 activation, the effect can be reversed by ruxolitinib. *J Cell Mol Med*. 2020;24(5):2981-2992.
4. Sucur A, Jajic Z, Ikić Matijasević M, Stipić Marković A, Flegar D, **Lukac N**, Kelava T, Kovacic N, Grčević D. Combined manual and automated immunophenotypisation identified disease-specific immune subpopulations in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2019 Nov 20. [Epub ahead of print]
5. Lazić Mosler E\*, **Lukač N\***, Flegar D, Fadljević M, Radanović I, Cvija H, Kelava T, Ivčević S, Šućur A, Markotić A, Katavić V, Marušić A, Grčević D, Kovačić N. Fas receptor induces apoptosis of synovial bone and cartilage progenitor populations and promotes bone loss in antigen-induced arthritis. *FASEB J*. 2019;33(3):3330-3342. (\*jednak doprinos)



## DODATAK

**Tablica 4. Različito izraženi geni sinovijalnih mijeloidnih stanica miševa divljeg tipa (WT) u odnosu na miševe s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ) nakon uklanjanja uzoraka koji se prema hijerarhijskom grupiranju svrstaju u krivu skupinu.**

Simbol	Ime gena	Omjer promjene (log <sub>2</sub> FC)	p(BH)
<i>Thbs1</i>	thrombospondin 1	<b>-1,94</b>	0,0018
<i>Mir1949</i>	microRNA 1949	<b>-1,75</b>	0,0005
<i>Mir669k</i>	microRNA 669k	<b>-1,14</b>	0,0246
<i>Tas2r143</i>	taste receptor, type 2, member 143	<b>-1,06</b>	0,0153
<i>Ciart</i>	circadian associated repressor of transcription	<b>-0,97</b>	0,0115
<i>4930515G01Rik</i>	RIKEN cDNA 4930515G01 gene	<b>-0,92</b>	0,0490
<i>H2-Q5</i>	histocompatibility 2, Q region locus 5	<b>-0,91</b>	0,0493
<i>Ninj1</i>	ninjurin 1	<b>-0,88</b>	0,0153
<i>Mir5108</i>	microRNA 5108	<b>-0,88</b>	0,0365
<i>Gm5129</i>	predicted gene 5129	<b>-0,87</b>	0,0429
<i>Gm13073</i>	predicted gene 13073	<b>-0,86</b>	0,0242
<i>Selenon</i>	selenoprotein N	<b>-0,86</b>	0,0472
<i>Osgin1</i>	oxidative stress induced growth inhibitor 1	<b>-0,82</b>	0,0478
<i>D730003I15Rik</i>	RIKEN cDNA D730003I15 gene	<b>-0,79</b>	0,0365
<i>4732416N19Rik</i>	RIKEN cDNA 4732416N19 gene	<b>-0,78</b>	0,0318
<i>Mir188</i>	microRNA 188	<b>-0,78</b>	0,0480
<i>H2-K2</i>	histocompatibility 2, K region locus 2	<b>-0,76</b>	0,0487
<i>Slc2a6</i>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6	<b>-0,74</b>	0,0318
<i>Gm5617</i>	predicted gene 5617	<b>-0,65</b>	0,0487
<i>Anapc1</i>	anaphase promoting complex subunit 1	<b>0,61</b>	0,0478
<i>Diaph3</i>	diaphanous related formin 3	<b>0,64</b>	0,0478
<i>Abcd3</i>	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	<b>0,69</b>	0,0359
<i>Fabp7</i>	fatty acid binding protein 7, brain	<b>0,69</b>	0,0487
<i>Suz12</i>	SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit	<b>0,70</b>	0,0480
<i>Tm9sf3</i>	transmembrane 9 superfamily member 3	<b>0,71</b>	0,0390
<i>Cas1</i>	CAS1 domain containing 1	<b>0,71</b>	0,0318
<i>Sgo1</i>	shugoshin 1	<b>0,71</b>	0,0487
<i>Rrm1</i>	ribonucleotide reductase M1	<b>0,71</b>	0,0495
<i>Fam172a</i>	family with sequence similarity 172, member A	<b>0,71</b>	0,0472
<i>Dld</i>	dihydrolipoamide dehydrogenase	<b>0,71</b>	0,0490
<i>Xk</i>	X-linked Kx blood group	<b>0,73</b>	0,0478
<i>Rcn1</i>	reticulocalbin 1	<b>0,75</b>	0,0472

<i>Tbk1</i>	TANK-binding kinase 1	<b>0,75</b>	0,0365
<i>Abhd13</i>	abhydrolase domain containing 13	<b>0,76</b>	0,0480
<i>Cep76</i>	centrosomal protein 76	<b>0,79</b>	0,0490
<i>Cdc25a</i>	cell division cycle 25A	<b>0,79</b>	0,0365
<i>Cmah</i>	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase	<b>0,80</b>	0,0229
<i>Mfap1a</i>	microfibrillar-associated protein 1A	<b>0,81</b>	0,0359
<i>Ipo7</i>	importin 7	<b>0,85</b>	0,0490
<i>Naprt</i>	nicotinate phosphoribosyltransferase	<b>0,85</b>	0,0153
<i>Sgpp1</i>	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	<b>0,86</b>	0,0242
<i>Phf6</i>	PHD finger protein 6	<b>0,88</b>	0,0389
<i>Ube2v2</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	<b>0,96</b>	0,0318
<i>Kif11</i>	kinesin family member 11	<b>1,00</b>	0,0153
<i>Prpf4b</i>	pre-mRNA processing factor 4B	<b>1,01</b>	0,0478
<i>Fas</i>	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	<b>1,02</b>	0,0153
<i>Ndc80</i>	NDC80 kinetochore complex component	<b>1,03</b>	0,0365
<i>Neto2</i>	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	<b>1,04</b>	0,0457
<i>Cd38</i>	CD38 antigen	<b>1,04</b>	0,0153
<i>Kif20b</i>	kinesin family member 20B	<b>1,07</b>	0,0229
<i>Gm36490</i>	predicted gene, 36490	<b>1,16</b>	0,0330
<i>Mir103-2</i>	microRNA 103-2	<b>1,65</b>	0,0008
<i>Lipg</i>	lipase, endothelial	<b>1,71</b>	0,0000
<i>Mid1</i>	midline 1	<b>2,72</b>	0,0000
<i>Erdr1</i>	erythroid differentiation regulator 1	<b>3,02</b>	0,0000

Miševi divljeg tipa (WT) i miševi s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ) su žrtvovani na 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog goveđeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili otopine fosfatnog pufera (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) (CTRL). Nakon opuštanja stanica sinovijalnog odjeljka pomoću kolagenaze tipa IV pomoću razvrstavanja stanica aktiviranog fluorescencijom (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*) izdvojena je populacija živih (DAPI-) neeritroidnih (TER119 $-$ ), nelimfoidnih (CD3B220NK1.1 $-$ ) stanica, koje izražavaju biljege CD11b i Gr-1 (CD11b $^{+}$  Gr-1 $^{low/+}$ ). Iz izdvojene mijeloidne populacije potom je izolirana ukupna stanična RNA, a po 4 pojedinačna uzorka zadovoljavajuće kvalitete iz svake pokuse skupine su fragmentirana, obilježena i hibridizirana na genske čipove GeneChip™ Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix). Nakon procijene kvalitete očitanih podataka je unutar sučelja Bioconductor u programu R provedena bioinformatička analiza rezultata genskih čipova. Kako bih se odredile razlike između reprezentativnih uzoraka sinovijalnih stanica miševa WT i Fas  $-/-$ , su iz analize uklonjeni uzorci koji su se prema hijerarhijskom grupiranju svrstali u krivu skupinu. Pomoću algoritma *limma* (prema engl. *linear models for microarray data*) je uspoređenih 6 uzoraka miševa WT sa 5 uzoraka miševa Fas  $-/-$ . Prikazani su simbol gena i puni naziv gena prema MGI (prema engl. *Mouse Genome Informatics*), logaritam omjera promjene izražaja gena ( $\log_2FC$ , prema engl. *fold change*) i p vrijednosti prilagođena postupkom Benjamini-Hochberg (p(BH)) gena čija prilagođena p vrijednost je manja od 0,05 te apsolutni omjer promjene veći od 1,5.

**Tablica 5. Pojačano zastupljeni GO termini u genima s pojačanim izražajem u sinovijalnih mijeloidnih stanica miševa divljeg tipa (WT) ili miševa s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ), nakon uklanjanja uzoraka koji se prema hijerarhijskom grupiranju svrstaju u krivu skupinu.**

ID GO termina	Opis GO termina	Skupina GO termina	Broj gena	p (BH)
<b>pojačan izražaj u B6</b>				
GO:0007059	chromosome segregation	BP	19/170	3,45E-09
GO:0000819	sister chromatid segregation	BP	15/170	4,84E-09
GO:0098813	nuclear chromosome segregation	BP	17/170	4,84E-09
GO:0140014	mitotic nuclear division	BP	17/170	9,52E-09
GO:0000280	nuclear division	BP	20/170	1,42E-08
GO:0000070	mitotic sister chromatid segregation	BP	13/170	2,46E-08
GO:0048285	organelle fission	BP	20/170	6,74E-08
GO:0070507	regulation of microtubule cytoskeleton organization	BP	13/170	5,32E-07
GO:0032886	regulation of microtubule-based process	BP	13/170	3,32E-06
GO:0090068	positive regulation of cell cycle process	BP	13/170	5,76E-06
GO:0007346	regulation of mitotic cell cycle	BP	17/170	3,17E-05
GO:0045787	positive regulation of cell cycle	BP	14/170	6,66E-05
GO:0044772	mitotic cell cycle phase transition	BP	13/170	0,00026129
GO:0008608	attachment of spindle microtubules to kinetochore	BP	5/170	0,00036508
GO:0046605	regulation of centrosome cycle	BP	6/170	0,00058177
GO:0044770	cell cycle phase transition	BP	13/170	0,00064901
GO:0007088	regulation of mitotic nuclear division	BP	9/170	0,00073351
GO:0031023	microtubule organizing center organization	BP	8/170	0,00073351
GO:0033047	regulation of mitotic sister chromatid segregation	BP	6/170	0,00127292
GO:0051383	kinetochore organization	BP	4/170	0,00128694
GO:0007080	mitotic metaphase plate congression	BP	5/170	0,00129873
GO:1903046	meiotic cell cycle process	BP	9/170	0,00129873
GO:0010824	regulation of centrosome duplication	BP	5/170	0,00139006
GO:0051321	meiotic cell cycle	BP	11/170	0,00154242
GO:1901990	regulation of mitotic cell cycle phase transition	BP	10/170	0,00154242
GO:0033048	negative regulation of mitotic sister chromatid segregation	BP	5/170	0,00154242
GO:0051783	regulation of nuclear division	BP	9/170	0,00177088
GO:0033046	negative regulation of sister chromatid segregation	BP	5/170	0,0017771
GO:0031109	microtubule polymerization or depolymerization	BP	7/170	0,0019183
GO:0007098	centrosome cycle	BP	7/170	0,00195825
GO:0051985	negative regulation of chromosome segregation	BP	5/170	0,00217819
GO:0033045	regulation of sister chromatid segregation	BP	6/170	0,0021871
GO:0140013	meiotic nuclear division	BP	8/170	0,00280581

GO:1901987	regulation of cell cycle phase transition	BP	10/170	0,00299373
GO:0045839	negative regulation of mitotic nuclear division	BP	5/170	0,00307558
GO:0007091	metaphase/anaphase transition of mitotic cell cycle	BP	5/170	0,0034607
GO:0051310	metaphase plate congression	BP	5/170	0,0034607
GO:0010965	regulation of mitotic sister chromatid separation	BP	5/170	0,00362305
GO:0051304	chromosome separation	BP	6/170	0,00362305
GO:0045132	meiotic chromosome segregation	BP	6/170	0,003748
GO:0044784	metaphase/anaphase transition of cell cycle	BP	5/170	0,00394787
GO:0006260	DNA replication	BP	9/170	0,00394787
GO:0046607	positive regulation of centrosome cycle	BP	3/170	0,00394787
GO:0051306	mitotic sister chromatid separation	BP	5/170	0,00436696
GO:2001251	negative regulation of chromosome organization	BP	7/170	0,00458978
GO:0051315	attachment of mitotic spindle microtubules to kinetochore	BP	3/170	0,00464199
GO:0051298	centrosome duplication	BP	5/170	0,00464199
GO:1905818	regulation of chromosome separation	BP	5/170	0,00464199
GO:1901976	regulation of cell cycle checkpoint	BP	4/170	0,00464199
GO:0051983	regulation of chromosome segregation	BP	6/170	0,00495912
GO:0051784	negative regulation of nuclear division	BP	5/170	0,0050822
GO:0007076	mitotic chromosome condensation	BP	3/170	0,00534351
GO:0010639	negative regulation of organelle organization	BP	11/170	0,00578981
GO:0007094	mitotic spindle assembly checkpoint	BP	4/170	0,00578981
GO:0071173	spindle assembly checkpoint	BP	4/170	0,00578981
GO:0071174	mitotic spindle checkpoint	BP	4/170	0,00694081
GO:0007051	spindle organization	BP	7/170	0,00694081
GO:0045931	positive regulation of mitotic cell cycle	BP	7/170	0,00708589
GO:0051303	establishment of chromosome localization	BP	5/170	0,00782443
GO:0031577	spindle checkpoint	BP	4/170	0,00782443
GO:0045841	negative regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	BP	4/170	0,00782443
GO:0050000	chromosome localization	BP	5/170	0,0081486
GO:2000816	negative regulation of mitotic sister chromatid separation	BP	4/170	0,00832603
GO:1902100	negative regulation of metaphase/anaphase transition of cell cycle	BP	4/170	0,00898531
GO:0060947	cardiac vascular smooth muscle cell differentiation	BP	3/170	0,00937897
GO:1905819	negative regulation of chromosome separation	BP	4/170	0,00953
GO:0000075	cell cycle checkpoint	BP	7/170	0,01009458
GO:0030261	chromosome condensation	BP	4/170	0,01009458
GO:0046599	regulation of centriole replication	BP	3/170	0,0104356
GO:0031110	regulation of microtubule polymerization or depolymerization	BP	5/170	0,0113448
GO:0034502	protein localization to chromosome	BP	5/170	0,0113448
GO:2000114	regulation of establishment of cell polarity	BP	3/170	0,01170254

GO:0006281	DNA repair	BP	11/170	0,01238603
GO:1901889	negative regulation of cell junction assembly	BP	3/170	0,0130627
GO:0030010	establishment of cell polarity	BP	6/170	0,0130627
GO:0007019	microtubule depolymerization	BP	4/170	0,01462415
GO:0071459	protein localization to chromosome, centromeric region	BP	3/170	0,01462415
GO:0030071	regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	BP	4/170	0,01652768
GO:0007062	sister chromatid cohesion	BP	4/170	0,01879184
GO:1902099	regulation of metaphase/anaphase transition of cell cycle	BP	4/170	0,01987141
GO:0032878	regulation of establishment or maintenance of cell polarity	BP	3/170	0,02043093
GO:0007163	establishment or maintenance of cell polarity	BP	7/170	0,02182283
GO:0007052	mitotic spindle organization	BP	5/170	0,02800386
GO:0018107	peptidyl-threonine phosphorylation	BP	5/170	0,03536728
GO:0070192	chromosome organization involved in meiotic cell cycle	BP	4/170	0,04068933
GO:0045786	negative regulation of cell cycle	BP	10/170	0,04068933
GO:0045930	negative regulation of mitotic cell cycle	BP	7/170	0,04068933
GO:0007026	negative regulation of microtubule depolymerization	BP	3/170	0,04273841
GO:0018210	peptidyl-threonine modification	BP	5/170	0,0436239
GO:0006470	protein dephosphorylation	BP	7/170	0,04436082
GO:0051145	smooth muscle cell differentiation	BP	4/170	0,04702129
GO:0007099	centriole replication	BP	3/170	0,04734715
GO:0007143	female meiotic nuclear division	BP	3/170	0,04734715
GO:0031114	regulation of microtubule depolymerization	BP	3/170	0,04734715
GO:0008625	extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	BP	4/170	0,04734715
GO:0035886	vascular smooth muscle cell differentiation	BP	3/170	0,04950072
GO:0098534	centriole assembly	BP	3/170	0,04950072
GO:0000012	single strand break repair	BP	2/170	0,04950072
GO:0000775	chromosome, centromeric region	CC	19/171	4,84E-14
GO:0000776	kinetochore	CC	15/171	5,76E-12
GO:0005819	spindle	CC	19/171	7,33E-12
GO:0098687	chromosomal region	CC	19/171	4,08E-11
GO:0000779	condensed chromosome, centromeric region	CC	10/171	1,25E-10
GO:0000793	condensed chromosome	CC	14/171	2,14E-08
GO:0005874	microtubule	CC	18/171	7,27E-08
GO:0000777	condensed chromosome kinetochore	CC	7/171	1,31E-07
GO:0000940	condensed chromosome outer kinetochore	CC	5/171	1,21E-06
GO:0072686	mitotic spindle	CC	8/171	2,11E-05
GO:0000780	condensed nuclear chromosome, centromeric region	CC	5/171	4,13E-05
GO:0005876	spindle microtubule	CC	6/171	4,13E-05
GO:0005871	kinesin complex	CC	6/171	7,37E-05
GO:0000778	condensed nuclear chromosome	CC	4/171	7,37E-05

	kinetochore			
GO:0000922	spindle pole	CC	7/171	0,0006005
GO:0005635	nuclear envelope	CC	12/171	0,00076219
GO:0031080	nuclear pore outer ring	CC	3/171	0,00076219
GO:0051233	spindle midzone	CC	4/171	0,00174684
GO:0005643	nuclear pore	CC	5/171	0,00192332
GO:1990023	mitotic spindle midzone	CC	3/171	0,00192332
GO:0030496	midbody	CC	6/171	0,00696107
GO:1904949	ATPase complex	CC	5/171	0,0084776
GO:0005875	microtubule associated complex	CC	6/171	0,00859157
GO:0090734	site of DNA damage	CC	4/171	0,00979398
GO:0000794	condensed nuclear chromosome	CC	6/171	0,01159954
GO:0097431	mitotic spindle pole	CC	3/171	0,01346818
GO:0005814	centriole	CC	5/171	0,01346818
GO:0005881	cytoplasmic microtubule	CC	4/171	0,02113268
GO:0070603	SWI/SNF superfamily-type complex	CC	4/171	0,0236477
GO:0000803	sex chromosome	CC	3/171	0,02815913
GO:0070938	contractile ring	CC	2/171	0,03707335
GO:0005720	nuclear heterochromatin	CC	3/171	0,03725146
GO:0000792	heterochromatin	CC	4/171	0,04103857
GO:0009295	nucleoid	CC	3/171	0,04103857
GO:0042645	mitochondrial nucleoid	CC	3/171	0,04103857
GO:0010369	chromocenter	CC	2/171	0,04743708
GO:0044450	microtubule organizing center part	CC	5/171	0,04743708
GO:0008017	microtubule binding	MF	14/166	4,29E-07
GO:0015631	tubulin binding	MF	16/166	4,29E-07
GO:0016887	ATPase activity	MF	13/166	0,00179491
GO:0003777	microtubule motor activity	MF	6/166	0,00261253
GO:0008574	ATP-dependent microtubule motor activity, plus-end-directed	MF	4/166	0,00261253
GO:0042393	histone binding	MF	9/166	0,00261253
GO:0003774	motor activity	MF	7/166	0,00261253
GO:0003697	single-stranded DNA binding	MF	6/166	0,0049527
GO:1990939	ATP-dependent microtubule motor activity	MF	4/166	0,01528868
GO:0042623	ATPase activity, coupled	MF	9/166	0,03280833

**pojačan izražaj u Fas -/-**

GO:0060326	cell chemotaxis	BP	9/62	0,00012809
	negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process			
GO:0043154	negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity	BP	4/62	0,02905364
GO:2000117	skeletal muscle cell differentiation	BP	4/62	0,02905364
GO:0035914	negative regulation of endopeptidase activity	BP	4/62	0,02905364
GO:0010951	protein kinase B signaling	BP	5/62	0,02905364
GO:0043491	regulation of p38MAPK cascade	BP	3/62	0,02905364

GO:0006953	acute-phase response	BP	3/62	0,02905364
	regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	BP	5/62	0,02905364
GO:0043281	activity involved in apoptotic process	BP	5/62	0,02905364
GO:0014074	response to purine-containing compound	BP	4/62	0,02905364
GO:0052548	regulation of endopeptidase activity	BP	6/62	0,02905364
GO:0038066	p38MAPK cascade	BP	3/62	0,02905364
GO:0002526	acute inflammatory response	BP	4/62	0,02905364
	regulation of cysteine-type endopeptidase activity	BP	5/62	0,02905364
GO:2000116	activity	BP	5/62	0,02905364
GO:0031620	regulation of fever generation	BP	2/62	0,02905364
	positive regulation of T-helper 17 type immune response	BP	2/62	0,02905364
GO:2000318	immune response	BP	2/62	0,02905364
GO:0071621	granulocyte chemotaxis	BP	4/62	0,02905364
	cell migration involved in sprouting angiogenesis	BP	3/62	0,03586
GO:0002042	angiogenesis	BP	3/62	0,03586
GO:0010466	negative regulation of peptidase activity	BP	5/62	0,03600854
GO:0001660	fever generation	BP	2/62	0,03600854
GO:0031652	positive regulation of heat generation	BP	2/62	0,03600854
	positive regulation of epithelial cell migration	BP	4/62	0,03600854
GO:0010634	migration	BP	4/62	0,03600854
GO:0050715	positive regulation of cytokine secretion	BP	4/62	0,03600854
GO:0002673	regulation of acute inflammatory response	BP	3/62	0,03680096
GO:0097530	granulocyte migration	BP	4/62	0,03680096
GO:0031638	zymogen activation	BP	3/62	0,0385736
GO:0052547	regulation of peptidase activity	BP	6/62	0,0385736
GO:0031650	regulation of heat generation	BP	2/62	0,0385736
GO:0006094	gluconeogenesis	BP	3/62	0,03902353
GO:0010631	epithelial cell migration	BP	5/62	0,03902353
GO:0090132	epithelium migration	BP	5/62	0,03902353
GO:0051222	positive regulation of protein transport	BP	6/62	0,03902353
GO:0046697	decidualization	BP	2/62	0,03902353
	positive regulation of transforming growth factor beta production	BP	2/62	0,03902353
GO:0071636	factor beta production	BP	2/62	0,03902353
GO:0090130	tissue migration	BP	5/62	0,03902353
GO:0001819	positive regulation of cytokine production	BP	6/62	0,03902353
GO:0019319	hexose biosynthetic process	BP	3/62	0,03914276
	positive regulation of T cell cytokine production	BP	2/62	0,03914276
GO:0002726	production	BP	2/62	0,03914276
	positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	BP	2/62	0,03914276
GO:1902043	receptors	BP	2/62	0,03914276
	regulation of T-helper 17 cell differentiation	BP	2/62	0,03914276
GO:2000319	differentiation	BP	2/62	0,03914276
GO:0043409	negative regulation of MAPK cascade	BP	4/62	0,04045134
	positive regulation of establishment of protein localization	BP	6/62	0,04045134
GO:1904951	protein localization	BP	6/62	0,04045134
GO:0045786	negative regulation of cell cycle	BP	6/62	0,04072588
GO:0071674	mononuclear cell migration	BP	3/62	0,04072588
GO:0046364	monosaccharide biosynthetic process	BP	3/62	0,04131447
GO:0060537	muscle tissue development	BP	6/62	0,04581122

GO:0031649	heat generation	BP	2/62	0,04592556
GO:0035743	CD4-positive, alpha-beta T cell cytokine production	BP	2/62	0,04592556
GO:0043153	entrainment of circadian clock by photoperiod	BP	2/62	0,04592556
GO:0045624	positive regulation of T-helper cell differentiation	BP	2/62	0,04592556
GO:2000316	regulation of T-helper 17 type immune response	BP	2/62	0,04592556
GO:0050727	regulation of inflammatory response	BP	5/62	0,04592556
GO:0060968	regulation of gene silencing	BP	3/62	0,0463117
GO:0009648	photoperiodism	BP	2/62	0,04753
GO:0043542	endothelial cell migration	BP	4/62	0,04753
GO:0050707	regulation of cytokine secretion	BP	4/62	0,04753
GO:0010575	positive regulation of vascular endothelial growth factor production	BP	2/62	0,04753
GO:0048266	behavioral response to pain	BP	2/62	0,04753
GO:0007519	skeletal muscle tissue development	BP	4/62	0,04753
GO:0097529	myeloid leukocyte migration	BP	4/62	0,04753
GO:0009649	entrainment of circadian clock	BP	2/62	0,04753
GO:0045582	positive regulation of T cell differentiation	BP	3/62	0,04753
GO:0010595	positive regulation of endothelial cell migration	BP	3/62	0,04753
GO:0046683	response to organophosphorus	BP	3/62	0,04753
GO:0033555	multicellular organismal response to stress	BP	3/62	0,04753
GO:2000178	negative regulation of neural precursor cell proliferation	BP	2/62	0,04753
GO:0060538	skeletal muscle organ development	BP	4/62	0,04753
GO:0045861	negative regulation of proteolysis	BP	5/62	0,04753
GO:0042060	wound healing	BP	5/62	0,04753
GO:0002724	regulation of T cell cytokine production	BP	2/62	0,04753
GO:0032891	negative regulation of organic acid transport	BP	2/62	0,04753
GO:1900745	positive regulation of p38MAPK cascade	BP	2/62	0,04753
GO:0006334	nucleosome assembly	BP	3/62	0,04753
GO:0030595	leukocyte chemotaxis	BP	4/62	0,04753
GO:0030593	neutrophil chemotaxis	BP	3/62	0,04753
GO:0051897	positive regulation of protein kinase B signaling	BP	3/62	0,04753
GO:0001893	maternal placenta development	BP	2/62	0,04753
GO:0030511	positive regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	BP	2/62	0,04753
GO:0072539	T-helper 17 cell differentiation	BP	2/62	0,04753
GO:1903846	positive regulation of cellular response to transforming growth factor beta stimulus	BP	2/62	0,04753
GO:0042136	neurotransmitter biosynthetic process	BP	3/62	0,04771528
GO:2000191	regulation of fatty acid transport	BP	2/62	0,04898485
GO:0034248	regulation of cellular amide metabolic process	BP	5/62	0,04898485
GO:0048661	positive regulation of smooth muscle cell proliferation	BP	3/62	0,04898485



GO:2000379	positive regulation of reactive oxygen species metabolic process	BP	3/62	0,04898485
GO:0010632	regulation of epithelial cell migration	BP	4/62	0,04898485
GO:0035767	endothelial cell chemotaxis	BP	2/62	0,04898485
GO:0043372	positive regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation	BP	2/62	0,04898485
GO:0050663	cytokine secretion	BP	4/62	0,04898485
GO:0045621	positive regulation of lymphocyte differentiation	BP	3/62	0,04898485
GO:0006335	DNA replication-dependent nucleosome assembly	BP	2/62	0,04898485
GO:0010574	regulation of vascular endothelial growth factor production	BP	2/62	0,04898485
GO:0033081	regulation of T cell differentiation in thymus	BP	2/62	0,04898485
GO:0034723	DNA replication-dependent nucleosome organization	BP	2/62	0,04898485
GO:0072538	T-helper 17 type immune response	BP	2/62	0,04898485
GO:0016811	hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds, in linear amides	MF	4/58	0,00770615
GO:0048020	CCR chemokine receptor binding	MF	3/58	0,00950594
GO:0048018	receptor ligand activity	MF	7/58	0,00950594
GO:0016810	hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds	MF	4/58	0,01257286
GO:0042379	chemokine receptor binding	MF	3/58	0,01644878
GO:0005126	cytokine receptor binding	MF	5/58	0,02917048

Miševi divljeg tipa (WT) i miševi s izbačenim genom za receptor Fas (Fas  $-/-$ ) su žrtvovani na 10. dan nakon intra-artikularne injekcije metiliranog govedeg serumskog albumina (mBSA, prema engl. *methylated bovine serum albumin*) (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*) ili otopine fosfatnog pufera (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) (CTRL). Nakon opuštanja stanica sinovijalnog odjeljka pomoću kolagenaze tipa IV pomoću razvrstavanja stanica aktiviranog fluorescencijom (FACS, prema engl. *fluorescence-activated cell sorting*) izdvojena je populacija živih (DAPI $-$ ) neeritroidnih (TER119 $-$ ), nelimfoidnih (CD3B220NK1.1 $-$ ) stanica, koje izražavaju biljege CD11b i Gr-1 (CD11b $^{+}$  Gr-1 $^{low/+}$ ). Iz izdvojene mijeloidne populacije potom je izolirana ukupna stanična RNA, a po 4 pojedinačna uzorka zadovoljavajuće kvalitete iz svake pokuse skupine su fragmentirana, obilježena i hibridizirana na genske čipove GeneChip<sup>TM</sup> Mouse Gene 2.0 ST Array (Affymetrix). Nakon procijene kvalitete očitanih podataka je unutar sučelja Bioconductor u programu R provedena bioinformatička analiza rezultata genskih čipova. Kako bih se odredile razlike između reprezentativnih uzoraka sinovijalnih stanica miševa WT i Fas  $-/-$ , su iz analize uklonjeni uzorci koji su se prema hijerarhijskom grupiranju svrstali u krivu skupinu. Pomoću algoritma *limma* (prema engl. *linear models for microarray data*) je uspoređenih 6 uzoraka miševa WT sa 5 uzoraka miševa Fas  $-/-$ . Određeni su različito izraženi geni čija je nominalna p vrijednost manja od 0,05 i prilagođena p vrijednost manja od 0,1, te apsolutni omjer promjene veći od 1,5. Pomoću hipergeometričke raspodjele analizirano je koje biološke funkcije (BP, prema engl. *biological process*), stanične komponente (CC, prema engl. *cellular component*) ili molekularni procesi (MP, prema engl. *molecular process*) pojačano zastupljeni u među različito izraženim genima. Prikazana je oznaka (ID) te službeni naziv prezastupljenih GO termina, njihova skupina, omjer broja gena koji su različito izraženi i pripadaju određenom terminu GO te svih gena u određenom GO terminu i p vrijednosti prilagođena postupkom Benjamini-Hochberg (p(BH)). Prikazani su termini GO čija je prilagođena p vrijednost manja od 0,05 (Benjamini Hochberg).