

# Signalni put Notch osteoklastnih progenitora u mišjem modelu reumatoidnoga artritisa

---

Filipović, Maša

Doctoral thesis / Disertacija

2023

*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:105:162886>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-09**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Maša Filipović**

**Signalni put Notch osteoklastnih  
progenitora u mišjem modelu  
reumatoidnoga artritisa**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Maša Filipović**

**Signalni put Notch osteoklastnih  
progenitora u mišjem modelu  
reumatoidnoga artritisa**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2023.**

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

Pokusi u sklopu ovog istraživanja omogućeni su sredstvima projekta Hrvatske zaklade za znanost (voditeljica prof. dr. sc. Danka Grčević).

Voditelj rada: prof.dr.sc. Danka Grčević

Rad sadrži 51 sliku i 2 tablice.

#### ZAHVALA:

Prije svega zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Danki Grčević na poučavanju, neizmjernoj pomoći i strpljenju tijekom ovih nekoliko godina i pri pisanju ovog rada, ohrabrenju i podršci kada pokusi nisu uspijevali, i dijeljenju svoje ljubavi prema znanosti. Zahvaljujem i svim članovima Laboratorija za molekularnu imunologiju na poučavanju, savjetima, pomoći pri izvođenju pokusa i podršci. Hvala vam što ste učinili svakodnevni rad opuštenim i zabavnim. Zahvaljujem Ketitransovcima uz koje je dolazak na posao u svim vremenskim i prometnim uvjetima bio bezbolan. Hvala ekipi iz kuhinje na jutarnjim sastancima, domjencima i proslavama. Zahvaljujem svojoj obitelji, Ivanu i prijateljima na razumijevanju kada sam ja bila teška, podršci kada je meni bilo teško i ljubavi koja me svakodnevno pokreće i bez koje ne bih bila ono što jesam.

# SADRŽAJ

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. Uvod</b>                                                                                   | 1  |
| 1.1. Reumatoidni artritis                                                                        | 1  |
| 1.2. Gubitak kosti u reumatoidnom artritisu                                                      | 4  |
| 1.3. Osteoklasti                                                                                 | 7  |
| 1.4. Osteoklastni progenitori                                                                    | 9  |
| 1.5. Signalni put Notch                                                                          | 11 |
| 1.5.1. Uloga signalnog puta Notch u razvoju i funkciji stanica                                   | 13 |
| 1.5.2. Uloga signalnog puta Notch u stanicama osteoklastne loze                                  | 16 |
| 1.6. Mišji modeli reumatoidnog artritisa                                                         | 17 |
| 1.7. Transgenični mišji modeli                                                                   | 19 |
| <b>2. Hipoteza</b>                                                                               | 21 |
| <b>3. Ciljevi rada</b>                                                                           | 22 |
| <b>4. Materijali i metode</b>                                                                    | 23 |
| 4.1. Plan istraživanja                                                                           | 23 |
| 4.2. Pokusne životinje                                                                           | 24 |
| 4.3. Uzgoj i križanje transgeničnih životinja                                                    | 26 |
| 4.4. Genotipizacija transgeničnih životinja                                                      | 26 |
| 4.5. Izazivanje artritisa potaknutog kolagenom                                                   | 28 |
| 4.6. Priprema jednostaničnih suspenzija iz uzoraka tkiva                                         | 28 |
| 4.7. Imunoenzimsko određivanje kolagenskog telopeptida u serumu                                  | 30 |
| 4.8. Mikrokomputerizirana tomografija                                                            | 30 |
| 4.9. Histološka i histomorfometrijska analiza                                                    | 31 |
| 4.10. Protočna citometrija i razvrstavanje stanica                                               | 32 |
| 4.11. Stanična kultura osteoklasta i kultivacija na koštanim pločicama                           | 35 |
| 4.12. Stanična kultura osteoblasta                                                               | 36 |
| 4.13. Analiza izražaja gena metodom qPCR                                                         | 36 |
| 4.14. Oblaganje zdenaca ligandima Notch i <i>in vitro</i> primjena neutralizacijskih protutijela | 38 |
| 4.15. <i>In vivo</i> primjena neutralizacijskih protutijela                                      | 39 |
| 4.16. Indukcija rekombinaze Cre                                                                  | 39 |
| 4.17. Statistička analiza                                                                        | 40 |
| <b>5. Rezultati</b>                                                                              | 41 |
| 5.1. Analiza promjena komponenata signalnog puta Notch izazvanih artritism                       | 41 |
| 5.1.1. Osteoklastogene populacije u miša                                                         | 41 |

|            |                                                                                                                                   |     |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.2.     | Izražaj komponenti signalnog puta Notch u mišjim osteoklastnim progenitorima i promjene izazvane artritisom                       | 44  |
| 5.2.       | Inhibicija signalnog puta Notch neutralizacijskim protutijelima <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>                                  | 54  |
| 5.2.1.     | Učinak liganda Notch na diferencijaciju mišjih osteoklasta <i>in vitro</i>                                                        | 54  |
| 5.2.2.     | Aktivacija transkripcijskih ciljeva signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima                                            | 57  |
| 5.2.3.     | Učinak inhibicije signalnog puta Notch na diferencijaciju mišjih osteoklastnih progenitora <i>in vitro</i>                        | 58  |
| 5.2.4.     | Učinak inhibicije signalnog puta Notch na diferencijaciju osteoklastnih progenitora i aktivnost mišjih osteoklasta <i>in vivo</i> | 60  |
| 5.3.       | Utišavanje signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima <i>in vivo</i>                                                      | 66  |
| 5.3.1.     | Optimizacija uzgoja i križanja transgeničnih mišjih sojeva                                                                        | 66  |
| 5.3.2.     | Uvođenje transgeničnih mišjih linija, primjena tamoksifena i praćenje označenih stanica                                           | 69  |
| 5.3.3.     | Učinak genetski utišanog signalnog puta Notch na diferencijaciju osteoklastnih progenitora <i>in vitro</i>                        | 75  |
| 5.3.4.     | Učinak genetski utišanog signalnog puta Notch na diferencijaciju i aktivnost osteoklasta <i>in vivo</i>                           | 79  |
| <b>6.</b>  | <b>Rasprava</b>                                                                                                                   | 89  |
| 6.1.       | Osteoklastni progenitori koji izražavaju receptor CX3CR1 umnoženi su u mišjem modelu artritisa                                    | 89  |
| 6.2.       | Porast udjela osteoklastnih progenitora koji izražavaju receptore signalnog puta Notch u artritisu                                | 90  |
| 6.3.       | Poticanje ligandima signalnog puta Notch inhibira diferencijaciju osteoklasta                                                     | 92  |
| 6.4.       | Inhibicija receptora Notch 1 i Notch 2 neutralizacijskim protutijelima u artritisu potiče diferencijaciju osteoklasta             | 94  |
| 6.5.       | Ciljanjem stanica koje izražavaju receptor CX3CR1 uspješno označavamo osteoklastne progenitore                                    | 95  |
| 6.6.       | Utišavanje signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima pojačava osteoklastogenezu                                          | 97  |
| 6.7.       | Pretpostavljeni model djelovanja modulacije signalnog puta Notch na osteoklastne progenitore u artritisu                          | 99  |
| <b>7.</b>  | <b>Zaključci</b>                                                                                                                  | 100 |
| <b>8.</b>  | <b>Sažetak</b>                                                                                                                    | 102 |
| <b>9.</b>  | <b>Summary</b>                                                                                                                    | 103 |
| <b>10.</b> | <b>Popis literature</b>                                                                                                           | 104 |
| <b>11.</b> | <b>Životopis</b>                                                                                                                  | 115 |

## POPIS KRATICA

$\alpha$ -MEM – minimalni esencijalni medij  $\alpha$ , prema engl.  *$\alpha$ -minimal essential medium*

$\mu$ CT – mikrokompjuterizirana tomografija, prema engl. *micro-computed tomography*

4-OHT – 4-hidroksitamoksifen

ADAM – bjelančevina koja sadrži domenu disintegrina i metaloproteinaze, prema engl. *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein*

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

ACR – Američko reumatološko društvo, prema engl. *American College of Rheumatology*

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

ANR – ankirinski sljedovi, prema engl. *ankirin repeats*

APC – alofikocijanin, prema engl. *allophycocyanine*

BCL6 – limfom stanica B 6, prema engl. *B cell lymphoma 6*

BLIMP-1 – bjelančevina sazrijevanja 1 potaknuta limfocitima B, prema engl. *B-lymphocyte-induced maturation protein-1*

BV/TV – udio mineralizirane (kortikalne i trabekularne) kosti u ukupnom volumenu tkiva, prema engl. *Bone Volume/Total Volume; %*

CAIA – artritis potaknut protutijelima na kolagen, prema engl. *collagen antibody induced arthritis*

CCR – receptor za C-C kemokin

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

CDAI – klinički indeks aktivnosti bolesti prema engl. *clinical disease activity index*

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

CFA – kompletni Freundov adjuvans, prema engl. *complete Freund's adjuvant*

c-Fms – receptor za čimbenik stimulacije kolonija makrofaga, CD115

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

CII - pileći kolagen tip II, prema engl. *chicken collagen type II*

CSF-1R – receptor za M-CSF, prema engl. *colony stimulating factor 1 receptor*

CSL – prema engl. *CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1*

CT – kompjutorizirana tomografija, prema engl. *computed tomography*

Ctsk – katepsin K, prema engl. *cathepsin K*

CTX I – C-terminalni telopeptidi kolagena tipa I, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*

CX3CR – receptor za C-X3-C kemokin

Cy – cijanin, prema engl. *cyanine*

DAB – 3,3'-diaminobenzidin

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindolom, prema engl. *4',6-diaminidino-2-phenylindole*

DAS28 – procjena aktivnosti bolesti za 28 zglobova prema engl. *disease activity score 28*

DC-STAMP – transmembranski protein specifičan za dendritične stanice, prema engl. *dendritic cell-specific transmembrane protein*

DLL – Delta-like

DMARD – antireumatski lijekovi koji modificiraju bolest, prema engl. *disease modifying antirheumatic drugs*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina, prema engl. *deoxyribonucleic acid*

dnMAML – dominantno negativni čimbenik MAML, prema engl. *dominant negative MAML*

DOS – prema engl. *Delta and OSM-11-like proteins*

DSL – N-terminalni Delta/Serrate/LAG2 motiv

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

EGF – epidermalni čimbenik rasta, prema engl. *epidermal growth factor*

ELISA – kolorimetrijski imunoenzimski postupak, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

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

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

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

FcR- $\gamma$  – Fc-receptor- $\gamma$

FITC – fluorescein izotiocijanat, prema engl. *fluorescein isothiocyanate*



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

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

G6PI – glukoza-6-fosfataza izomeraza, prema engl. *glucose-6-phosphatase isomerase*

GMT – Goldner-Masson-trikrom

HD – heterodimerizacijska domena, prema engl. *heterodimerization domain*

HE – hemalaun-eozin

HES – prema engl. *hairy and enhancer of split*

HEY – prema engl. *hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein*

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

HRP – hrenova peroksidaza, prema engl. *horseradish peroxidase*

IFA – inkompletni Freundov adjuvans, prema engl. *incomplete Freund's adjuvant*

IgG – imunoglobulin G

IKK – kompleks kinaze I $\kappa$ B, prema engl. *I $\kappa$ B kinase complex*

IL – interleukin

IRF8 – čimbenik regulacije interferona 8, prema engl. *interferon regulatory factor 8*

JAG – Jagged

JAK – prema engl. *Janus kinase*

LNR – Lin12-Notch

loxP – prema engl. *locus of x-over, P1*

LPS – lipopolisaharid

LysM – lizozim M, prema engl. *lysozyme M*

MAPK – kinaza aktivirana mitogenima, prema engl. *mitogen-activated kinase*

M-CSF – čimbenik stimulacije kolonija makrofaga, prema engl. *macrophage colony stimulating factor*

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

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

MR – magnetska rezonancija

NEXT – Notch izvanstanična domena, prema engl. *Notch extracellular truncation*

NFATc1 – jezgrin čimbenik c1 aktiviranih limfocita T, prema engl. *nuclear factor of activated T cells c1*)

NFQ – hvatač fluorescencije, prema engl. *nonfluorescent quencher*

NFκB – jezgreni čimbenik κB, prema engl. *nuclear factor κB*

NICD – unutarstanična domena receptora Notch, prema engl. *Notch intracellular domain*

NRR – negativna regulacijska regija, prema engl. *negative regulatory region*

NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi, prema engl. *nonsteroid antiinflammatory drugs*

OCP – osteoklastni progenitor, prema engl. *osteoclast progenitor*

OSCAR – receptor povezan s osteoklastima, prema engl. *osteoclast-associated receptor*

PBL – leukociti iz periferne krvi, prema engl. *peripheral blood leukocytes*

PBS – otopina fosfatnog pufera, prema engl. *phosphate buffered saline*

PCR – lančana reakcija polimeraze, prema engl. *polymerase chain reaction*

PE – fikoeritrin, prema engl. *phycoerithrin*

PerCP – peridin-klorofil, prema engl. *peridinin-chlorophyll*

PEST – motivi bogati prolinom/glutamatom/serinom/treoninom, prema engl. *proline/glutamic acid/serine/threonine*

PI3K-Akt – fosfatidilinozitol 3-kinaza-Akt, prema engl. *phosphatidylinositol 3-kinase-Akt*

PIR-A – prema engl. *paired Ig-like receptor-A*

qPCR – kvantitativni PCR, prema engl. *quantitative PCR*

RAM – motiv koji veže transkripcijski čimbenik Rbpjk, prema engl. *Rbpjk association module*

RANK – receptor aktivatora jezgrenog čimbenika κB, prema engl. *receptor activator of nuclear factor κB*

RANKL – ligand za RANK, prema engl. *receptor activator of nuclear factor-κB ligand*

RBPJκ – protein koji veže rekombinacijski signal za κ J regiju imunoglobulina, prema engl. *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*

rcf – relativna centrifugalna sila (g), prema engl. *relative centrifugal force*

RF – reumatoidni faktor

rm – rekombinantni mišji, prema engl. *recombinant mouse*

RNA – ribonukleinska kiselina, prema engl. *ribonucleic acid*

ROI – regija od interesa, prema engl. *region of interest*

rpm – okretaja u minuti, prema engl. *revolutions per minute*

SDAI – pojednostavljeni indeks aktivnosti bolesti, prema engl. *simple disease activity index*

SIRPb1 – prema engl. *signal-regulatory protein beta-1*

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

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

TMT – tarzometatarsalni dio stražnje šape digestiran kolagenazom, prema engl. *tarsometatarsal tissue*

TNFR – TNF receptor

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

TRAF – čimbenik povezan s receptorima obitelji TNF, prema engl. *TNF receptor associated factor*

TRAP – kisela fosfataza otporna na tartarat, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*

TREM-2 – prema engl. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*

# 1. Uvod

## 1.1. Reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis je kronična upalna bolest zglobova koja prema procjenama pogađa od 0,5 sve do 1% svjetske populacije (1). Reumatoidni artritis je također, kao i brojne druge sistavne autoimunosne bolesti, dva do tri puta češći u žena. Bolest je karakterizirana upalom zglobova koja, ako se učinkovito ne liječi, može dovesti do nepovratnog oštećenja i invaliditeta (2). Osim zglobova, reumatoidni artritis zahvaća i druga tkiva i organske sustave u obliku reumatoidnih čvorića, vaskulitisa te kardiovaskularnih, plućnih, neuroloških, gastrointestinalnih, bubrežnih i hematoloških komplikacija (3). U zadnjih nekoliko desetljeća područje reumatologije je znatno napredovalo i nova saznanja su dovela do otkrića suvremenih terapijskih postupaka koji su znatno poboljšali tijek bolesti i poboljšali kvalitetu života bolesnika. Međutim, iako je danas remisija moguća, bolest je neizlječiva, a kod nekih se bolesnika i dalje teško kontrolira dostupnim postupcima liječenja (1).

Etiologija bolesti je vrlo složena i uključuje genetsku podložnost u kombinaciji s nepotpuno razjašnjenim okolišnim okidačima. Incidencija reumatoidnog artritisa se razlikuje među različitim geografskim područjima, primjerice u sjevernoj Europi je učestalija nego u južnoj. Također postoje razlike među rasama, primjerice u bijeloj i crnoj rasi je učestalija nego u Hispanoamerikanaca, dok je incidencija u američkih domorodaca čak do 6%. Te razlike u incidenciji potvrđuju genetsku sklonost razvitku bolesti, a mogu se objasniti i okolišnim čimbenicima (1). Specifični aleli gena lokusa skupine II ljudskih leukocitnih antigena DR (HLA-DR, prema engl. *human leukocyte antigen D related*, nazvan i sustav gena i antigena glavnog kompleksa tkivne podudarnosti skupine II, MHC-II, prema engl. *major histocompatibility complex*) snažno su povezani s razvojem i kliničkom slikom reumatoidnog artritisa (4). Neki aleli lokusa HLA-DR, posebice HLA-DRB1\*01 i HLA-DRB1\*04 kodiraju specifični slijed aminokiselina nazvan zajedničkim epitopom koji je prekomjerno zastupljen u bolesnika s reumatoidnim artritisom (5). Do danas je otkriveno preko 100 lokusa koji su povezani s povećanim rizikom za razvoj bolesti, ali i neki koji su povezani s težinom kliničke slike. Osim genetskih varijanti, utvrđeni su epigenetski obrasci povezani s reumatoidnim artritisom. Primjerice, metilacija DNA može biti poveznica između okolišnih čimbenika i genetske predispozicije, kao u slučaju pojačane metilacije rizičnog alela lokusa HLA-DRB1 u pušača s reumatoidnim artritisom u odnosu na nepušače, u kojih razlika u razini metilacije nije utvrđena (1, 4). Od negenetskih čimbenika rizika tu su i ženski spol te ranije navedeno pušenje, koji povećavaju rizik razvoja bolesti za čak dva puta. Mikrobiota usne šupljine i crijeva

povezane su također s razvojem bolesti. Primjerice periodontalna bolest nosi rizik za razvoj reumatoidnog artritisa, a predmnijevana poveznica je prisutnost mikroorganizama *Porphyromonas gingivalis* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (6). Također raznovrsnost crijevne mikrobiote u oboljelih je smanjena, a povišene razine *Prevotella copri* pronađene su kod bolesnika u ranim stadijima bolesti. U nedavnom istraživanju, na molekulama HLA-DR bolesnika s reumatoidnim artritisom izolirali su peptide koji imaju slične sekvence s peptidima roda *Prevotella* i drugim crijevnim bakterijama (7).

Početak bolesti u mnogih bolesnika godinama prethodi razvoju klinički jasnih simptoma i postavljanju dijagnoze. U genetski predisponiranih osoba izloženost nekim čimbenicima okoliša može biti okidač za početni razvoj autoimunosti. Čini se da neki stresori, primjerice cigaretni dim ili bakterijska infekcija mogu potaknuti posttranslacijske modifikacije, primjerice modifikacije aminokiseline arginin u citrulin u različitim bjelančevina, u procesu koji nazivamo citrulinacija. Takvi i drugi promijenjeni peptidi predočavaju se u sklopu molekula MHC limfocitima T, koji mogu potaknuti limfocite B na proizvodnju protutijela koja prepoznaju vlastite bjelančevine. Neka od tih protutijela karakteristična za reumatoidni artritis su protutijela na citrulinirane bjelančevine (ACPA, prema engl. *anti-citrullinated protein antibodies*) i protutijela na imunoglobulin G poznatija kao reumatoidni faktor (RF). Prisutnost protutijela može se naći i desetak godina prije početka bolesti, no sama protutijela nisu dovoljna za razvoj artritisa i često je potreban dodatni okidač. Također, iako bolesnici koji imaju protutijela ACPA ili RF (nazvani seropozitivni) imaju poglavito agresivniji tijek bolesti, postoji i skupina bolesnika koji nemaju ta protutijela u serumu (nazvani seronegativni), ali boluju od reumatoidnog artritisa (1).

U ranoj fazi razvoja bolesti u sinovijalnim zglobovima dolazi do nakupljanja mononuklearnih stanica u sinovijalnom tkivu, uz aktivaciju sinovijalnih stanica. Zatim dolazi do ekspanzije intime sinovije, a ta zadebljana sinovijalna membrana sadrži sinovijalne makrofage i sinovijalne fibroblaste. Aktivirane sinovijalne stanice izvor su brojnih proupalnih citokina, primjerice interleukina (IL)-1, IL-6, čimbenika nekroze tumora (TNF, prema engl. *tumor necrosis factor*)- $\alpha$ , kao i metaloproteinaza matriksa (MMP, prema engl. *matrix metalloproteinase*) te drugih proteinaza. Polovicu ranih upalnih stanica u sinoviji čine CD4<sup>+</sup> limfociti T, a nalazimo i limfocite B i plazma-stanice koje lokalno proizvode protutijela te folikularne dendritične stanice, makrofage i mastocite. Reumatoidni artritis karakterizira razaranje hrskavice i kosti unutar i oko zahvaćenih zglobova. Iako i makrofagi, neutrofili i mastociti pridonose oštećenju hrskavice, proizvodeći citokine i enzime MMP, za oštećenje

hrskavice su ključni sinovijalni fibroblasti. U reumatoidnom artritisu sinovijalni fibroblasti poprimaju „agresivni“ fenotip i invadiraju hrskavicu razarajući međustanični matriks. Uz oštećenje hrskavice, oko zahvaćenih zglobova, ali i na sustavnoj razini, dolazi do razaranja koštanog tkiva koje je poglavito posredovano osteoklastima (8).

Bolesnici s reumatoidnim artritisom najčešće dolaze na pregled s otečenim zglobovima za koje je karakteristična jutarnja ukočenost i bolnost pri pregledu. Zglobovi su zahvaćeni simetrično, a karakteristična je zahvaćenost metakarpofalangealnih i proksimalnih interfalangealnih zglobova šake i stopala, zapešća, gležnjeva, lakta, ramena, koljena i kuka. Osim zahvaćenosti zglobova između prvog i drugog vratnog kralješka, reumatoidni artritis uglavnom pošteduje aksijalne zglobove kao i distalne interfalangealne zglobove. Reumatoidni artritis se razlikuje od drugih vrsta upalnih bolesti zglobova po iznimno napredujućem tijeku bolesti i opsežnom razaranju tkiva (9). Uz artritis, prisutne su i brojne ekstraartikularne manifestacije bolesti, no najčešće su kardiovaskularne komplikacije i intersticijska plućna bolest, koji predstavljaju najvažniji uzrok preuranjene smrti u bolesnika s reumatoidnim artritisom (3). Zbog heterogenosti kliničke prezentacije ne postoje univerzalni dijagnostički kriteriji za reumatoidni artritis, već samo klasifikacijski kriteriji. Trenutno su u upotrebi kriteriji Američkog reumatološkog društva (ACR, prema engl. *American College of Rheumatology*) i Europske lige protiv reumatizma (EULAR, prema engl. *European League Against Rheumatism*) utemeljeni 2010. godine (10).

U posljednja dva desetljeća došlo je do znatnog poboljšanja ishoda bolesnika s reumatoidnim artritisom, među ostalim zbog ranijeg postavljanja dijagnoze te ranijeg i učinkovitijeg liječenja (1). Optimalna strategija liječenja bi trebala biti postizanje remisije ili vrlo niske aktivnosti bolesti, kako bi se spriječilo trajno razaranje tkiva. Cilj liječenja je pretpostaviti željenu razinu niske aktivnosti bolesti i vremenski rok u kojem je to nužno postići te, u slučaju da postavljeni cilj nije postignut, prilagoditi postupak liječenja. Kako bi se kvantificirala aktivnost bolesti, što je nužno za praćenje bolesti i procjenu uspješnosti liječenja, ustanovljene su brojne skale koje uključuju kliničke parametre, kao broj bolnih i otečenih zglobova, te hematološke i biokemijske pokazatelje, kao što su vrijednost sedimentacije eritrocita i razina c-reaktivnog proteina (primjerice klinički indeks aktivnosti bolesti (CDAI, prema engl. *clinical disease activity index*), pojednostavljeni indeks aktivnosti bolesti (SDAI, prema engl. *simple disease activity index*) ili procjena aktivnosti bolesti za 28 zglobova (DAS28, prema engl. *disease activity score 28*)) (10).

Za liječenje reumatoidnog artritisa koriste se anti-reumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti (DMARD, prema engl. *disease-modifying antirheumatic drugs*). Za olakšavanje simptoma bolesnici također koriste nesteroidne protuupalne lijekove (NSAID, prema engl. *nonsteroidal antiinflammatory drug*), premda oni ne djeluju na tijek bolesti. Za uspostavljanje brze remisije, ako bolesnici razviju vrlo aktivan klinički oblik bolesti, koriste se i glukokortikoidi, iako se zbog profila nuspojava ne preporučuje njihovo dugotrajno uzimanje. Lijekove iz skupine DMARD možemo podijeliti na sintetske i biološke, a sintetski se dalje dijele na konvencionalne i ciljane. Primjer konvencionalnog sintetskog lijeka iz skupine DMARD je metotreksat koji je danas prva linija liječenja reumatoidnog artritisa uz inicijalni dodatak glukokortikoida. Metotreksat dovodi do remisije u 25-40% bolesnika ako se primjenjuje kao monoterapija, što je više nego bilo koji biološki DMARD pojedinačno, dok u kombinaciji s glukokortikoidima i do 50% bolesnika postiže remisiju. Također, uz supstituciju folatom, mnoge se neželjene nuspojave metotreksata mogu spriječiti. Primjer ciljanih sintetskih lijekova DMARD su inhibitori kinaze JAK (prema engl. *Janus kinase*), koji ometaju signalizaciju nekih citokina (primjerice IL-6 i IL-17). Lijekovi iz biološke skupine DMARD poglavito su monoklonalna protutijela koja ciljaju neke od koraka u upalnom procesu, bilo proupalne citokine (anti-TNF i anti-IL-6) ili neke populacije stanica (anti-CD20) i njihove aktivacijske interakcije (anti-CD80/86) (9).

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

Reumatoidni artritis ubrajamo u imunosno-posredovane upalne bolesti kod kojih dolazi do gubitka kosti primarno izazvanog upalom (Slika 1). Koštane erozije karakteristične su za reumatoidni artritis, a ako se ne liječe mogu dovesti do nepovratnog oštećenja zglobova (2, 8). U neliječenih bolesnika koštane su erozije vidljive na rentgenskim snimkama već šest mjeseci od početka bolesti, stoga bolest treba što prije učinkovito liječiti. Koštane erozije, kao i periartikularna osteopenija i sustavna osteoporoza rezultat su pojačane razgradnje kosti potaknute upalom, koja u reumatoidnom artritisu nije praćena pojačanim i dostatnim stvaranjem nove kosti (11). Pojačanu koštanu razgradnju uzrokuje pojačana aktivnost osteoklasta, stanica koje razgrađuju kost, potaknutih proupalnim citokinima, autoprotutijelima i pojačanom diferencijacijom iz umnoženih osteoklastnih progenitora (2, 12, 13).

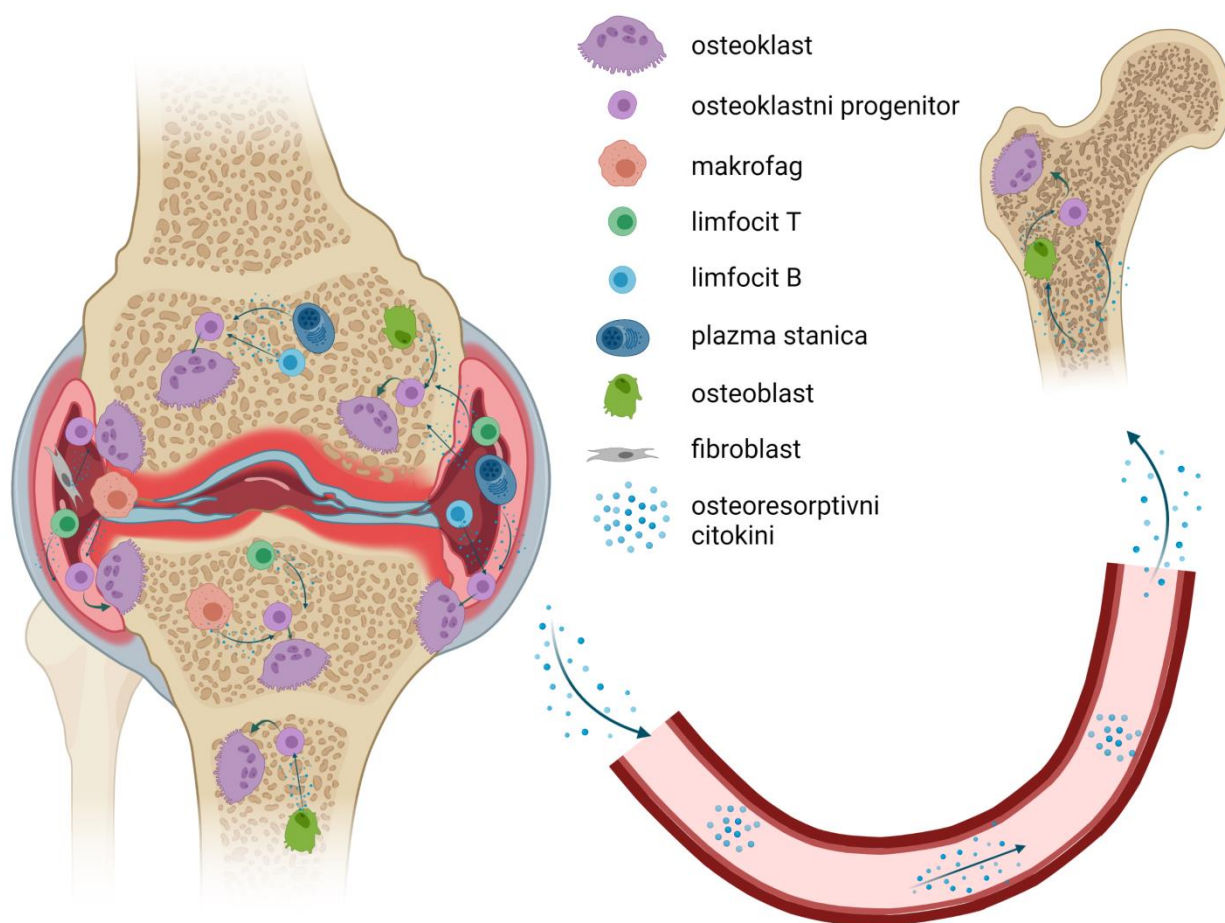
Koštanim erozijama nazivamo prekid kontinuiteta kortikalne kosti koji se vidi na rentgenskim snimkama, a pojavljuju se najčešće na radijalnoj strani zglobova prstiju, što pokazuje da postoji faktor predispozicije za određena anatomska mjesta. Nadalje, koštane erozije nastaju pretežno na mjestima gdje upaljeno sinovijalno tkivo dolazi u izravan dodir s površinom kosti (2).

Napredak u tehnikama oslikavanja kompjuteriziranom tomografijom (CT, prema engl. *computed tomography*) visoke rezolucije i magnetnom rezonancijom (MR) omogućio je detekciju puno manjih erozija u odnosu na mogućnosti starijih tehnika oslikavanja i naglasio povezanost gubitka kosti s upalom. Naime, osim izravnog utjecaja upaljene sinovije na kortikalnu koštanu površinu, do koštanih erozija dolazi i uslijed infiltracije podležeće koštane srži upalnim stanicama, što nazivamo osteitis (14). Iako se dugo mislilo da je osteitis posljedica unutarzglobne upale, danas se smatra da se osteitis razvija usporedno sa sinovitisom. Osteitis uključuje infiltraciju upalnim stanicama i pojačanu vaskularizaciju periartikularnog odjeljka, uz zamjenu masnih stanica različitim populacijama upalnih i imunosnih stanica, što u konačnici dovodi do stanjenja subhondralne koštane ploče. Perzistirajuća upala, pogotovo osteitis, snažno su povezani s razvojem koštanih erozija čak i u bolesnika s kliničkom remisijom (15, 16).

Osim oštećenja hrskavice i stanjenja subhondralne kosti, u reumatoidnom artritisu dolazi i do periartikularne osteopenije, koja pogađa trabekularnu kost uz zahvaćeni zglob i karakteristična je za reumatoidni artritis, a tipično zahvaća metafize i dijafize metakarpalnih kostiju i falangi. Nastaje zbog osteitisa periartikularnog odjeljka, praćenog infiltracijom upalnim stanicama koje luče povećane količine osteoresorptivnih čimbenika koji potiču aktivnost osteoklasta. Periartikularna osteopenija jedan je od najranijih morfoloških znakova reumatoidnog artritisa i prethodi razvoju koštanih erozija, međutim tu je demineralizaciju teško utvrditi na klasičnim rentgenskim snimkama stoga gubitak trabekularne kosti nije uvršten u klasifikacijske kriterije bolesti (11).

Generalizirana osteoporoza pogađa bolesnike s reumatoidnim artritisom bez obzira na dob i spol te dovodi do smanjenja koštane mineralizacije u aksijalnom i apendikularnom kosturu. Neki rizični čimbenici za razvoj osteoporoze u reumatoidnom artritisu već su spomenuti, nadasve ženski spol i pušenje. S druge strane, kronična upala, upotreba glukokortikoida i smanjena fizička aktivnost uslijed bolova i otečenosti zglobova također znatno pridonose razvoju osteoporoze. Osteoporoza općenito nosi visok rizik za nastanak patoloških prijeloma kralježaka i drugih kostiju, a bolesnici s reumatoidnim artritisom imaju višestruko veći rizik nastanka takvih prijeloma, posebice kralježaka (17).





**Slika 1. Gubitak koštanog tkiva izazvan upalom i pojačanom aktivnošću osteoklasta u reumatoidnom artritisu.** U kroničnim upalnim bolestima zglobova dolazi do nakupljanja upalnih stanica kao što su neutrofili, makrofagi, limfociti T i B, sinovijalni fibroblasti i druge stanice u sinovijalnom tkivu i subhondralnoj kosti. Te stanice proizvode upalne medijatore, citokine, tkivne enzime koji razaraju hrskavicu, a neke mogu lučiti i ključan osteoklastogeni čimbenik RANKL (prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand*). Upalni medijatori koje luče stanice djeluju lokalno i, ulaskom u cirkulaciju, sustavno na osteoklastne progenitore, osteoklaste i osteoblaste, potičući osteoklastogenezu izravno ili poticanjem osteoblasta na izražaj čimbenika RANKL. Posljedično dolazi do pojačane osteoresorptivne aktivnosti. Gubitak kosti u reumatoidnom artritisu odvija se lokalno na razini zahvaćenog zgloba, u obliku koštanih erozija i gubitka periartikularne trabekularne kosti i sustavno uzrokujući osteopeniju i osteoporozu. Modificirano prema: Flegar D, Šućur A, Markotić A, Kovačić N, Grčević D. Osteoporosis in the View of Osteoimmunology: Common Feature Underlined by Different Pathogenic Mechanisms. *Period Biol.* 2015;117(1). Napravljeno koristeći BioRender.com

### 1.3. Osteoklasti

Stanice koje dovode do pojačane razgradnje kosti i njenog posljedičnog razaranja su osteoklasti. To su višejezgrene stanice nastale spajanjem osteoklastnih progenitora, te predstavljaju jedine stanice u organizmu specijalizirane za razgradnju mineraliziranog koštanog matriksa (18). Za razliku od osteoblasta, koji stvaraju koštani matriks i mezenhimskog su podrijetla, osteoklasti nastaju iz hematopoetske matične stanice mijeloidne linije. Tijekom sazrijevanja stanice prolaze nekoliko stupnjeva razvoja od oligopotentnih osteoklastnih progenitora preko usmjerenih osteoklastnih progenitora (preosteoklasta) i jednojezgrenih nezrelih osteoklasta do zrelih višejezgrenih osteoklasta. U fiziološkim uvjetima stvaranje kosti je usko upareno s razgradnjom kosti u odgovoru na mehaničke sile te različite hormone, citokine i čimbenike rasta (19, 20). Zreli osteoklasti na jednoj svojoj strani tvore nabrani rub kojim se priljubljuju uz površinu kosti pomoću adhezijskih molekula i tvore resorpcijski odjeljak odvojen od ostatka okoliša (21). U taj odjeljak pomoću protonskih pumpi luče vodikove ione i time zakiseljuju okoliš, a taj kiseli okoliš omogućava demineralizaciju kosti. Nadalje, osteoklasti pomoću različitih proteinaza, primjerice kisele fosfataze otporne na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*), katepsina K i MMP9, razgrađuju organski matriks kosti (22).

Za diferencijaciju osteoklasta potreban je ligand receptora za pobudu jezgrinog čimbenika  $\kappa B$  (RANKL, prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa B$  ligand*) uz prisutnost čimbenika rasta makrofagnih kolonija (M-CSF, prema engl. *macrophage-colony stimulating factor*) (23, 24). Glavnina čimbenika M-CSF potrebnog za sazrijevanje osteoklasta dolazi od osteoblasta, a RANKL proizvode osteoblasti, osteociti, stromalne stanice i imunosne stanice. Čimbenik RANKL fiziološki izražavaju osteoblasti kao membranski protein, koji interakcijom s receptorom RANK (prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa B$* ) na osteoklastnim progenitorima potiče stvaranje osteoklasta (20). Prirodni antagonist djelovanju čimbenika RANKL je osteoprotegerin (OPG) kojeg proizvode osteoblasti i koji djeluje kao topivi neutralizacijski receptor za RANKL (25, 26). Sve tri navedene molekule, RANK (nazvan još i TNFRSF11A, prema engl. *tumor necrosis factor receptor superfamily member 11a*), RANKL (nazvan još i TNFSF11, prema engl. *tumor necrosis factor ligand superfamily member 11*) i OPG (nazvan još i TNFRSF11B, prema engl. *tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b*) pripadaju TNF-obitelji liganda i receptora. Osim klasične trijade RANK/RANKL/OPG, osteoblasti luče i druge čimbenike koji reguliraju stvaranje osteoklasta, dok osteoklasti luče čimbenike kojima reguliraju aktivnost osteoblasta (19), kako bi se održala

koštana homeostaza. M-CSF djeluje preko svog receptora CSF-1 (CSF-1R), još nazvanog i cFms ili biljeg stanične diferencijacije (CD, prema engl. *cluster of differentiation*) CD115, koji potiče izražaj receptora RANK na osteoklastnim progenitorima, te je važan i za preslagivanje citoskeleta i preživljenje osteoklasta (27, 28). RANKL se veže za receptor RANK i potiče aktivaciju čimbenika povezanog s receptorom za TNF 6 (TRAF6, prema engl. *TNF associated receptor 6*), koji nadalje aktivira kompleks kinaze I $\kappa$ B (IKK, prema engl. *I $\kappa$ B kinase complex*), signalni put fosfatidilinozitol 3-kinaza-Akt (PI3K-Akt, prema engl. *phosphatidylinositol 3-kinase-Akt*) i nekoliko kinaza aktiviranih mitogenima (MAPK, prema engl. *mitogen-activated kinase*). Navedeni slijed aktivira transkripcijske čimbenike jezgrin čimbenik  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, prema engl. *nuclear factor kappa B*), c-Fos i c-Jun, koji potiču jezgrin čimbenik c1 aktiviranih limfocita T (NFATc1, prema engl. *nuclear factor of activated T cells c1*) (13, 29, 30). NFATc1 se potom sam pojačava tijekom osteoklastogeneze i potiče izražaj gena potrebnih za diferencijaciju i funkciju osteoklasta, kao što su TRAP, transmembranski protein specifičan za dendritične stanice (DC-STAMP, prema engl. *dendritic cell-specific transmembrane protein*), receptor povezan s osteoklastima (OSCAR, prema engl. *osteoclast-associated receptor*) i katepsin K (31-35). U osteoklastnim progenitorima konstitucijski su izraženi transkripcijski represori signalizacije čimbenika RANKL, koje RANKL mora nadvladati da bi se osteoklastogeneza mogla nastaviti. Primjeri transkripcijskih represora su čimbenik regulacije interferona 8 (IRF8, prema engl. *interferon regulatory factor 8*), limfom stanica B 6 (BCL6, prema engl. *B cell lymphoma 6*) i drugi (36-38). U ranoj fazi osteoklastogeneze RANKL smanjuje izražaj represora osteoklastogeneze preko poticanja bjelančevine sazrijevanja 1 potaknute limfocitima B (BLIMP-1, prema engl. *B-lymphocyte-induced maturation protein-1*) (39).

U patološkim upalnim stanjima poput infekcije, autoimunskih bolesti i koštanih prijeloma diferencijacija osteoklasta je pojačana. U upali imunosne stanice, primjerice limfociti T, makrofagi ili druge stanice poput sinovijalnih fibroblasta luče proupalne citokine, kao što su IL-1, IL-6, IL-17 i TNF- $\alpha$  koji mogu pojačati osteoklastogenezu ili preko poticanja izražaja čimbenika RANKL ili izravno, neovisno o čimbeniku RANKL. Čimbenik RANKL, osim osteoblasta i osteocita, mogu izražavati i aktivirani limfociti T i B, hipertrofični hondrociti i sinovijalni fibroblasti (2, 12, 20). TNF- $\alpha$  je glavni osteoklastogeni citokin u upalnim stanjima, i osim što potiče izražaj drugih proupalnih citokina i vlastiti izražaj, može potaknuti osteoklastogenezu i neovisno o čimbeniku RANKL (40). Sam IL-1 ne potiče osteoklastogenezu, ali djeluje sinergistički s čimbenicima RANKL i TNF- $\alpha$  (41). IL-6 djeluje dvojako, jer koči signalni put receptora RANK u osteoklastima, ali istovremeno pojačava

izražaj čimbenik RANKL na osteoblastima (42, 43). IL-17 pojačava izražaj receptora RANK na osteoklastnim progenitorima i potiče lučenje drugih proupalnih citokina (44, 45).

Osim djelovanja imunskih stanica i upalnih medijatora u patološkoj osteoklastogenezi, važnu ulogu u koštanom razaranju u sklopu reumatoidnog artritisa imaju autoprotutijela posebice ACPA (13). Prisutnost ACPA snažno je povezana s razvojem koštanih erozija u bolesnika s reumatoidnim artritisom, neovisno o aktivnosti bolesti (46). Druga opisana autoprotutijela također koreliraju s progresijom bolesti i pojavom koštanih erozija, ali s obzirom na to da ta povezanost ne ovisi o specifičnosti protutijela smatra se da je glavni mehanizam poticanja osteoklastogeneze djelovanjem na receptore za Fc-fragment IgG protutijela (FcγR), koji nalazimo na stanicama mijeloidne linije, uključujući osteoklastne progenitore. Razvoj osteoklasta osim o signalu RANKL ovisi i o kostimulacijskim signalima molekula kao što su lanac FcRγ ili DAP12 (prema engl. *DNAX-activating protein of 12 kDa*), koji se udružuju s receptorima PIR-A (prema engl. *paired Ig-like receptor-A*), OSCAR, TREM-2 (prema engl. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) ili SIRPb1 (prema engl. *signal-regulatory protein beta-1*). Ti signali imaju ulogu u međusobnoj komunikaciji osteoklastnih progenitora te međudjelovanju osteoklasta s osteoblastima ili koštanim matriksom (13). Uz izravan učinak na diferencijaciju osteoklasta, autoprotutijela na isti način aktiviraju i makrofage koji potom luče proupalne citokine koji pospješuju osteoklastogenezu (47). Upalni medijatori koji se luče u reumatoidnom artritisu, osobito TNF-α, također inhibiraju aktivnost osteoblasta i smanjuju stvaranje kosti, što pojačava gubitak koštane mase (48).

#### **1.4. Osteoklastni progenitori**

Razvoj hematopoetskog sustava u sisavaca događa se u nekoliko valova tijekom embriogeneze. Prvi val započinje razvojem tzv. ranih eritromijeloidnih progenitora u žumanjčanoj vreći koji se potom razvijaju u makrofage žumanjčane vreće i nakon spajanja vaskularnih sustava žumanjčane vreće i embrija naseljavaju embrionalne organe kao što su mozak i jetra. Drugi val kasnih eritromijeloidnih progenitora naseljava fetalnu jetru i razvija se u fetalne monocite jetre. Završni val hematopoeze uključuje preteče hematopoetske matične stanice koje sazrijevaju i proliferiraju u fetalnoj jetri te koloniziraju koštanu srž (49). Dugo se smatralo da osteoklastni progenitori u odrasle jedinke nastaju isključivo iz hematopoetske matične stanice iz koštane srži. Međutim pokazano je da se i u embrionalnom i u postnatalnom organizmu osteoklasti mogu razviti iz eritromijeloidnih makrofaga i monocita podrijetlom iz hematopoetske matične stanice (50, 51). Istraživanje Yahara i suradnika pokazalo je da u odraslom organizmu možemo

naći osteoklastne progenitore nastale iz stanica eritromijeloidnog podrijetla smještenih u embrionalnoj žumanjčanoj vreći, koji sudjeluju u koštanoj pregradnji i u fiziološkim i u patološkim uvjetima. Ti se progenitori mogu spojiti s progenitorima hematopoetskog podrijetla i tvoriti osteoklaste miješanog podrijetla (49, 51, 52).

Izolirane osteoklastne progenitore možemo uzgojiti *in vitro* u staničnoj kulturi i potaknuti njihov razvoj u osteoklaste uz dodatak čimbenika RANKL i M-CSF (53, 54). Grabert i suradnici pokazali su da proliferacija, diferencijacija i preživljenje stanica mononuklearno-fagocitnog sustava ovisi o signalima receptora za M-CSF (CD115), te da se CD115 može koristiti kao biljeg tih stanica (27). Nekoliko je istraživačkih grupa karakteriziralo i izoliralo osteoklastne progenitore mijeloidnog podrijetla, koji zadržavaju sposobnost diferencijacije u osteoklaste, dendritične stanice i makrofage. U koštanoj srži miša identificirane su nezrele stanice mijeloidnog podrijetla fenotipa  $CD117^+CD115^+RANK^-$ , koje se mogu diferencirati u osteoklaste i dendritične stanice (23). Također je u koštanoj srži otkrivena malobrojna populacija fenotipa  $B220^-CD3^-CD11b^{-/lo}CD115^+CD117^+CX3CR1^+$ , koja sadrži progenitore osteoklasta, makrofaga i dendritičnih stanica, a ujedno izražava i druge biljege mijeloidnih stanica kao što su Ly6C i F4/80 (55, 56). Xiao i suradnici su u koštanoj srži miša identificirali zajednički progenitor fenotipa  $B220^-CD117^+CD115^+CD11b^{lo}CD27^{hi}$  i nazvali ga progenitor makrofaga, osteoklasta i dendritičnih stanica (MODP, prema engl. *macrophage/osteoclast/dendritic cell progenitor*) (57). Zatim su sličnu populaciju fenotipa  $CD11b^-CD34^+c-KIT^+FLT3^+IL3R\alpha^{hi}$  pokazali i u ljudi (58). Bez obzira na manje različitosti u fenotipu utvrđenih progenitora u različitim istraživanjima, zajednički nalaz je da mijeloidni progenitori podrijetla iz hematopoetske matične stanice i u odraslih jedinki zadržavaju svojevrsnu plastičnost i sposobnost migracije, pa ih je moguće izolirati iz koštane srži i iz ekstramedularnih tkiva, kao što su slezena, jetra, mišići, pluća i crijeva (59, 60). Uz cirkulaciju progenitorskih stanica, nedavno je otkriveno da se zreli osteoklasti mogu reciklirati, fisijom tvoreći stanice nazvane osteomorfi. Ti se osteomorfi otpuštaju u cirkulaciju da bi se kasnije, privučeni kemokinskim signalima, vratili u kost i ponovno spojili u zrele osteoklaste (61).

Pokazano je da osteoklastni progenitori izražavaju kemokinske receptore, što je važno za njihovo opisano usmjereno gibanje i kemotaksiju. Osobito su važni kemokinski receptori CX3CR1 i CCR2, koji su povezani i s upalom i drugim patološkim procesima (53, 62, 63). Sposobnost monocita koji izražavaju receptor CX3CR1 da se diferenciraju u zrele osteoklaste potvrdile su brojne istraživačke skupine (52, 63, 64). U našim smo prethodnim istraživanjima karakterizirali osteoklastne progenitore u koštanoj srži miša kao stanice fenotipa

CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup> i utvrdili da je ta populacija zastupljenija u artritisu u odnosu na zdrave životinje. Nadalje smo pokazali da se te stanice pojačano nakupljaju u blizini zahvaćenih zglobova i sudjeluju u patološkoj osteoklastogenezi u artritisu (53). Bez obzira na detaljno definiran fenotip osteoklastnih progenitora, mehanizmi njihove pojačane proliferacije i aktivnosti u artritisu, koji dovode do razaranja kosti nisu do kraja razjašnjeni.

### 1.5. Signalni put Notch

Signalni put Notch evolucijski je očuvan način komunikacije između susjednih stanica. Otkriven je na početku 20. stoljeća u vrsti *Drosophila melanogaster* te jer nazvan Notch zbog karakterističnih rečkastih krila (prema engl. *notched*) koje su imale mušice s mutacijom u genu za receptor Notch (65). Signalni put Notch uključen je u regulaciju staničnih procesa u gotovo svim staničnim linijama u različitim fazama razvoja, od embrionalnog razvitka do odraslog organizma. Ne čudi stoga da mutacije u komponentama te disregulacija signalnog puta Notch dovode do brojnih patoloških stanja (66-69).

U sisavaca signalni put Notch uključuje četiri različita receptora, Notch 1-4 te pet liganada, Jagged (JAG) 1 i 2 te Delta-like (DLL) 1, 3 i 4. Receptori Notch su transmembranske molekule koje se sastoje od 29-36 ponavljajućih sljedova nalik epidermalnom čimbeniku rasta (EGF, prema engl. *epidermal growth factor*) koji sadrže mjesta međudjelovanja s ligandima, nakon kojih slijedi negativna regulacijska regija (NRR, prema engl. *negative regulatory region*) sastavljena od tri ponavljajuća slijeda Lin12-Notch (LNR) i heterodimerizacijske domene (HD, prema engl. *heterodimerization domain*) (66). NRR je važna u sprječavanju aktivacije receptora u odsustvu liganda, a sadrži dva ključna mjesta cijepanja (S1- i S2-cijepanje) receptora (Slika 2). Cijepanje na mjestu S1 događa se u endoplazmatskoj mrežici pri sintezi receptora i dovodi do stvaranja heterodimera nekovalentno vezanih međudjelovanjem N- i C-terminalnih krajeva HD (67). Nakon HD slijedi transmembranski dio receptora vezan za unutarstaničnu domenu (NICD, prema engl. *Notch intracellular domain*). Domena NICD se sastoji od motiva koji veže transkripcijski čimbenik protein koji veže rekombinacijski signal za  $\kappa$  J regiju imunoglobulina (Rbpjk, prema engl. *recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*) u jezgri (RAM, prema engl. *Rbpjk association module*), sedam ankirinskih sljedova (ANR, prema engl. *ankirin repeats*), transaktivacijsku domenu i motive bogate prolinom/glutamatom/serinom/treoninom (PEST, prema engl. *proline/glutamic acid/serine/threonine*), koji su važni za stabilnost domene NICD.

Ligandi signalnog puta Notch su također transmembranske bjelančevine i sastoje se od N-terminalnog Delta/Serrate/LAG2 (DSL) motiva i DOS-domena (prema engl. *Delta and OSM-11-like proteins*) te ponavljajućih sljedova nalik na EGF i transmembranske domene. Ligandi koji sadrže DSL mogu se podijeliti prema prisustvu domene bogate cisteinom (JAG ili DLL) i DOS-domene (66). Pri međudjelovanju receptora i liganda signalnog puta Notch opisana je važnost poluge u promjeni konformacije i otkrivanju mjesta cijepanja S2 stoga je za učinkovitu aktivaciju receptora potrebno da je ligand vezan za stanicu, dok topivi ligandi imaju inhibicijski učinak (68). Cijepanje na mjestu S2 nakon vezanja liganda obavlja bjelančevina koja sadrži domen disintegrina i metaloproteinaze (ADAM, prema engl. a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein) 10 i ADAM17 te dovode do stvaranja intermedijarnog proizvoda sastavljenog od transmembranske domene i domene NICD (NEXT, prema engl. *Notch extracellular truncation*). NEXT je supstrat enzima  $\gamma$ -sekretaza koja cijepa receptor na mjestu S3, prilikom čega se odvaja domena NICD koja se premješta u jezgru (67). Domena NICD u jezgri veže transkripcijski čimbenik Rbpjk (koji se još naziva CSL, prema CBF-1/Su(H)/Lag-1) i potom transkripcijski koaktivator MAML (prema engl. *Mastermind-like*). Transkripcijski čimbenik Rbpjk u odsutnosti domene NICD veže korepresore i sprječava transkripciju ciljnih gena, dok u kombinaciji s domenom NICD može vezati koaktivatore i MAML, te tako posreduje u transkripciji gena. Kao glavni ciljni geni signalnog puta Notch opisuju se HES (prema engl. *Hairy/Enhancer of Split*) i HEY (prema engl. *Hairy/Enhancer of Split related to YRPW motif*), no postoje i brojni drugi geni (Myc, cyclin D1, Bcl-2, Gata3 i drugi), ovisno o vrsti ciljnih stanica, koji su regulirani signalnim putem Notch (70).

Opisani slijed događaja nazivamo kanonski signalni put Notch, međutim signalizacija putem receptora Notch može se odviti i drugim mehanizmima. Primjerice endocitoza receptora može osim razgradnje u lizosomu ili povratka na membranu stanice dovesti do cijepanja receptora u endosomu, bez prisustva liganda, uz otpuštanje domene NICD. Domena NICD osim vezanja na transkripcijski čimbenik Rbpjk može sudjelovati u signalizaciji putem signalnih puteva NF- $\kappa$ B, kompleks 2 ciljne molekule rapamicina u sisavaca (mTORC2, prema engl. mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 2), homolog fosfataze i tenzina (PTEN, prema engl. phosphatase and tensin homolog), Akt, Wnt, Hippo ili transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , prema engl. *transforming growth factor  $\beta$* ). Receptori Notch vezani na membranu mogu i bez cijepanja potaknuti signalizaciju putem PI3K-Akt, potaknuti apoptozu tumorskih stanica, a čak i sami ligandi bez međudjelovanja s receptorima mogu posredovati neke učinke (68).

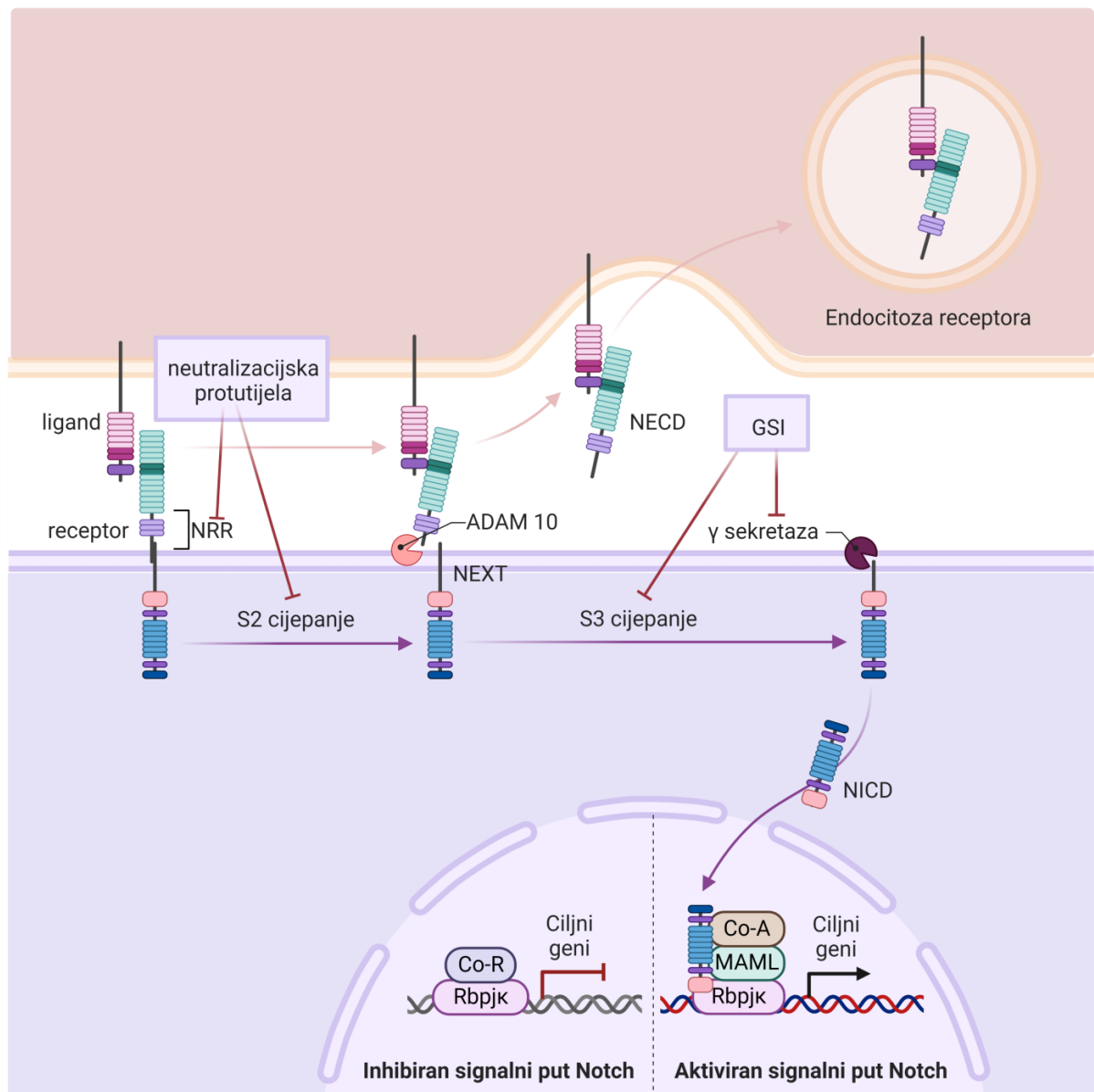
Signalni put Notch reguliran je među ostalim vremenskom i prostornom dostupnošću receptora i liganada u neposrednom okolišu, kao i posttranslacijskim modifikacijama te prometom receptora (66). Ubikvitinacija liganada, za razliku od ubikvitinacije receptora, potrebna je za aktivaciju signala jer stimulacija endocitoze liganda pomaže u konformacijskoj promjeni potrebnoj za otkrivanje S2 mjesta cijepanja (Slika 2). Interakcija među ligandima i receptorima susjednih stanica dovodi do aktivacije receptora (nazvana trans-aktivacija). Međutim interakcija liganda i receptora na istoj stanici može dovesti do tzv. cis-inhibicije ili cis-aktivacije (68). Sve navedeno upućuje na zaključak da je signalni put Notch vrlo kompleksan način međustanične signalizacije te djelomično objašnjava često kontradiktorne učinke signalizacije putem Notcha te razlike u rezultatima dobivene u uvjetima *in vivo* i *in vitro*. Također, učinci signalnog puta Notch mogu biti različiti ovisno o vrsti tkiva, aktivacijskom stupnju stanica te razvojnem stupnju organizma.

#### **1.5.1. Uloga signalnog puta Notch u razvoju i funkciji stanica**

Signalni put Notch važan je u razvoju gotovo svih organskih sustava i osim što usmjerava matične stanice u diferencijaciju prema zrelim oblicima, također može sudjelovati i u očuvanju nezrelih oblika, obnavljajući zalihu matičnih i progenitorskih stanica. Oscilirajuća aktivacija signalnog puta Notch važna je u somitogenezi i posljedično razvoju aksijalnog kostura. Nadalje, signalni put Notch važan je i za angiogenezu, za regulaciju grananja krvnih žila te diferencijaciju krvnih žila prema arterijama ili venama. U razvoju srca kontrolira proliferaciju srčanog mišića te razvoj endokarda i koronarnih krvnih žila. Slično kao za somitogenezu, Notch je važan u razvoj neuralnog grebena, diferencijaciju astrocita, grananje dendrita te održavanje i kontrolu neuralnih matičnih stanica (67).

U koštanom tkivu signalni put Notch je važan za regulaciju diferencijacije mezenhimskih matičnih stanica. Aktivacija signalnog puta Notch dovodi do inhibicije enhondralnog okoštavanja i diferencijacije osteoblasta, a pojačana signalizacija dovodi do osteopenije. S druge strane, inaktivacija signalnog puta Notch dovodi do povećanja volumena trabekularne kosti i pojačane diferencijacije osteoblasta (71, 72). Mutacije u ligandu JAG1 ili rjeđe receptoru Notch 2 uzrokuju sindrom *Alagille* koji je karakteriziran neispravnim stvaranjem jetrenih žučnih vodova i posljedičnom kolestatskom bolesti jetre kao i urođenim srčanim bolestima, najčešće tetralogijom *Fallot* ili stenozom plućne arterije. Za bolesnike su također karakteristični razvojni koštani defekti u vidu hemivertebrā, nedostatka sakruma i kraniofacijalne dismorfije. Mutacije u ligandu DLL3 dovode do spondilokostalne disostoze, karakterizirane poremećenom segmentacijom kralježaka i deformacijama rebara, dovodeći do patuljastog trupa (71).





**Slika 2. Shema signalnog puta Notch.** Prikazane su susjedne stanice koje međudjeluju ligandima (gornja stanica) i receptorima signalnog puta Notch (donja stanica). Prilikom vezanja liganda za receptor dolazi do konformacijske promjene receptora i otkrivanja S2 mjesta cijepanja na kojem djeluju metaloproteinaze ADAM10 ili ADAM17. Produkt S2-cijepanja je intermedijarni proizvod sastavljen od transmembranske domene i unutarstanične domene (NEXT) koji je supstrat S3-cijepanja posredovanog enzimom  $\gamma$ -sekretaza. Notch unutarstanična domena (NICD) se odvaja od ostatka receptora te odlazi u jezgu gdje zajedno s proteinima Rbpjk i MAML potiče transkripciju ciljnih gena. Cijepanje na S2 mjestu može se spriječiti neutralizacijskim protutijelima na negativnu regulacijsku regiju (NRR). Cijepanje na S3 mjestu može se spriječiti inhibitorima  $\gamma$ -sekretaza (GSI). NECD – Notch izvanstanična domena, Rbpjk – represor transkripcije ciljnih gena, MAML – Mastermind-like; Co-R – korepresori signalnog puta; Co-A – koaktivatori signalnog puta. Napravljeno koristeći BioRender.com

Za pravilnu hematopoezu važno je održavanje populacije hematopoetskih matičnih stanica. Aktivacija signalnog puta Notch u hematopoetskim matičnim stanicama i izražaj liganada signalnog puta Notch u hematopoetskoj niši dovodi do proliferacije matičnih stanica i njihovog pojačanog samoobnavljanja. Čini se da je aktivacija signalnog puta Notch važna u održavanju nezrelih pluripotentnih hematopoetskih stanica. Također signalizacija putem Notcha dovodi do preferencijalne diferencijacije u limfoidne u odnosu na mijeloidne stanice (73). S druge strane inaktivacija signalnog puta Notch dovodi do narušavanja procesa hematopoeze i razvoja mijelodisplastičnog sindroma (74).

Najbolje istražena uloga signalnog puta Notch u hematopoezi je ona u razvoju limfocita, posebice tijekom sazrijevanja limfocita T u timusu te tijekom razvoja limfocita B u marginalnoj zoni slezene. Utišavanje signala putem receptora Notch 1 ili utišavanje transkripcijskog čimbenika Rbpjk u progenitorima u koštanoj srži dovodi do potpunog zastoja u razvoju limfocita T uz nakupljanje ektopičnih limfocita B u timusu, dok pojačana signalizacija putem domene NICD dovodi do ektopičnog stvaranja limfocita T i zastoja u razvoju limfocita B. Miševi kojima je utišan gen za DLL1 ili Notch 2 imaju jako smanjen broj limfocita B marginalne zone, što je također utvrđeno u miševa s utišanim nizvodnim komponentama signalnog puta Notch (75). Osim uloge u razvoju limfocita, izražaj liganada signalnog puta Notch na antigen-predodnim stanicama regulira usmjeravanje pomagačkih limfocita T (Th, prema engl. *helper*), primjerice diferencijaciju u podvrstu limfocita Th2, odnosno funkciju podvrste limfocita Th1. Daljnjim istraživanjima potvrđena je uloga liganda DLL u diferencijaciji limfocita Th1 te nužnost kanonskog signalnog puta Notch putem liganda JAG za diferencijaciju limfocita Th2 (76, 77). Signalni put Notch također igra ulogu u razvoju i funkciji nekih subpopulacija urođenih limfoidnih stanica (78).

Uloga signalnog puta Notch u razvoju i funkciji mijeloidnih stanica manje je poznata, a rezultati istraživanja često su kontradiktorni. Makrofagi izražavaju receptore i ligande signalnog puta Notch. Tijekom upale i infekcije pokazalo se da signalizacija putem sustava Notch ima ulogu u njihovoj polarizaciji i funkciji (79). Nekoliko istraživanja pokazalo je da aktivacija signalnog puta Notch pojačava M1-polarizaciju, a *in vivo* i *in vitro* utišavanje smanjuje upalni odgovor (79, 80). Suprotno tome, postoje dokazi da signalizacija putem transkripcijskog čimbenika Rbpjk usmjerava makrofage u M2 podvrstu, a pojačana aktivnost domena NICD1 i NICD2 smanjuje upalni odgovor (81). U zadnje je vrijeme sve više dokaza o važnosti signalnog puta Notch u regulaciji diferencijacije i funkcije dendritičnih stanica, no s obzirom na broj različitih subpopulacija koje mogu različito odgovarati na signalizaciju putem Notcha, priroda regulacije

nije do kraja razjašnjena (82). Poticanje klasičnih dendritičnih stanica ligandom DLL1 pojačalo je njihovo stvaranje in vitro i sposobnost križnog predočivanja dok je utišavanje receptora Notch 2 ili transkripcijskog čimbenika Rbpjk narušilo njihovu diferencijaciju, migraciju i križno predočivanje antigena (83, 84).

### **1.5.2. Uloga signalnog puta Notch u stanicama osteoklastne loze**

Dosadašnja istraživanja uloge signalnog puta Notch u osteoklastnoj liniji pokazala su se dosta kontroverznima jer je, s jedne strane, potvrđeno da signalni put Notch inhibira osteoklastogenezu (85-89), a s druge strane da potiče osteoklastogenezu (87, 88, 90-92). Bai i suradnici su pokazali da stimulacija ligandom JAG1 inhibira osteoklastogenezu, dok utišavanje gena za receptore Notch 1, Notch 2 i Notch 3 u mijeloidnoj lozi pojačava stvaranje osteoklasta (86). Inhibiciju osteoklastogeneze putem signala Notch utvrdili su i Yamada i suradnici stimulacijom ligandom DLL1 (85). Signalni put Notch igra i važnu ulogu u osteoklastogenezi i preko regulacije izražaja osteoklastogenih čimbenika u osteoblastima i stromalnim stanicama u koštanoj srži. Pojačan izražaj aktiviranog receptora Notch 1 u stromalnim stanicama istovremeno pojačava izražaj čimbenika RANKL i OPG, smanjuje izražaj čimbenika M-CSF i djeluje inhibicijski na osteoklastogenezu, dok utišavanje receptora Notch 1 u osteoblastima smanjuje omjer izražaja OPG/RANKL i time potiče sazrijevanje osteoklasta (85, 86). Sekine i suradnici su utvrdili da međudjelovanje liganda JAG1 i receptora Notch 1 inhibira, a međudjelovanje liganda DLL1 i receptora Notch 2 pojačava osteoklastogenezu (87). S druge strane, Fukushima i suradnici su utvrdili da međudjelovanje liganda JAG1 i receptora Notch 2 potiče stvaranje osteoklasta (90). Utišavanje signalnog puta Notch u mijeloidnoj lozi smanjuje aktivnost osteoklasta, uz očuvanu funkciju stimulacije osteoblasta prema istraživanju Goel i suradnika (92).

Dva istraživanja u modelima artritisa pokazala su suprotne uloge signalnog puta Notch. U jednom istraživanju aktivacija transkripcijskog čimbenika Rbpjk u osteoklastnim progenitorima smanjila je upalnu osteoklastogenezu i osteoresorpciju, dok su u drugom istraživanju pokazali da inhibicija signalizacije putem liganda DLL1 smanjuje koštanu razgradnju i broj osteoklasta u mišjim modelima artritisa (87, 89). Malo jasniju sliku o tome zašto se rezultati istraživanja toliko međusobno razlikuju dali su Ashley i suradnici, pokazavši da signalni put Notch potiče zrelije osteoklastne progenitore (prethodno potaknute čimbenikom RANKL), a koči nezrelije oblike osteoklastnih progenitora (88). S obzirom na navedeno, potrebno je jasnije istražiti učinak signalnog puta Notch na osteoklastogenezu i koštano

razaranje u *in vivo* modelima artritisa s pojačanom koštanom razgradnjom uzrokovanom upalom.

## 1.6. Mišji modeli reumatoidnog artritisa

Modeli reumatoidnog artritisa razvijeni su u mnogim životinjskim vrstama, ali najčešće se koriste u miševa i štakora. Niti jedan životinjski model ne opisuje potpuno kompleksnost bolesti u ljudi tako da se odabir modela temelji na istraživačkom pitanju. Modele možemo općenito podijeliti na genetske i inducirane, a glavna je razlika to što u genetskim modelima miševi spontano razvijaju artritis. Jedan od genetskih modela su miševi K/BxN s autoreaktivnim limfocitima T koji razvijaju imunosnu reakciju na enzim glukoza-6-fosfataza izomeraza (G6PI, prema engl. *glucose-6-phosphatase isomerase*) i spontano razvijaju jaki simetrični artritis u ranoj dobi (93). Nadalje, u modelu ljudskog TNF- $\alpha$  gena, miševi izražavaju ljudski TNF- $\alpha$  i razvijaju artritis koji je po mnogim značajkama sličan reumatoidnom artritisu u ljudi, primjerice razvija se hiperplazija sinovije, oštećenje hrskavice i razaranje kosti (94). Miševi SKG iz *Sakaguchi* laboratorija imaju mutaciju u domeni SH2 molekule ZAP-70, a osim artritisa razvijaju i pneumonitis i dermatitis. Također u tih miševa nalazimo autoprotutijela kao što su RF ili protutijela na kolagen tipa II (95). Miševi s mutacijom u antagonistu receptora za IL-1 (IL-1RA<sup>-/-</sup>) razvijaju poliartritis uz prisutnost protutijela na kolagen tipa II, dvostruku uzvojniciu DNA te RF izotipa IgG (96).

Osim genetskih, postoje i brojni inducibilni modeli koje možemo podijeliti na tri glavne skupine s obzirom na način imunizacije: modeli aktivne imunizacije, modeli pasivne imunizacije i modeli indukcije kemijskim iritansom koji dovodi do kronične upale (97). Klasični primjer modela potaknutog aktivnom imunizacijom je artritis potaknut kolagenom (CIA, prema engl. *collagen induced arthritis*), a toj skupini pripadaju još i artritis potaknut antigenom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*), artritis potaknut proteoglikanom, artritis potaknut enzimom G6PI i drugi (97). Tijekom razvoja CIA, kao i drugih oblika artritisa, razvijaju se aritrogena autoprotutijela koja se mogu prenijeti u drugu životinju i potaknuti razvoj artritisa, što je osnova modela koji koriste pasivnu imunizaciju. Primjer je artritis potaknut protutijelima na kolagen (CAIA, prema engl. *collagen antibody induced arthritis*), koji se može potaknuti prijenosom seruma miševa s razvijenim modelom CIA, seruma bolesnika s reumatoidnim artritisom ili komercijalnih mješavina protutijela na različite epitope kolagena tipa II (98). Prednost u odnosu na model CIA je što se artritis može izazvati i u mišjih sojeva koji nisu genetski podložni njegovom razvoju. Također, u odnosu na model CIA razvoj artritisa je brži i vremenski usklađeniji među jedinkama, a mjesec dana nakon indukcije artritisa dolazi do spontane

remisije bolesti. Razvoj artritisa u modelu CAIA je neovisan o limfocitima B i limfocitima T te stoga ne prikazuje vjerno složenost imunodne reakcije i remodeliranja tkiva koje se događa u reumatoidnom artritisu. Još jedan poznati model potaknut pasivnom imunizacijom je model prijenosa seruma miševa K/BxN, u kojih se spontano razvijaju aritrogena protutijela na enzim G6PI. Razvoj artritisa u tom modelu je vrlo brz i ovisno o količini prenesenih protutijela, postiže vrhunac 7-14 dana nakon indukcije te se spontano smiruje do 21 dan nakon indukcije, iako ankiloza može perzistirati (99). Konačno, mnogi modeli, kao i CIA, koriste mehanizam da uljni adjuvansi potiču kroničnu upalu i poliartritis. Jedan klasični model izazvan proupalnim tvarima je artritis potaknut adjuvansom, prvo razvijen u štakora, ali se koristi i u miševa te se potiče intradermalnom injekcijom kompletnog *Freundovog* adjuvansa (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*) (100). Artritis potaknut pristanom, zasićenim alkanom, primjer je kemijskog spoja koji sam po sebi izaziva artritis u kontekstu kronične upale (101).

Najčešće korišteni mišji model reumatoidnog artritisa je model CIA, koji smo i mi koristili u istraživanju. Model CIA dijeli mnoge značajke s reumatoidnim artritisom uključujući i prisutnost protutijela ACPA ili RF. U modelu CIA dolazi do razvoja poliartritisa prednjih i stražnjih šapa koji se očituju otečenosti, crvenilom i boli s postupnim razvojem ukočenosti i deformacija. Patohistološki nalaz u miševa također odgovara reumatoidnom artritisu uz razvoj sinovitisa i osteitisa. Nastupa i progresivno oštećenje hrskavice i razaranje kosti (53, 102), što ga čini dobrim mišjim modelom ljudske bolesti. Za imunizaciju koristi se kolagen tipa II s obzirom na to da čini većinu kolagena u zgloboj hrskavici, a protutijela na kolagen tipa II mogu se naći i u nekih bolesnika s reumatoidnim artritisom. Artritis se potiče intradermalnom injekcijom kolagena tipa II u CFA, koji sadrži mineralna ulja, emulgator i oslabljenu *Mycobacterium tuberculosis* (103). Nakon 14 do 21 dan, miševi se drugi put imuniziraju istom količinom kolagena u *Freundovom* adjuvansu bez antigena *M. tuberculosis* (IFA, prema engl. *incomplete Freund's adjuvant*).

Razvoj CIA ovisan je o haplotipu MHC-II miša (H-2, prema engl. *histocompatibility*) te se podložnost razvoju artritisa razlikuje od soja do soja. Miševi haplotipa H-2(q) su izuzetno podložni razvoju CIA, stoga su miševi soja DBA-1 tradicionalno korišteni za taj model artritisa, dok su se miševi haplotipa H-2(b) smatrali rezistentnima (104). Međutim, većina transgeničnih miševa temeljnog su soja C57BL/6 (haplotip H-2(b)), stoga je za proučavanje utjecaja genetskih čimbenika na razvoj i tijek artritisa bilo potrebno željeni transgenični soj razviti u miševa DBA-1, što se pokazalo vremenski i tehnički zahtjevno. Potaknuti time, istraživači su utvrdili da se i u miševa soja C57BL/6 može razviti model CIA, ali uz modifikaciju protokola indukcije (105,

106). Miševi soja DBA-1 razvijaju artritis nakon imunizacije kolagenom tipa II različitog podrijetla, dok je u miševa soja C57BL/6 imunogeničan samo pileći kolagen (107). Nadalje, u miševa soja C57BL/6 potrebna je dvostruko veća količina kolagena i mikobakterije u adjuvansu nego u miševa soja DBA-1. Artritis je u miševa soja C57BL/6 blažeg intenziteta i kroničnijeg tijeka u usporedbi s miševima soja DBA-1, kod kojih ranije nastupa vrhunac incidencije. U miševa soja DBA-1 otekline šapa je intenzivnija, no ranije dolazi do rezolucije bolesti. Incidencija artritisa u miševa soja DBA-1 je vrlo visoka (80-100%) dok je maksimalna incidencija u miševa soja C57BL/6 oko 60% (106, 107). U skladu s time, simetričnost artritisa je veća u miševa soja DBA-1.

### 1.7. Transgenični mišji modeli

U istraživanju biološke uloge pojedinih tkivnih bjelančevina veliku ulogu igraju genetska istraživanja. Mogućnost genetske manipulacije u stanicama i cijelim organizmima, posebice u sisavaca, donijela je revoluciju istraživanjima u biomedicini. Glodavci, prije svega miševi, najčešće su korištene laboratorijske životinje. Prvi miš s izbačenim genom (*knock-out*) napravljen je 1989. godine, a danas osim klasičnih miševa s izbačenim ili ubačenim genom (*knock-out* i *knock-in*) kod kojih je gen modificiran u svim stanicama od embrionalnog razvoja nadalje, imamo i sustave tkivne i vremenske regulacije izražaja transgena (108).

Jedna od češće upotrebljivanih metoda ciljane genske manipulacije je stvaranje kondicionalnih transgeničnih miševa pomoću sustava Cre/*loxP*, koji nam omogućava tkivnu, odnosno staničnu regulaciju izražaja određenog gena ili njegovo izbacivanje (109). Metoda se zasniva na rekombinazi Cre, prvotno izoliranoj iz bakteriofaga, koja reže molekule DNA na točno specifičnim mjestima, označenim tzv. sekvencama *loxP* (prema engl. *locus of x-over, P1*) (110). Izražaj rekombinaze Cre vezan je za izražaj tkivno-specifičnog promotora, što znači da kada stanica počne izražavati određeni gen (odnosno aktivira promotor toga gena), počinje izražavati i rekombinazu Cre, te dolazi do delecije ili inverzije dijela DNA koji se nalazi između sekvencu *loxP*, ovisno o njihovoj orijentaciji. Istraživanjima praćenja potomstva manipuliranih stanica pokazano je da s obzirom na to da je aktivacija rekombinaze Cre ireverzibilna, izražaj reporterskog proteina nije ograničen na stanice koje trenutno izražavaju rekombinazu, već je dovoljno da su je izražavale u jednom trenutku tijekom razvoja. Također su označene stanice nastale iz stanica u kojima je bila izražena rekombinaza Cre (stanice kćeri) (111). Prednost sustava Cre/*loxP* je fleksibilnost, jer se različite mišje linije koje izražavaju rekombinazu Cre vezanu uz željeni promotor mogu križati s različitim mišjim linijama koje imaju dio DNA od

interesa omeđen sekvencama *loxP*. Korak dalje je i vremenski reguliran izražaj rekombinaze Cre, a u tom slučaju govorimo o inducibilnim transgeničnim modelima. To je postignuto stvaranjem rekombinaze Cre vezane za modificirani estrogenski receptor (ER). Receptori za sve steroidne hormone nalaze se u citoplazmi te vezanjem hormona dolazi do premještanja kompleksa u jezgru, gdje hormon posreduje prepisivanje ciljnih gena. U slučaju rekombinaze CreER, dodavanjem tamoksifena, selektivnog modulatora estrogenskih receptora, rekombinaza koja se nalazi u citoplazmi ciljnih stanica premješta se u jezgru i dolazi do rekombinacije na sekvencama *loxP* (108).

Brojne linije miševa Cre razvijene su u svrhu modulacije gena u koštanom tkivu, uključujući osteoblastnu i osteoklastnu lozu. Postoji više Cre-linija koji ciljaju osteoblaste, osteocite i osteoklaste te njihove progenitore. Za ciljanje zrelih osteoklasta korištene su linije katepsin K-Cre (*Ctsk*-Cre) i TRAP-Cre (111, 112). Jedna od češće korištenih Cre-linija u ciljanju osteoklastnih progenitora je mišja linija lizozim M (*LysM*)-Cre koja cilja stanice mijeloidne loze. Za označavanje osteoklastnih progenitora razvijene su i linija RANK-Cre i linija *Csf1r*-iCRE za konstitucijski izražaj rekombinaze Cre, kao i linija *Csf1r*-Mer-iCre-Mer za inducibilnu Cre-rekombinaciju (111). Kemokinski receptor CX3CR1 pokazao se kao dobar biljeg cirkulirajućih mišjih monocita, a izražava ga većina osteoklastnih progenitora u medularnim i u ekstramedularnim tkivima (52, 63). Stoga su razvijene Cre-linije za konstitutivni i inducibilni izražaj rekombinaze Cre u stanicama s aktivnim promotorom za gen CX3CR1. Te su se linije pokazale dobre u ciljanju osteoklastnih progenitora iz koštane srži kao i perifernih osteoklastnih progenitora, posebice u upalnim stanjima (51, 63, 64, 113, 114). Razvoj takvih linija omogućuje nam ciljanu manipulaciju izražaja gena te utvrđivanje njihove uloge u diferencijaciji osteoklasta različitog podrijetla u fiziološkim i patološkim stanjima.

## **2. Hipoteza**

Signalni put Notch posreduje aktivaciju, migraciju i diferencijaciju osteoklastnih progenitora u mišjem modelu reumatoidnoga artritisa, pa se inhibicijom signalnog puta Notch smanjuje aktivnost osteoklastnih progenitora i koštana resorpcija te time ublažava tijek reumatoidnoga artritisa.



### 3. Ciljevi rada

Opći cilj rada je ispitati izražaj komponenta signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima u mišjem modelu reumatoidnoga artritisa te utvrditi koći li inhibicija signalnog puta Notch pojačanu koštanu resorpciju u sklopu artritisa.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. Odrediti izražaj receptora i liganada signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima i koštanom tkivu te specifične promjene njihova izražaja u mišjem modelu artritisa potaknutog kolagenom.
2. Analizirati učinak stimulacije ligandima signalnog puta Notch na diferencijaciju osteoklasta *in vitro* te potvrditi aktivaciju transkripcijskih ciljeva signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima.
3. Ispitati učinak inhibicije signalnog puta Notch neutralizacijskim protutijelima na diferencijaciju osteoklastnih progenitora i aktivnost osteoklasta u mišjem modelu artritisa potaknutog kolagenom *in vitro* i *in vivo*.
4. Uspostaviti transgeničnu mišju liniju u kojoj je utišan signalni put Notch aktivacijom rekombinaze Cre i delecijom transkripcijskog čimbenika Rbpjk (RBP-J) u osteoklastnim progenitorima koji izražavaju kemokinski receptor CX3CR1.
5. Analizirati učinke utišavanja signalnog puta Notch na aktivnost osteoklasta i intenzitet koštane resorpcije izazivanjem artritisa u mišjoj liniji u kojoj je inaktiviran gen za Rbpjk (RBP-J) u osteoklastnim progenitorima (CX3CR1CreERT2/RBP-J).

## 4. Materijali i metode

Pokusi u okviru ovog doktorskog rada su napravljeni u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Snimanje kostiju mikro-kompjutoriziranom tomografijom ( $\mu$ CT, prema engl. *microcomputed tomography*) napravljeno je u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### 4.1. Plan istraživanja

Istraživanje je podijeljeno u tri faze koje su sažeto prikazane na Slici 3. U istraživanju je kao model mišjeg artritisa korišten model CIA. Ukratko, miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II (CII) u emulziji s CFA, dok je za sekundarnu imunizaciju korištena emulzija CII u IFA. Vizualno smo pratili pojavu artritisa i intenzitet bolesti. Miševi su žrtvovani 35-45 dana nakon primarne imunizacije kada očekujemo vrhunac incidencije bolesti.

U prvoj fazi istraživanja koristili smo mišji soj C57BL/6 te smo analizirali promjenu komponenata signalnog puta Notch izazvanu artritismom. Kao kontrolu miševima s artritismom koristili smo neimunizirane miševe. Suspenzije koštane srži, slezene i leukocita periferne krvi analizirali smo protočnom citometrijom, te je utvrđen fenotip osteoklastnih progenitora te njihov izražaj kemokinskih receptora i receptora signalnog puta Notch. Izražaj komponenata signalnog puta Notch potvrdili smo i imunohistokemijskim bojanjem na histološkim rezovima stražnjih šapa. Osteoklastne progenitore iz suspenzija periartikularne koštane srži i slezene razvrstali smo te iz njih izolirali RNA i na razini genske ekspresije potvrdili izražaj receptora, kao i liganada te transkripcijskih ciljeva signalnog puta Notch. Sposobnost osteoklastogeneze potvrdili smo uzgojem osteoklastnih progenitora u staničnoj kulturi, a citokemijskim bojanjem na TRAP te uzgojem na koštanim pločicama potvrdili smo funkcijsku sposobnost nastalih osteoklasta. Analizirali smo i gensku ekspresiju kultiviranih preosteoklasta te utvrdili dinamiku promjene komponenata signalnog puta Notch.

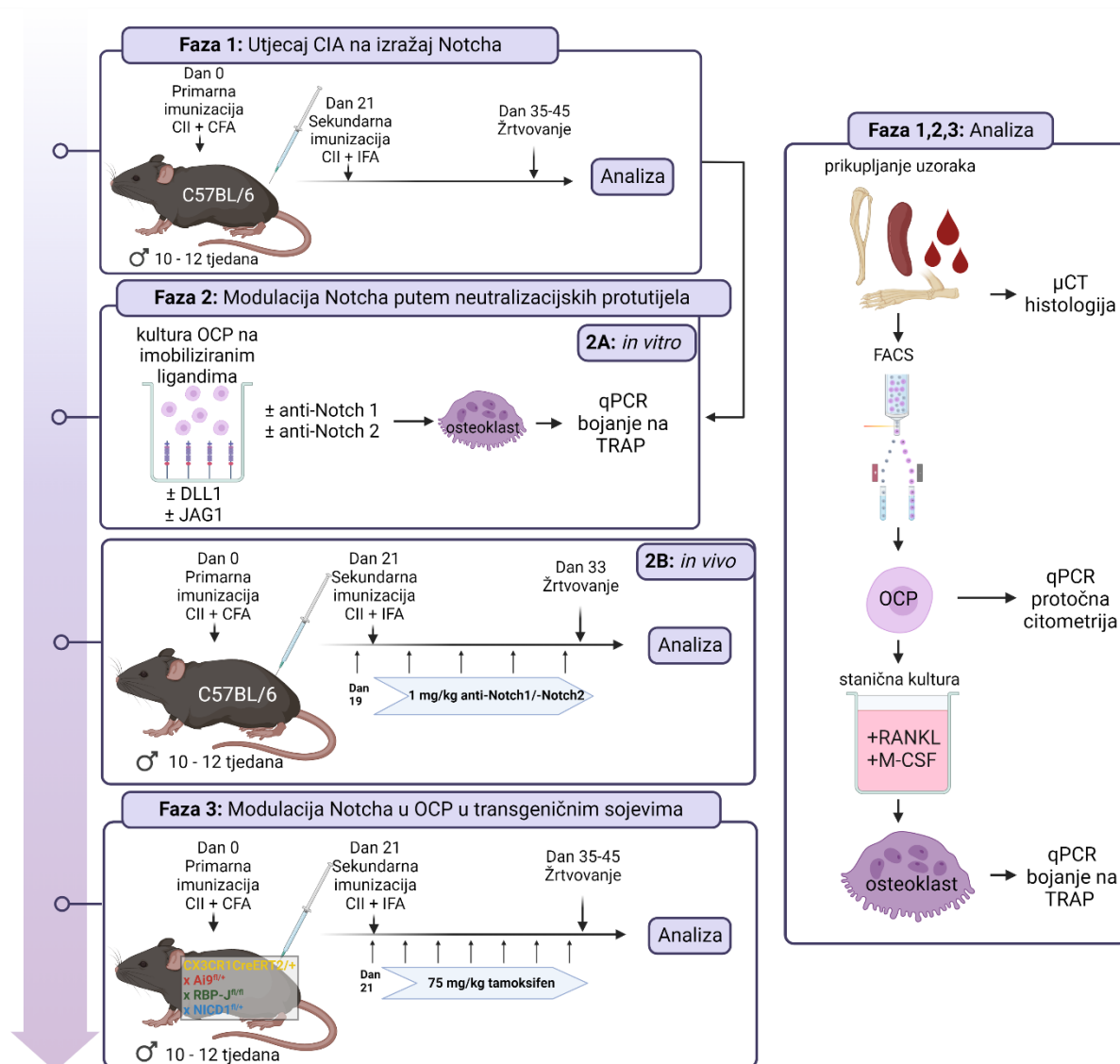
U drugoj fazi istraživanja, razvrstali smo osteoklastne progenitore iz imuniziranih i neimuniziranih miševa soja C57BL/6 te ih zasadili u zdence obložene imobiliziranim ligandima signalnog puta Notch. Utjecaj poticanja signalnog puta na diferencijaciju osteoklasta provjerili smo citokemijskim bojanjem osteoklastnih kultura i analizom genske ekspresije preosteoklasta. Zatim smo ispitali učinak inhibicije signalnog puta Notch na diferencijaciju osteoklasta dodavanjem neutralizacijskih protutijela na receptore Notch 1 i Notch 2 u staničnu kulturu.

Nadalje smo istražili učinak obrade imuniziranih miševa neutralizacijskim protutijelima *in vivo*. Kao kontrolu koristili smo imunizirane miševe obrađene kontrolnim nespecifičnim protutijelima istoga izotipa. Uz analizu suspenzija tkiva protočnom citometrijom, analizu izražaja gena i diferencijaciju osteoklastnih progenitora u kulturi stanica, koštanu resorpciju utvrdili smo analizom kostiju stražnjih šapa snimanjem postupkom  $\mu$ CT. Kao molekularni biljeg koštane resorpcije, odredili smo koncentraciju C-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (CTX-I, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*) u serumu imunoenzimskom metodom (ELISA, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*).

U trećoj fazi istraživanja optimizirali smo uzgoj transgeničnih miševa CX3CR1CreERT2/RBP-J koji inducibilno izražavaju rekombinazu Cre u stanicama CX3CR1<sup>+</sup>, što rezultira utišavanjem kanonskog signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima. Upotrebom miševa CX3CR1CreERT2/Ai9, u kojima smo vizualizacijom fluorescentnog biljega mogli pratiti stanice CX3CR1<sup>+</sup>, uspostavili smo odgovarajući protokol obrade tamoksifenom. Također smo utvrdili fenotip označenih stanica te potvrdili njihovu sposobnost stvaranja funkcionalnih osteoklasta. Temeljem toga, u soju CX3CR1CreERT2/RBP-J smo ranije navedenim metodama analizirali učinak genetski inhibiranog signalnog puta Notch na migraciju, diferencijaciju i aktivnost osteoklasta *in vivo* i koštanu resorpciju. Također smo u setu pokusa analizirali učinak utišanog signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima na diferencijaciju osteoblasta *in vitro*. Za dodatnu potvrdu uloge signalnog puta Notch koristili smo miševe soja CX3CR1CreERT2/NICD1 koji imaju pojačan izražaj unutarstanične podjedinice receptora Notch 1, što dovodi do pojačane aktivnosti nizvodno od receptora.

## 4.2. Pokusne životinje

Postupci na životinjama planirani su i provedeni u skladu s načelima dobre prakse u postupanju s pokusnim životinjama te slijedeći pravila „3R“ (prema engl. *replacement, reduction, refinement* – zamjena modela, smanjenje broja životinja, prilagodba modela). Sve postupke na životinjama odobrilo je Etičko povjerenstvo Ministarstva poljoprivrede te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Notch signalni put u osteoklastnim progenitorima potaknutim reumatoidnim artritisom“ voditeljice prof. dr. sc. Danke Grčević, a postupke su provodili za to osposobljeni istraživači. U pokusima su korišteni mužjaci mišjih sojeva C57BL/6, CX3CR1CreERT2/RBP-J, CX3CR1CreERT2/NICD1 i CX3CR1CreERT2/Ai9 u dobi od 10-12 tjedana.



**Slika 3. Shematski prikaz plana istraživanja.** Istraživanje je podijeljeno u tri faze koje su sažeto prikazane na slici. U prvoj fazi izazvali smo artritis miševima C57BL/6 soja imunizacijom pilećim kolagenom tipa II (CII) u kompletnom Freundovom adjuvansu (CFA), dok je za sekundarnu imunizaciju CFA zamijenjen inkompletnim Freundovim adjuvansom (IFA). Miševi su žrtvovani 35-45 dana nakon primarne imunizacije, a uzeta tkiva su analizirana na izražaj komponenata signalnog puta Notch na razini gena i na razini bjelančevina, te su utvrđene razlike između neimuniziranih i imuniziranih miševa. U drugoj fazi razvrstani su osteoklastni progenitori (OCP) i zasađeni u osteoklastogene kulture na imobiliziranim ligandima signalnog puta Notch (DLL1, JAG1) bez ili uz dodatak neutralizacijskih protutijela na receptore Notch 1 ili Notch 2. Zatim je učinak protutijela na intenzitet artritisa i koštanu resorpciju ispitan *in vivo* obradom neutralizacijskim protutijelima u odnosu na skupinu imuniziranih miševa koji su primali kontrolna protutijela. U zadnjoj fazi istraživanja, koristili smo nekoliko dvostruko transgeničnih mišjih sojeva. Soj CX3CR1CreERT2/Ai9 omogućio je vizualno praćenje stanica koje su aktivirale Cre rekombinazu. Upotrebom soja CX3CR1CreERT2/RBP-J ispitali smo učinak utišanog signalnog puta Notch u OCP na razvoj artritisa i koštanu resorpciju. U zadnjem setu pokusa koristili smo soj CX3CR1CreERT2/NICD1 u kojem je u OCP pojačan signal putem receptora Notch 1. μCT – mikrokompjutorizirana tomografija; qPCR – kvantitativna reakcija lančane polimeraze; TRAP – kisela fosfataza otporna na tartarat. Napravljeno koristeći BioRender.com

Pokusne životinje uzgojene su u nastambi za laboratorijske životinje Hrvatskog instituta za istraživanje mozga u standardnim uvjetima uz dnevnu regulaciju ciklusa svjetla (10 sati svjetla i 14 sati tame), temperature prostorije (20-24°C) i vlažnosti zraka (55% ± 10%), sterilnosti kaveza i stelje te slobodan pristup standardnoj peletiranoj prehrani (4RF25 i 4RF21; Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija) i vodi.

#### 4.3. Uzgoj i križanje transgeničnih životinja

Kako bismo uzgojili miševe kojima možemo utišati nizvodnu signalizaciju kanonskog puta Notch u osteoklastnim progenitorima, križali smo miševe CX3CR1CreERT2 (B6.129P2(C)-Cx3cr1<sup>tm2.1(cre/ERT2)Jung/J</sup> dostupni u *Jackson Laboratory*, broj soja 020940) s miševima RBP-J (Rbpj<sup>tm1Hon</sup>, darovao profesor Tasuku Honjo, Sveučilište u Kyoto-u). Miševi CX3CR1CreERT2 izražavaju rekombinazu Cre pod kontrolom promotora za kemokinski receptor CX3CR1. Rekombinaza Cre je vezana za modificirani estrogenski receptor te se pod djelovanjem tamoksifena premješta u jezgru gdje posreduje izrezivanje odsječaka DNA označenih sekvencama *loxP*. Receptor CX3CR1 izražavaju većinom monociti, a izražen je na većini osteoklastnih progenitora, što ga čini dobrim biljekom tih stanica (52, 63, 114). Miševi RBP-J imaju sekvencama *loxP* označen gen *Rbpjk*. Križanjem ta dva soja dobijemo heterozigote za oba transgena, te ih ponovo križamo s miševima RBP-J da bismo dobili Cre<sup>+</sup> i Cre<sup>-</sup> miševe koji su homozigotni za RBP-J. Kako bismo uzgojili miševe koji u osteoklastnim progenitorima imaju pojačanu signalizaciju putem receptora Notch 1, križali smo miševe CX3CR1CreERT2 s miševima NICD1 (Gt(ROSA)26<sup>Sortm1(Notch1)Dam/J</sup> dostupni u *Jackson Laboratory*, broj soja 008159). Kako bismo uzgojili miševe koji imaju inducibilni izražaj fluorescentnog proteina TdTomato u osteoklastnim progenitorima, križali smo miševe CX3CR1CreERT2 s reporterskim miševima Ai9 (B6.Cg-Gt(ROSA)26<sup>Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J</sup> dostupni u *Jackson Laboratory*, broj soja 007909), u kojima genu za fluorescentni protein prethodi sekvencama *loxP* označen STOP-kodon. Križanjem soja CX3CR1CreERT2 sa sojem NICD1 ili Ai9 dobivamo heterozigotne miševe za oba transgena koje koristimo u pokusima. Svi korišteni transgenični sojevi su temeljnog soja C57BL/6.

#### 4.4. Genotipizacija transgeničnih životinja

Za potvrdu uspješnog križanja transgeničnih mišjih sojeva te određivanje genotipa miševa, koristili smo metodu lančane reakcije polimeraze (PCR, prema engl. *polymerase chain reaction*) i gel elektroforezu nastalih produkata. DNA je izolirana iz vrhova mišjih repova

dodatkom 450  $\mu$ L otopine pufera i proteinaze K koji su inkubirani preko noći na 56 °C. Uzorci su potom centrifugirani 20 minuta na 14000 okretaja u minuti (rpm, prema engl. *revolutions per minute*) na sobnoj temperaturi te je nadtalog prebačen u novu tubicu. Nadtalogu je zatim dodano 500  $\mu$ L izopropanola te su uzorci promiješani do vizualizacije mrežice DNA. Uzorci su centrifugirani 5 minuta na 14000 rpm na sobnoj temperaturi te je nadtalog odliven. U tubice je dodano 800  $\mu$ L 70% etanola te su uzorci ponovno centrifugirani 2 minute na 14000 rpm na sobnoj temperaturi. Nakon odlijevanja nadtaloga uzorci su sušeni na 37°C tijekom 90 min. DNA je zatim otopljena u 150  $\mu$ L destilirane vode. Za umnožavanje DNA korištena je komercijalno dostupna Taq DNA polimeraza i odgovarajući puferi, uz dodatak odgovarajućih početnica (Tablica 1). Za reakciju umnožavanja DNA koristili smo uređaj 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), a temperature i broj ciklusa prilagodili smo korištenim početnicama i očekivanom produktu reakcije. Za razdvajanje produkata po veličini koristili smo uređaj za elektroforezu Biometra Compact XS/S (Analytik Jena, Jena, Njemačka), na 1,5 – 1,8 % agaroznom gelu u puferu koji sadrži Tris bazu, bornu kiselinu i etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA, prema engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) uz dodatak boje koja se veže za DNA. Za vizualizaciju produkata PCR-a, gel smo izložili UV svjetlu te fotodokumentirali rezultate.

**Tablica 1. Popis početnica korištenih za genotipizaciju transgeničnih mišjih sojeva.** Navedeni su sljedovi nukleotida početnica koje su korištene za određivanje genotipa pojedinih transgeničnih mišjih sojeva

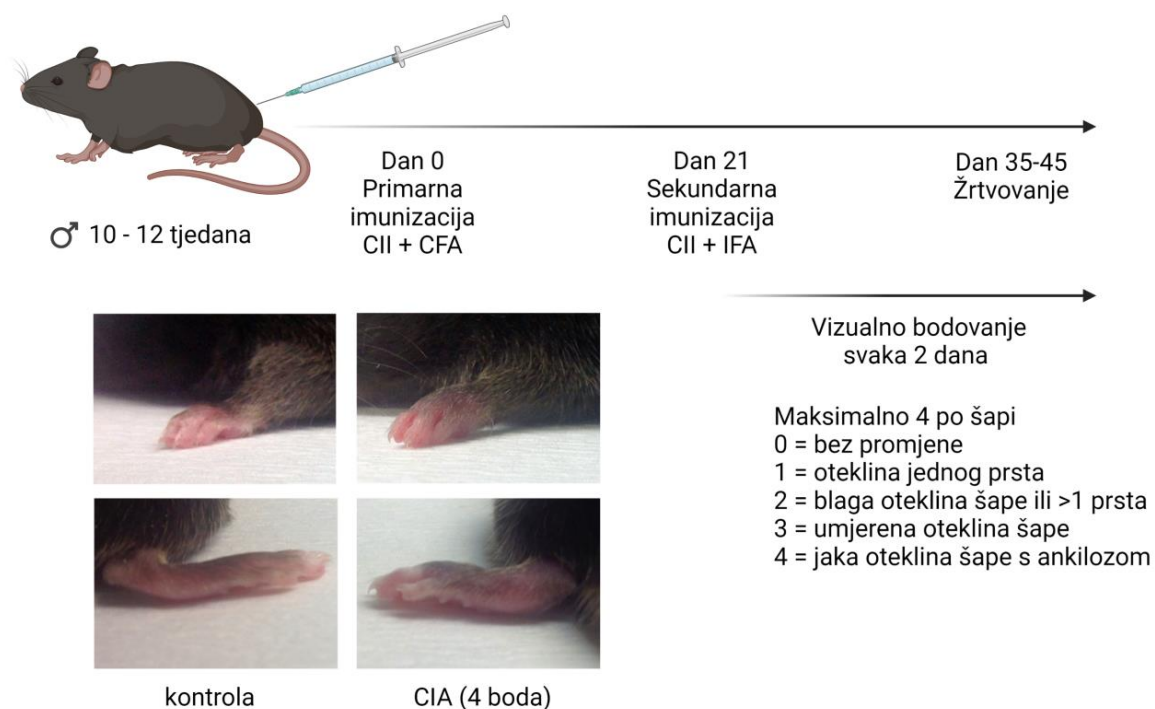
| Mišji soj     | Početnica 1                            | Početnica 2                              | Početnica 3                           | Početnica 4                    |
|---------------|----------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|
| CX3CR1CreERT2 | 5'-<br>CCTCTAAGACTCACG<br>TGGACCTG-3'  | 5'-<br>GACTTCCGAGTTGCG<br>GAGCAC-3'      | 5'-<br>GCCGCCCACGACCGG<br>CAAAC-3'    |                                |
| Ai9           | 5'-<br>CTGTTCTGTACGGC<br>ATGG-3'       | 5'-<br>AAGGGAGCTGCAGTG<br>GAGTA-3'       | 5'-GGCATTAAAGCAG<br>CGTATCC-3'        | 5'-CCGAAAATCTGTG<br>GGAAGTC-3' |
| RBP-J         | 5'-<br>GTTCTTAACCTGTTG<br>GTCGGAACC-3' | 5'-<br>GCTTGAGGCTTGATG<br>TTCTGTATTGC-3' | 5'-<br>GCAATCCATCTTGTT<br>CAATGGCC-3' |                                |
| NICD1         | 5'-<br>AAAGTCGCTCTGAGT<br>TGTTAT-3'    | 5'-<br>GCCAAGAGTTTGTCC<br>TCAACC-3'      | 5'-<br>GGAGCGGGAGAAAT<br>GGATATG-3'   |                                |

#### 4.5. Izazivanje artritisa potaknutog kolagenom

Artritis smo izazvali prema modificiranim protokolima opisanim u istraživanjima Brand i sur. i Inglis i sur. (103, 106). Za primarnu imunizaciju koristili smo emulziju otopine CII (Sigma Aldrich) koncentracije 4 mg/mL u 10 mM octenoj kiselini i CFA (BD Biosciences) s 4 mg/mL termički inaktivirane *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (BD Biosciences). Konačne koncentracije CII i *Mycobacterium tuberculosis* bile su 2 mg/mL. Za sekundarnu imunizaciju na jednak je način pripremljena emulzija CII i IFA (BD Biosciences). Miševe u dobi 10-12 tjedana anestezirali smo intraperitonealnom primjenom otopine 87,5 mg/kg ketamina i 12,5 mg/kg ksilazina (5 µL otopine po gramu miša), te obrijali u području korijena repa s dorzalne strane. Nakon dezinfekcije ubodnog mjesta 70% etanolom, injicirali smo ukupno 100 µL emulzije CII i CFA intradermalno podijeljeno u tri uboda obostrano uz korijen repa. Sekundarna imunizacija provedena je 21 dan nakon primarne, injekcijom emulzije ukupno 100 µL CII i IFA distalno od primarnog ubodnog mjesta. S kontrolnom skupinom postupali smo na isti način, ali bez davanja adjuvansa i kolagena. Pojavu kliničkih znakova artritisa pratili smo u dvodnevnom razmaku počevši od sekundarne imunizacije do trenutka žrtvovanja. Intenzitet artritisa vizualno je ocijenjen za svaku šapu zasebno prema sljedećoj ljestvici: 0 (bez promjena), 1 (oteklina i/ili crvenilo 1 prsta), 2 (oteklina i/ili crvenilo više od 1 prsta ili blaga oteklina šape), 3 (srednja oteklina i crvenilo šape) i najviše 4 (jaka oteklina i crvenilo šape s ankilozom). Konačan zbroj je najviše 16 bodova po mišu (jaka oteklina i crvenilo svih šapa uz ukočenost i nemogućnost hvatanja za rešetku kaveza) (Slika 4).

#### 4.6. Priprema jednostaničnih suspenzija iz uzoraka tkiva

Nakon anestezije primjenom otopine 87,5 mg/kg ketamina/12,5 mg/kg ksilazina, uzorci krvi dobiveni su krvarenjem iz orbitalnog sinusa, nakon čega su životinje žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Krv smo prikupili u epruvete s 800 µL 8 mM otopine antikoagulansa EDTA u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*). Krv je dodano 800 µL 2% otopine dekstrana u PBS-u i promiješano te inkubirano sat vremena na 37°C kako bi se eritrociti razdvojili od leukocita spontanom sedimentacijom. Bistri nadtalog do granice sedimentiranih eritrocita je pažljivo otpipetiran.



**Slika 4. Izazivanje artritisa i klinička ocjena razvoja artritisa.** Miševima je izazvan artritis intradermalnom primjenom pilećeg kolagena tipa II u kompletnom Freundovom adjuvansu. Nakon 21 dan miševi su ponovno imunizirani uz zamjenu kompletnog Freundovog adjuvansa inkompletnim. Od sekundarne imunizacije do žrtvovanja klinički je praćen razvoj znakova artritisa uz bodovanje svake šape zasebno. Prikazane su prednja i stražnja šapa kontrolne skupine bez znakova upale (0) te prednja i stražnja šapa miša s artritisa potaknutim kolagenom (CIA) s najvišom kliničkom ocjenom intenziteta artritisa (4). Maksimalni ukupni zbroj po mišu iznosi 16 bodova. Modificirano prema Flegar D. Karakterizacija reakcije osteoklastnih progenitora i pojačane osteoresorpcije u mišjem modelu reumatoidnoga artritisa [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2018. Napravljeno koristeći BioRender.com

Koštana srž distalne tibije (periartikularna koštana srž) ili femura (sustavna koštana srž) ištrcana je puferom PBS iz koštanog cilindra očišćenog od mišića. Koštana srž femura lizirana je da se uklone eritrociti u hipotoničnom amonijskom puferu (0,15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ /PBS). Slezene su izvađene i usitnjene između dva histološka stakla namočena PBS-om, dio suspenzije je odijeljen za analizu i lizirani su eritrociti. Svi uzorci su isprani centrifugiranjem 5 minuta na 250 rcf (prema engl. *relative centrifugal force*) u PBS-u i propušteni kroz sterilnu mrežicu s porama promjera 40  $\mu\text{m}$  (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) kako bi se uklonile veće nečistoće i dobile jednostanične suspenzije periferne krvi, koštane srži i slezene.



#### 4.7. Imunoenzimsko određivanje kolagenskog telopeptida u serumu

Nakon anestezije primjenom otopine 87,5 mg/kg ketamina/12,5 mg/kg ksilazina, uzorci krvi dobiveni su krvarenjem iz orbitalnog sinusa, nakon čega su životinje žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Uzorci su stajali 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi se stvorio krvni ugrušak, a potom je serum iz krvi izdvojen centrifugiranjem 10 minuta na 7000 okretaja u minuti (rpm, prema engl. *revolutions per minute*) i pohranjen zamrzavanjem na -20°C do analize. Serumske koncentracije CTX-I izmjerene su postupkom ELISA komercijalno dostupnim setom kemikalija, prema uputama proizvođača: Mouse CTX-I ELISA kit (Colorimetric) (Novus Biologicals, Centennial, CO, SAD) osjetljivosti 0,1 ng/mL. Svi postupci izvedeni su na sobnoj temperaturi. Ukratko, za mjerenje koncentracije CTX-I, mikrotitarska pločica iz seta prethodno je obložena protutijelima na mišji CTX-I. U zdence je dodano 100 µL razrijeđenog uzorka seruma ili standardnog uzorka poznate koncentracije CTX-I. Pločica je inkubirana 90 minuta na 37°C pri čemu dolazi do vezanja CTX-I prisutnog u uzorcima na protutijela na pločici. Iz zdenaca je odstranjena tekućina te je bez ispiranja dodano biotinilirano protutijelo za detekciju mišjeg CTX-I i pločica je inkubirana 60 minuta na 37°C. Nakon ispiranja dodan je konjugat avidina i peroksidaze hrena (HRP, prema engl. *horseradish peroxidase*) i pločica je inkubirana 30 minuta na 37°C. Nakon ispiranja dodano je 90 µL supstrata HRP-a te se razvija obojenje proporcionalno količini CTX-I prisutnog u uzorcima. Reakcija stvaranja boje se zaustavlja nakon inkubacije od 15 minuta dodavanjem otopine za zaustavljanje reakcije te se odmah izmjeri apsorpcija svjetlosti valne duljine 450 nm u zdencima pomoću spektrofotometra (GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader, Promega, Madison, WI, SAD). Koncentracija CTX-I određena je prema konstruiranoj krivulji standarda dobivenoj očitanjem serijskih razrjeđenja standardnog uzorka poznate koncentracije iz pripadajućeg seta.

#### 4.8. Mikrokompjuterizirana tomografija

Nakon žrtvovanja uzeli smo desnu stražnju nogu u koljenu ili obje stražnje šape izglobljene u tibiotalarnom zglobu, uklonili kožu te fiksirali uzorke 24 sata na 4°C u puferiranom 4% paraformaldehidu te zatim preselili u 70% etanol. Kostí smo snimili µCT-om pomoću sustava 1076 SkyScan In-vivo Micro-CT (SkyScan, Kontich, Belgija), svakih 0,3° rotacije do 180°, uz faktor „Averaging“ 3, korištena je rezolucija od 9 µm i aluminijski filter debljine 0,5 mm. Pomoću programa NRecon (SkyScan) rekonstruirali smo slike, a pomoću programa CTAn v.1.13 i CTVol (SkyScan) analizirali smo koštanu destrukciju u artritisu te napravili 3D vizualizaciju. Analizirali smo dijelove talusa debljine 0,3-0,4 mm kako bismo odredili udio

mineralizirane (kortikalne i trabekularne) kosti u ukupnom volumenu (BV/TV; %, prema engl. *Bone Volume/Total Volume*) (115, 116).

#### **4.9. Histološka i histomorfometrijska analiza**

Patohistološke promjene u miševa s artritismom analizirali smo na histološkim rezovima zglobova stražnjih šapa. Nakon što smo stražnje šape snimili  $\mu$ CT-om, uzorci su demineralizirani u otopini 14% EDTA u 3% paraformaldehidu 10 do 14 dana, isprani destiliranom vodom 30 minuta uz protresanje, preseljeni u 70% etanol preko noći, zatim u 96% etanol preko noći pa u 100% etanol 2 sata. Potom su uzorci preseljeni u benzen 15 do 20 minuta i uklopljeni u parafinske blokove tijekom 6 sati. Pomoću rotacijskog mikrotoma (Lieca SM 2000 R, Leica Biosystems, Nussloch, Germany) izrezali smo serijske rezove tibiotarnog zgloba u sagitalnoj ravnini debljine 6  $\mu$ m, deparafinirali ih i obojili hemalaun-eozinom (HE), Goldner-Masson-trikromom (GMT) i bojanjem na TRAP. Preparate obojene HE i TRAP bojanjem analizirali smo pomoću mikroskopa Axiovert 200 (Carl Zeiss, AG, Oberkochen, Njemačka), a histomorfometrijska analiza preparata obojenih po GMT provedena je pomoću mikroskopa Axio Imager (Carl Zeiss) priključenog na računalo s programom za analizu kosti OsteoMeasure (Osteo-Metrics, Decatur, SAD). Značajke postupka po GMT su bojenje jezgri plavo do crno, eritrocita crvenkasto, mišića i fibroznog tkiva cigleno te kolagena zeleno (kost, hrskavica). Bojenje TRAP služi prvenstveno za identifikaciju TRAP<sup>+</sup> osteoklasta obojenih žarko crveno i smještenih uz koštane površine u resorpcijskim lakunama. Značajke bojenja HE su plavo-ljubičasto bojenje jezgri, crvena citoplazma, izrazito crveni eritrociti, tamnocrveni mišići i ružičasto bojenje kolagena (kost, vezivno tkivo) dok hidrofobne strukture, primjerice masno tkivo, ostaje nebojeno. Bojenjem HE evaluirana je pojava sinovitisa (upalni infiltrat u sinovijalnom tkivu), osteitisa (zamjena masnog tkiva upalnim stanicama i pojačana prokrvljenost koštane srži), eksudata unutar zgloba te postojanje panusa i erozija zglobne hrskavice i subhondralne kosti.

Za imunohistokemijsku analizu komponenti signalnog puta Notch, deparafinirane uzorke inkubirali smo preko noći na 56°C u 10 mM puferu natrijevog citrata radi dohvaćanja antigena. Nakon ispiranja inaktivirali smo peroksidazu inkubacijom u 0,03% vodikovom peroksidu. Nakon ispiranja uzorke smo inkubirali u otopini *Rodent Block M* (Biocare, Pacheco, CA, SAD) tijekom 30 minuta za blokiranje mišjeg endogenog IgG-a i nespecifičnog pozadinskog signala. Uzorci su zatim inkubirani preko noći na +4°C s ciljnim protutijelima (anti-Notch 1, anti-Notch 2, anti-JAG1, anti-DLL1, anti-Hes1; Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo). Nakon

ispiranja uzorci su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s enzimom HRP. Nakon ispiranja dodana je mješavina koja sadrži 3,3'-diaminobenzidin (DAB) do razvijanja boje. Uzorci su potom isprani obojeni bojom HE i pokriveni pokrovnim stakalcem. Stanice koje izražavaju ciljni antigen mogu se vizualizirati na histološkim preparatima pod svjetlosnim mikroskopom kao smeđe obojenje.

#### 4.10. Protočna citometrija i razvrstavanje stanica

Jednostanične suspenzije uzoraka koštane srži distalne tibije i femura, slezene i periferne krvi obojene su u omjeru 1:10 u 0,05%-tnom tripanskom modrilu kako bi se obojile mrtve stanice, a neobojene stanice su izbrojene u hemocitometru po Bürker-Türku te je izračunata njihova koncentracija u suspenziji. Za obilježavanje monoklonalnim protutijelima uzeli smo  $2-5 \times 10^6$  stanica iz suspenzija za fenotipizaciju odnosno  $5-30 \times 10^6$  stanica za razvrstavanje, centrifugirali na 250 rcf tijekom 5 minuta te odlili nadtalog. Na stanični talog dodali smo mješavinu komercijalno dostupnih monoklonskih protutijela specifičnih za mišje biljege, direktno vezanih s jednom od fluorescentnih boja: fluorescein izotiocijanat (FITC, prema engl. *fluorescein isothiocyanate*), fikoeritrin (PE, prema engl. *phycoerythrin*), peridin-klorofil-cijanin5.5 (PerCP-Cy5.5, prema engl. *peridinin-chlorophyll-cyanine5.5*), fikoeritrin-cijanin7 (PE-Cy7, prema engl. *phycoerythrin-cyanine7*), alofikocijanin (APC, prema engl. *allophycocyanine*), alofikocijanincijanin7 (APC-Cy7, prema engl. *allophycocyanine-cyanine7*), APC-eFluor780, APC/Fire™750, PerCPeFluor710, Brilliant Violet 421™, Brilliant Violet 510™, PE Dazzle™594 ili vezanih s biotinom, u kojem slučaju je postojao drugi korak bojanja sa streptavidinom vezanim s nekom od ranije nabrojanih fluorescentnih boja. Popis korištenih protutijela naveden je u Tablici 2. Za označavanje mrtvih stanica korištene su boje 7-amino-aktinomicin D (7AAD, eBioscience) ili 4',6'-diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid (DAPI, prema engl. 4',6'-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich) koje prolaze kroz propusnu membranu mrtvih stanica i vežu se za nukleinske kiseline. Suspenzije stanica i protutijela su inkubirane 30 minuta u tami, na ledu, nakon čega je suvišak nevezanih protutijela ispran PBS-om s 2% fetalnog telećeg seruma (FBS, prema engl. *fetal bovine serum*, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). U drugom koraku za protutijela označena biotinom, stanice su bojane streptavidinom vezanim s fluoroforom 30 min u tami, na ledu, nakon čega su ponovno isprane u PBS-u s 2% FBS-a. Stanice su u konačnici resuspendirane u 100-500  $\mu$ L PBS-a s 2% FBS-a te je dodana boja za označavanje mrtvih stanica. Fenotipizacija je provedena na protočnom citometru BD FACS Aria IIu (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) opremljenom s 3 lasera i mogućnosti istovremene detekcije do 9 različitih fluorofora. Za analizu

je skupljeno do najviše  $10^6$  događaja (signal zabilježen detektorom uređaja). Podatci su analizirani pomoću programa FlowJo (TreeStar, Ashland, OR, SAD). Negativnost na biljeg bilježena je znakom -, niži broj receptora na staničnoj površini, odnosno nizak intenzitet fluorescencije kraticom „lo“ (prema engl. *low*), pozitivnost znakom +, a vrlo visok broj receptora na staničnoj površini, odnosno visok intenzitet fluorescencije kraticom „hi“ (prema engl. *high*).

Osteoklastni progenitori su definirani kao monocitna subpopulacija fenotipa  $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+CD115^+$  u perifernoj krvi i slezeni te  $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$  u periartikularnoj i sustavnoj koštanoj srži (18, 46, 72). Na toj je populaciji nadalje analiziran izražaj kemokinskih receptora (CCR2, CX3CR1) te receptora Notch 1 do Notch 4. Analiza je provedena uz korištenje neobojenih stanica te kontrolnih uzoraka obojenih kombinacijom protutijela u kojoj nedostaje fluorescentna boja za koju se usporedbom s uzorkom želi odrediti nivo intenziteta fluorescencije (FMO, prema engl. *fluorescence minus one*). Specifične populacije osteoklastnih progenitora iz periartikularne koštane srži i slezene razvrstane su pomoću instrumenta BD FACS Aria IIu i korištene za staničnu kulturu osteoklasta i analizu izražaja gena. Stanice su razvrstavane brzinom 5000 stanica u sekundi uz korištenje ranije opisane strategije (53). Ukratko, na prikazu prednjeg rasapa (FSC, prema engl. *forward-scatter*) u odnosu na postranični rasap (SSC, prema engl. *side-scatter*) odabrana je populacija stanica iz koje su potom isključene mrtve stanice na temelju DAPI signala. Zatim su odabrane hematopoetske  $CD45^+$  stanice. Sljedeći prikaz je signal biljega Ly6G kojim su isključeni granulociti. Zatim je prikazan signal limfocitnih markera u odnosu na CD11b te je odabrana populacija osteoklastnih progenitora ovisno o uzorku (koštana srž ili slezena) i dalje raščlanjena ovisno o izražaju CD115 i kemokinskih biljega.

Stanice su razvrstane u epruvete zapremnine 2 mL s dodanim medijem za staničnu kulturu  $\alpha$ -minimalni esencijalni medij ( $\alpha$ -MEM, prema engl.  *$\alpha$ -minimal essential medium*, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Njemačka) s 10% FBS-a, odnosno PBS s 2% FBS-a ako je iz stanica odmah izolirana RNA. Preciznost razvrstavanja stanica utvrđena je ponovnom analizom razvrstanih populacija te je utvrđena čistoća razvrstanih populacija bila 95-99%.

**Tablica 2. Popis primarnih konjugiranih monoklonalnih protutijela korištenih za protočnu citometriju**

| <b>Stanični biljeg</b> | <b>Klon</b> | <b>Fluorescentna boja</b> | <b>Proizvođač</b>                         | <b>Kataloški broj</b> |
|------------------------|-------------|---------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|
| CD3                    | 145-2C11    | FITC                      | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 100306                |
| CD3                    | 145-2C11    | APC                       | eBiosciences (San Diego, CA, SAD)         | 17-0031-82            |
| B220 (CD45R)           | RA3-6B2     | FITC                      | eBiosciences (San Diego, CA, SAD)         | 11-0452-86            |
| B220 (CD45R)           | RA3-6B2     | APC                       | eBiosciences (San Diego, CA, SAD)         | 17-0452-83            |
| NK1.1                  | PK136       | FITC                      | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 108706                |
| NK1.1                  | PK136       | APC                       | Caltag Laboratories (Burlingame, CA, SAD) | MM6605                |
| CD11b                  | M1/70       | APC/Fire™750              | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 101262                |
| CD11b                  | M1/70       | PE Dazzle™594             | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 101255                |
| CD11b                  | M1/70       | Brilliant Violet 421™     | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 101251                |
| Ly6G                   | 1A8         | PerCP-eFluor710           | eBiosciences (San Diego, CA, SAD)         | 46-9668-82            |
| Ly6G                   | 1A8         | FITC                      | eBiosciences (San Diego, CA, SAD)         | 11-9668-82            |
| CD115                  | AFS98       | PE-Cy7                    | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 135524                |
| CD45                   | 30-F11      | APC                       | eBiosciences (San Diego, CA, SAD)         | 17-0451-83            |
| CD45                   | 30-F11      | Brilliant Violet 510™     | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 103138                |
| CCR2 (CD192)           | SA203G11    | PE                        | R&D Systems (Bio-Techne, Abingdon, UK)    | FAB5538P              |
| CCR2 (CD192)           | SA203G11    | APC/Fire™750              | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 150630                |
| CX3CR1                 | SA011F11    | Brilliant Violet 421™     | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 149023                |
| Notch 1                | HMN1-12     | APC                       | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 130613                |
| Notch 1                | HMN1-12     | PE                        | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 130607                |
| Notch 1                | HMN1-12     | biotin                    | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 130605                |
| Notch 2                | 16F11       | PE                        | eBiosciences (San Diego, CA, SAD)         | 12-5786-82            |
| Notch 2                | HMN2-35     | APC                       | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 130713                |
| Notch 3                | HMN3-133    | PE                        | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 130507                |
| Notch 4                | HMN4-14     | APC                       | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 128413                |
| RANK (CD265)           | R12-31      | PE                        | BioLegend (San Diego, CA, SAD)            | 119805                |

#### 4.11. Stanična kultura osteoklasta i kultivacija na koštanim pločicama

Osteoklastne progenitore iz periartikularne koštane srži i slezene smo nakon razvrstavanja zasadili u pločicu za staničnu kulturu s 96 zdenaca u gustoći od 5000 (stanice izdvojene iz koštane srži) ili 10000 (stanice izdvojene iz slezene) stanica po zdencu. Osteoklastne progenitore smo uzgajali u 200  $\mu$ L osteoklastnog diferencijacijskog medija  $\alpha$ -MEM obogaćenog s 10% FBS-a, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, te 30 ng/mL rekombinantnog mišjeg (rm, prema engl. *recombinant mouse*) M-CSF-a (R&D Systems, NE Minneapolis, MN, SAD) i rmRANKL-a (R&D Systems). Pločica je inkubirana u standardnim uvjetima na temperaturi od 37 °C u ovlaženom zraku s 5% CO<sub>2</sub>, uz promjenu 100  $\mu$ L hranjivog medija svakih 48 sati. U dijelu pokusa, stanice smo drugi dan osteoklastogene kulture odlijepili s dna zdence pomoću enzima TrypLE™ Express (Gibco) i analizirali protočnom citometrijom. U nekim skupinama smo 12 sati prije analize fenotipa protočnom citometrijom ili s drugom promjenom medija dodali 100 ng/mL lipopolisaharida *Escherichiae coli* (LPS). Pratili smo razvoj velikih višezjgrenih stanica i u pogodnom trenutku za analizu smo prekidali uzgoj (3. do 5. dana za osteoklaste iz koštane srži odnosno 5. do 7. dana za osteoklaste iz slezene). Stanice smo fiksirali u zdencima 4%-tnim paraformaldehidom tijekom 10 minuta i obojili prema uputama proizvođača komercijalno dostupnim setom za histokemijsko bojenje na izražaj enzima TRAP (Leukocyte acid phosphatase kit, Sigma-Aldrich). Zdenci su snimljeni pomoću invertnog svjetlosnog mikroskopa Axiovert 200 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany), objektivom povećanja 100x povezanog s kamerom sa spregnutim nabojem i ZEISS ZEN 3.3 lite računalnim programom (oslikavanje *Panorama*). Osteoklasti su izbrojani programom CellProfiler 3.0 (117) podešenim da broji ljubičasto obojene TRAP<sup>+</sup> višezjgrene stanice veće od 37  $\mu$ m, dok su stanice veće od 125  $\mu$ m izbrojane kao veliki osteoklasti.

Resorptivni potencijal osteoklasta diferenciranih *in vitro* ispitali smo kultivacijom na koštanim pločicama. Nakon razvrstavanja, osteoklastne progenitore smo zasadili u pločicu za staničnu kulturu s 96 zdenaca na čije je dno umetnut komadić sonicirane i UV zrakama sterilizirane goveđe kortikalne kosti veličine 4,4x4,4x0,2 mm. Stanice smo zasadili na koštanu pločicu u malom volumenu (10-15  $\mu$ L) diferencijacijskog medija u gustoći 15 000 stanica po zdencu. Prije dodavanja preostalog medija, stanice su inkubirane sat vremena kako bi se priljubile na podležeću kost. Stanice smo uzgajali 15-25 dana uz promjenu pola volumena medija svakih 48 sati. Na kraju kulture medij smo polako otpipetirali, a u zdence dodali 100  $\mu$ L 4% paraformaldehida za fiksaciju. Stanice smo obojili histokemijski na izražaj TRAP-a te smo koštane pločice poslikali kamerom povezanom sa svjetlosnim mikroskopom. Stanice smo zatim uklonili s kosti sonikacijom 5 do 10 minuta u 0,25 M otopini NH<sub>4</sub>OH. Koštane smo pločice

bojali 1%-tnim toluidinskim modrilom u puferu 1% boraksa tijekom 2 minute. Time se pojačava kontrast između resorpcijskih lakuna i netaknute površine kosti te omogućuje analiza svjetlosnim mikroskopom, objektivom povećanja 200x.

#### 4.12. Stanična kultura osteoblasta

Koštanu srž ištrcali smo iz cilindra distalne tibije pomoću 1 mL  $\alpha$ -MEM-a te je dobivena jednostanična suspenzija. Dio suspenzije stanica smo obojili u omjeru 1:10 u 0,05%-tnom tripanskom modrilu kako bi se obojile mrtve stanice, a neobojene stanice izbrojali smo u hemocitometru po Bürker-Türku te izračunali njihovu koncentraciju u suspenziji. Stanice smo razrijedili u mediju  $\alpha$ -MEM obogaćenim s 10% FBS-a, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina u te zasadili u pločicu za staničnu kulturu s 24 zdenaca u gustoći od  $10^6$  stanica/zdencu. Pločica je inkubirana u standardnim uvjetima na temperaturi od 37 °C u ovlaženom zraku s 5% CO<sub>2</sub>. Nakon 4 dana kulture, promijenili smo 50% medija. Sedmi dan kulture, uklonili smo sav medij iz zdenaca, te zamijenili diferencijacijskim medijem ( $\alpha$ -MEM s 10% FBS-a, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina) uz dodatak 50  $\mu$ g/mL askorbinske kiseline i 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata. Cijeli diferencijacijski medij mijenjali smo svaki drugi dan do 14. dana kulture, kada smo stanice fiksirali u zdencima dodatkom 1 mL 96%-tnog etanola tijekom 10 minuta. Zdence smo zatim isprali destiliranom vodom te obojili na izražaj alkalne fosfataze. Boja se svježe priprema dodatkom sljedećih kemikalija: 1 M Tris (pH=8,0), destilirana voda, magnezijev klorid heksahidrat, naftol fosfat Mx otopljen u N-N-dimetilformamidu, *Fast Red TR*. U zdence smo zatim dodali 400  $\mu$ L izmiješane boje i inkubirali 15 do 20 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, pločicu smo ostavili da se suši na zraku, fotografirali, a na dobivenim slikama analizirali udio površine prekriven kolonijama osteoblasta pomoću programa Fiji (118).

#### 4.13. Analiza izražaja gena metodom qPCR

Za mjerenje izražaja gena za diferencijaciju osteoklasta (*Fms*, *Rank*, *Fos* i *Ctsk*), receptora *Notch1-4*, liganada *Dll1*, *Dll4*, *Jag1* i *Jag2*, transkripcijskih ciljeva *Hes1*, *Hey1* i *Bcl2* koristili smo metodu kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (real-time qPCR, prema engl. *real time quantitative polymerase chain reaction*). Za sve postupke vezane za izolaciju RNA, prepisivanje u komplementarnu DNA (cDNA, prema engl. *complementary DNA*) i qPCR koristili smo epruvete bez onečišćenja nukleinskim kiselinama ili enzimima koji ih razgrađuju i nastavke za pipete s filterom za sprječavanja onečišćenja među uzorcima. Iz

uzoraka svježe sortiranih osteoklatnih progenitora (60 000 do 200 000 stanica), jednostaničnih suspenzija periartikularne koštane srži, sustavne koštane srži i slezene te iz staničnih kultura osteoklasta izolirali smo RNA. Uzorke svježe sortiranih osteoklastnih progenitora te stanične suspenzije oprali smo PBS-om i centrifugirali na 250 rcf tijekom 5 minuta. Na stanični talog dodali smo 0,5 mL otopine za izolaciju RNA (TRIzol, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), žustro promiješali, te inkubirali na sobnoj temperaturi 2 minute. Uzorke iz kulture osteoklasta sakupili smo nakon 48 sati uzgoja tako da smo iz zdenaca otpipetirali medij te ravnomjerno rasporedili 0,5 mL TRIzol-a među zdencima svake skupine. Otopinu smo žustro promiješali pipetom i sakupili sadržaj zdenaca. Uzorke smo zamrznuli na -20°C do daljnjih koraka izolacije stanične RNA. Nakon odmrzavanja u uzorke smo dodali 100 µL kloroforma, promiješali i inkubirali 2 minute na sobnoj temperaturi te centrifugirali 15 minuta na 12000 g, na temperaturi +4°C. Centrifugiranjem se sadržaj uzorka razdijelio u 3 sloja. Gornji sloj (koji sadrži RNA) smo pažljivo otpipetirali u novu epruvetu. Zatim smo dodali 70%-tni izopropanol u omjeru 1:1. Kako bi se RNA precipitirala, uzorke smo smrznuli preko noći na -20°C. Nakon odmrzavanja uzorke smo centrifugirali tijekom 30 minuta na 12000 g, na temperaturi +4°C. Nakon odlijevanja nadtaloga na talog je dodano 1 mL 75%-tnog etanola te smo uzorke ponovno centrifugirali 15 minuta na 7500 g i temperaturi od +4°C. Nakon uklanjanja nadtaloga uzorke RNA smo ostavili otvorenih epruveta nekoliko minuta da preostali etanol ishlapi i potom otopili u 10-20 µL destilirane vode. Pomoću UV-VIS spektrofotometra za mjerenje malih uzoraka (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, SAD) izmjerili smo vrijednosti koncentracije i čistoće izolirane RNA. Po 1-2 µg izolirane RNA iz svakog uzorka obrnuto smo prepisali u cDNA reakcijom reverzne transkripcije pomoću komercijalno dostupnog seta kemikalija High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems), prema uputama proizvođača. Postupak uključuje dodavanje deoksiribonukleotida, početnica, RT-pufera, mješavine enzima reverzne transkriptaze i inhibitora RNaza u svaki od uzoraka te inkubaciju na 37°C u trajanju od 120 minuta nakon čega se reakcija zaustavlja grijanjem na 95°C tijekom 5 minuta. Prepisanu cDNA smo pohranili na -20°C do daljnje upotrebe. Umnažanje dobivene cDNA, provedeno je pomoću uređaja ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Pomoću komercijalno dostupnih setova za detekciju TaqMan Assay (Applied Biosystems) i TaqMan Gene Expression Master mix (Applied Biosystems) izmjerili smo izražaj gena prema uputama proizvođača. Uzorke u reakcijskoj smjesi ispipetirali smo u pločicu s 96 zdenaca (ABI Prism Optical 96-Well Plate, Applied Biosystems), a pločica je inkubirana 2 minute na +50°C kako bi se aktivirao enzim uracil N-glikozilaza (AmpErase; Applied Biosystems) za uklanjanje vezanog uracila, a



potom 10 minuta na +95°C da bi se uracil N-glikozilaza inaktivirala, a aktivirala DNA polimeraza i započela sinteza DNA. Slijedi 40 naizmjeničnih ciklusa inkubacije na +95°C 15 sekundi kada dolazi do denaturacije cDNA i +60°C 60 sekundi kada dolazi do vezanja početnica i sinteze DNA. TaqMan Assay sadrži početnice i probe specifične za mjereni gen. Probe su obilježene fluorescentnom bojom 6-FAM na 5' kraju i prigušivačem fluorescencije (NFQ, prema engl. nonfluorescent quencher) na 3' kraju. TaqMan Gene Expression Master mix sadrži DNA polimerazu (AmpliTaq Gold DNA polymerase, Applied Biosystems) i deoksiribonukleotide u odgovarajućoj puferskoj otopini. Princip reakcije je oslobađanje fluorescentne boje djelovanjem DNA polimeraze kod umnažanja lanaca te tako fluorescencija raste s brojem umnoženih fragmenata DNA. Proba se veže za cDNA mjenog gena između početnica pa DNA polimeraza, produljujući početnice, cijepa probu čime se fluorescentna boja odvaja od prigušivača NFQ. Količina umnoženih fragmenata DNA izmjerena je mjerenjem intenziteta fluorescencije, čija su očitavanja prikazana grafički gdje je broj ciklusa prikazan na apscisi, intenzitet fluorescencije na ordinati, prikazano logaritamski kao razlika izmjerene fluorescencije reakcije i “temeljne” fluorescencije. Sredinom eksponencijalnog rasta krivulje umnažanja arbitrarno smo izabrali prag intenziteta fluorescencije za određivanje kritičnog broja ciklusa (CT, prema engl. cycle threshold) koji služi za interpretaciju relativne količine RNA za ciljni gen. Relativna količina cDNA je dobivena upotrebom standardne krivulje serijskih razrjeđenja kalibracijskog (kontrolnog) uzorka, a relativna količina mRNA za mjereni gen je izražena u odnosu na količinu mRNA *Actb* ili *Hmbs* izabranih za endogenu kontrolu.

#### **4.14. Oblaganje zdenaca ligandima Notch i *in vitro* primjena neutralizacijskih protutijela**

Za aktivaciju signalnog puta Notch koristili smo ligande imobilizirane na dnu zdenaca prema protokolu opisanom u istraživanju Ashley i suradnika (88). U zdence pločice za staničnu kulturu dodano je po 50 µL štakorskog anti-ljudskog IgG protutijela (BioLegend, kataloški broj 410701) u koncentraciji 10 µg/mL u PBS-u. Pločice smo omotali parafilmom i ostavili preko noći na +4°C. Zatim smo otpipetirali protutijela i tri puta isprali zdence PBS-om. U zdencima koji su IgG kontrola, ostavili smo PBS, a u druge zdence smo dodali po 50 µL rekombinantnog liganda JAG1 (R&D Systems, kataloški broj 1277-JG) ili DLL1 (R&D Systems, kataloški broj 10184-DL) vezanih za Fc-fragment ljudskog IgG u koncentraciji od 1, 5 ili 10 µg/mL. Pločice su se inkubirale 2 sata na 37°C, potom smo ponovno zdence isprali tri puta PBS-om. Do sađenja stanica, pločica je stajala na 37°C, a u zdencima smo ostavili PBS kako se zdenci ne bi isušili.

Razvrstane osteoklastne progenitore zasadili smo u obložene zdence prema ranije opisanom postupku.

U nekim pokusima koristili smo neutralizacijska kozja poliklonalna protutijela na Notch 1 (R&D Systems, kataloški broj AF1057) ili Notch 2 (R&D Systems, kataloški broj AF1190) receptore. Protutijela smo dodali u stanični medij u koncentraciji od 20 µg/mL prilikom sađenja stanica kao i kod svake promjene medija. Kao kontrolu neutralizacijskim protutijelima, koristili smo kontrolna kozja IgG protutijela (R&D Systems, kataloški broj AB-108-C) u istoj koncentraciji. Na kraju osteoklastne kulture, stanice su fiksirane u zdencima 4%-tnim paraformaldehidom te bojane komercijalno dostupnim setom za histokemijsko bojenje.

#### **4.15. *In vivo* primjena neutralizacijskih protutijela**

Miševima visokosrođenog soja C57BL/6 izazvan je artritis prema ranije opisanom protokolu. Obrada neutralizacijskim protutijelima je započeta 19 dana nakon primarne imunizacije, davanjem neutralizacijskih protutijela na Notch 1 ili Notch 2, dok je kontrolna skupina dobivala kontrolna protutijela. Korištena su kozja poliklonalna protutijela na Notch 1 (R&D Systems, kataloški broj AF1057) ili Notch 2 (R&D Systems, kataloški broj AF1190) receptore. Miševi su dobivali intraperitonealnu injekciju protutijela u PBS-u svaki 3. dan u dozi od 1 mg/kg ukupno 5 puta. Žrtvovanje je provedeno 33. dan nakon primarne imunizacije, te su sakupljena periferna krv, slezena, koštana srž distalne tibije te stražnje šape za analizu µCT-om i histologiju. Dobivene suspenzije tkiva analizirane su protočnom citometrijom, a osteoklastni progenitori iz periartikularne koštane srži i slezene razvrstani su i zasađeni u osteoklastogenu kulturu stanica potaknutu čimbenicima RANKL i M-CSF. Iz dijela suspenzija tkiva i preosteoklasta iz kulture izolirana je RNA te je analiziran izražaj gena.

#### **4.16. Indukcija rekombinaze Cre**

S obzirom na to da je rekombinaza Cre u našem transgeničnom modelu inducibilna, vezana za modificirani estrogenski receptor, tek primjenom tamoksifena dolazi to premještanja kompleksa u jezgru i rekombinacije DNA između sekvenci *loxP*. Kako bismo inducirali Cre-rekombinaciju *in vitro* u staničnoj kulturi, staničnom mediju smo dodali vodotopivi 4-hidroksitamoksifen (4-OHT, Sigma Aldrich) otopljen u 100%-tnom etanolu u konačnoj koncentraciji od 1 µM. Kontrola 4-OHT-u bio je 100% etanol u istom volumenu, dok je u kasnijim pokusima kontrola Cre<sup>+</sup> kulturama bila Cre<sup>-</sup> kultura, a obje su skupine tretirane 4-OHT-om. Za indukciju rekombinaze Cre *in vivo*, koristili smo tamoksifen (Sigma Aldrich)

otopljen u kukuruznom ulju (Sigma Aldrich) u koncentraciji od 10 mg/mL. Tamoksifen smo izvagali, dodali kukuruzno ulje, tubicu smo omotali parafilmom i aluminijskom folijom te ostavili da se otopi preko noći na 37°C uz miješanje. Miševima smo inducirali artritis imunizacijom pilećim kolagenom te smo indukciju rekombinaze Cre započeli intraperitonealnim injekcijama 75 mg/kg otopine tamoksifena, počevši od sekundarne imunizacije, svaki drugi dan do žrtvovanja.

#### **4.17. Statistička analiza**

Provedeno je testiranje normalnosti raspodjele podataka D'Agostino-Pearsonovim testom. Na temelju toga, rezultati su prikazani kao medijani s interkvartilnim rasponom (IQR, prema engl. *interquartile range*) za podatke koji odstupaju od normalne raspodjele. Statistička analiza razlike između skupina provedena je koristeći neparametrijski test *Mann-Whitney* (za usporedbe između dvije skupine), odnosno prvo test *Kruskal-Wallis* nakon kojeg slijedi test *Conover* (za višestruke usporedbe). Povezanost podataka testirana je *Spearmanovim* korelacijskim testom i izražena kao korelacijski koeficijent  $\rho$ . Statističke analize su učinjene pomoću programa MedCalc, verzije 9.4.2.0 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). U svim testovima za razinu statističke značajnosti (vrijednost  $\alpha$ ) postavljena je vrijednost  $p < 0,05$ .

## 5. Rezultati

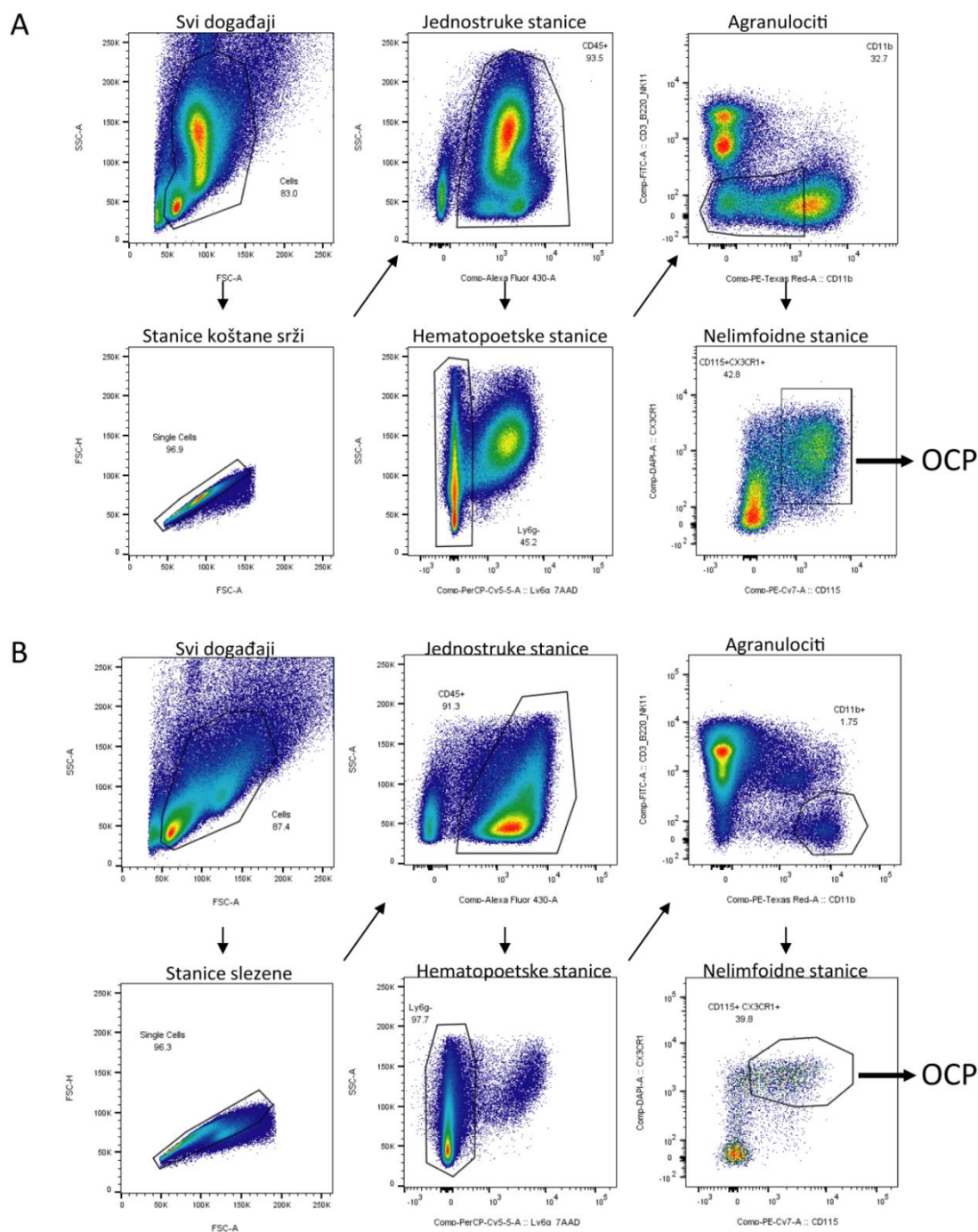
### 5.1. Analiza promjena komponenata signalnog puta Notch izazvanih artritismom

U prvoj fazi istraživanja, koja odgovara prvom specifičnom cilju disertacije, definirali smo osteoklastogene populacije u koštanoj srži i perifernim tkivima u miša, inducirali artritis u divljem soju C57BL/6 te analizirali promjene u komponentama signalnog puta Notch do kojih dolazi uslijed razvitka artritisa. Ovaj cilj imao je svrhu utvrditi aktivnost signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima te specifični učinak razvoja artritisa na aktivnost toga signalnog puta, da bi opravdali svrhovitost daljnjeg istraživanja i testiranja postavljene hipoteze disertacije.

#### 5.1.1. Osteoklastogene populacije u miša

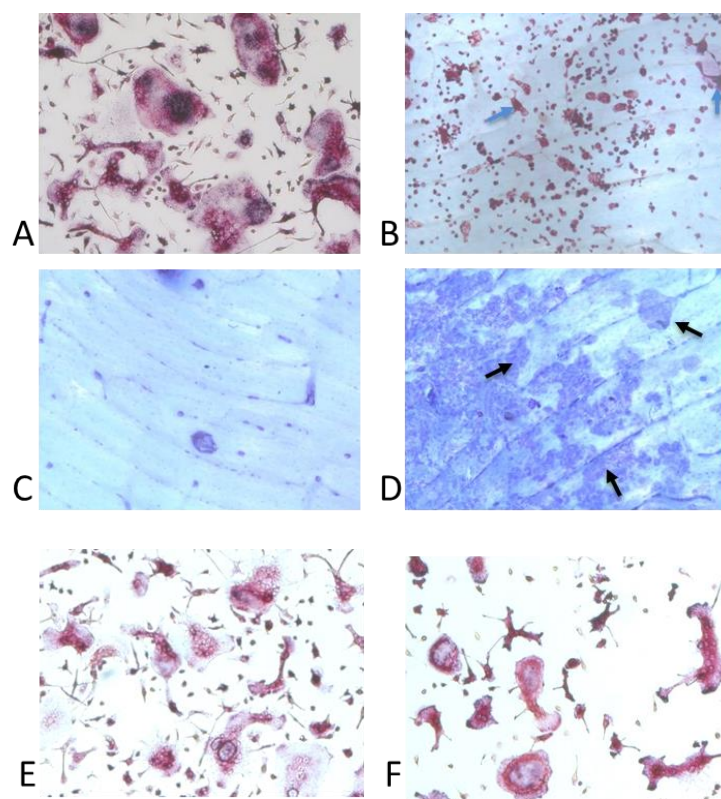
Populacije stanica sa sposobnošću stvaranja osteoklasta nalazimo u koštanoj srži, ali i druga tkiva kao što su slezena i periferna krv mogu biti izvor osteoklastnih progenitora. Protočnom citometrijskom analizom definirali smo populacije osteoklastnih progenitora i utvrdili da ih nalazimo u populaciji hematopoetskih stanica ( $CD45^+$ ), među agranulocitima ( $Ly6G^-$ ) koji ne izražavaju limfoidne biljege ( $CD3^-$ ,  $B220^-$ ,  $NK1.1^-$ ). U koštanoj srži osteoklastni progenitori ne izražavaju ili imaju nizak izražaj integrina  $CD11b$  ( $CD11b^{-/lo}$ ), dok u slezeni i krvi imaju visok izražaj  $CD11b$  ( $CD11b^+$ ) (52). Svi osteoklastni progenitori definirani su izražajem molekule  $CD115$  odnosno receptorom za M-CSF (Slika 5). U odgovarajućim uvjetima osteoklastni progenitori se mogu diferencirati i u makrofage ili stanice nalik na dendritičke stanice (52, 114).

U staničnoj kulturi uz dodatak osteoklastogenih čimbenika MCSF i RANKL, osteoklastni progenitori se diferenciraju u multinuklearne stanice koje izražavaju enzim TRAP (Slika 6). Tako diferencirani osteoklasti imaju sposobnost resorpcije kosti, što smo pokazali kulturom na kriškama goveđe kosti te vizualizacijom resorpcijskih jažica (Slika 6). Osteoklastni progenitori su također karakterizirani izražajem kemokinskih receptora (53). Dva najvažnija kemokinska receptora izražena na osteoklastnim progenitorima su  $CCR2$  i  $CX3CR1$ .  $CX3CR1$  se uobičajeno koristi kao biljeg monocita, a taj receptor izražava  $>98\%$  osteoklastnih progenitora, što ga čini dobrim biljegom te populacije. Potvrdili smo također da  $CX3CR1^+$  osteoklastni progenitori imaju velik osteoklastogeni potencijal i stvaraju višejezgrene  $TRAP^+$  osteoklaste (Slika 6).



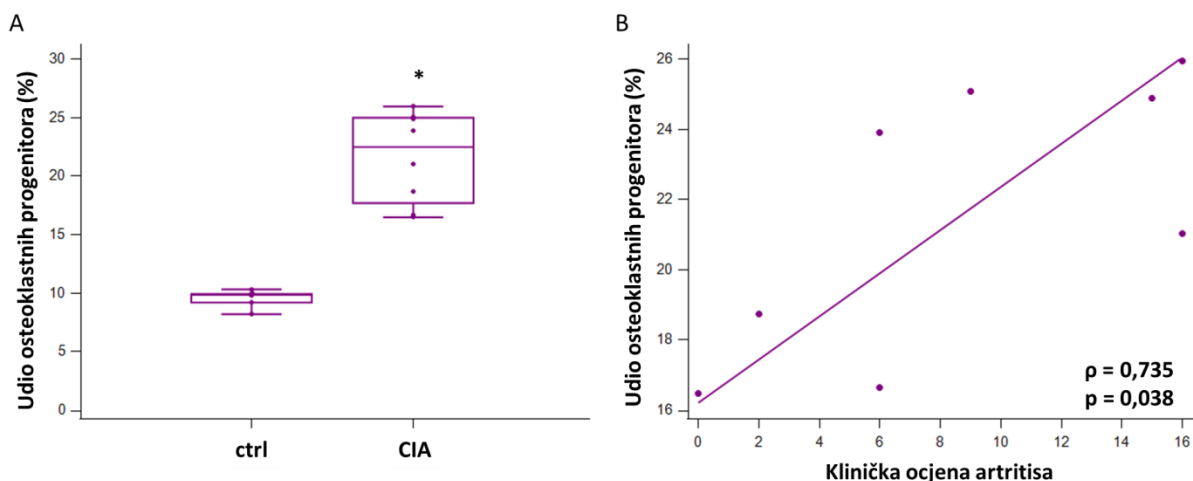
**Slika 5. Strategija analize i razvrstavanja populacije osteoklastnih progenitora u koštanoj srži i slezeni.**

Prikazani su reprezentativni točkasti grafikoni sa strategijom protočno-citometrijske analize osteoklastnih progenitora (OCP) za stanice periartikularne i sistavne koštane srži distalne tibije (A) te slezene i periferne krvi (B). Analiza uključuje odabir populacije stanica u svim događajima, odabir jednostrukih stanica, zatim hematopoetskih (CD45<sup>+</sup>) stanica koje nisu granulociti (Ly6G<sup>-</sup>) i nisu limfociti (CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>). Analiza dalje ovisi o tkivu koje analiziramo te za koštanu srž odabiremo populaciju koja ne izražava ili ima nizak izražaj CD11b (CD11b<sup>-/lo</sup>), a za slezenu i perifernu krv stanice s visokim izražajem CD11b (CD11b<sup>+</sup>). Konačno odabiremo populaciju stanica koje izražavaju receptor za M-CSF (CD115<sup>+</sup>). FSC – prednji rasap prema engl. *forward scatter*, SSC – postranični rasap prema engl. *side scatter*.



**Slika 6. Osteoklastogeni potencijal razvrstanih osteoklastnih progenitora.** Definirana populacija osteoklastnih progenitora ( $CD45^{+}Ly6G^{-}CD3^{-}B220^{-}NK1.1^{-}CD11b^{-/lo}CD115^{+}$ ) iz koštane srži je izolirana postupkom protočne citometrije i zasađena u staničnu kulturu uz dodatak osteoklastogenih čimbenika RANKL i M-CSF. Prikazane su velike višezegrene stanice koje izražavaju enzim TRAP (A). Kada se osteoklastni progenitori zasade na koštane pločice ( $TRAP^{+}$  osteoklasti označeni plavim strelicama, B) diferenciraju se u zrele osteoklaste koji imaju sposobnost resorpcije kosti. Resorpcijske jamice mogu se vidjeti bojanjem toluidinskim modrilom kao plavičaste mrlje (crne strelice, D) u odnosu na netaknutu kost (neobrađena koštana pločica, C). (E, F) Definirane populacije  $CX3CR1^{+}$  osteoklastnih progenitora u koštanoj srži ( $CD45^{+}Ly6G^{-}CD3^{-}B220^{-}NK1.1^{-}CD11b^{-/lo}CD115^{+}CX3CR1^{+}$ ) i slezeni ( $CD45^{+}Ly6G^{-}CD3^{-}B220^{-}NK1.1^{-}CD11b^{+}CD115^{+}CX3CR1^{+}$ ) su izolirane postupkom protočne citometrije i zasađene u staničnu kulturu uz dodatak osteoklastogenih čimbenika. (E)  $TRAP^{+}$  osteoklasti iz koštane srži (F)  $TRAP^{+}$  osteoklasti iz slezene.

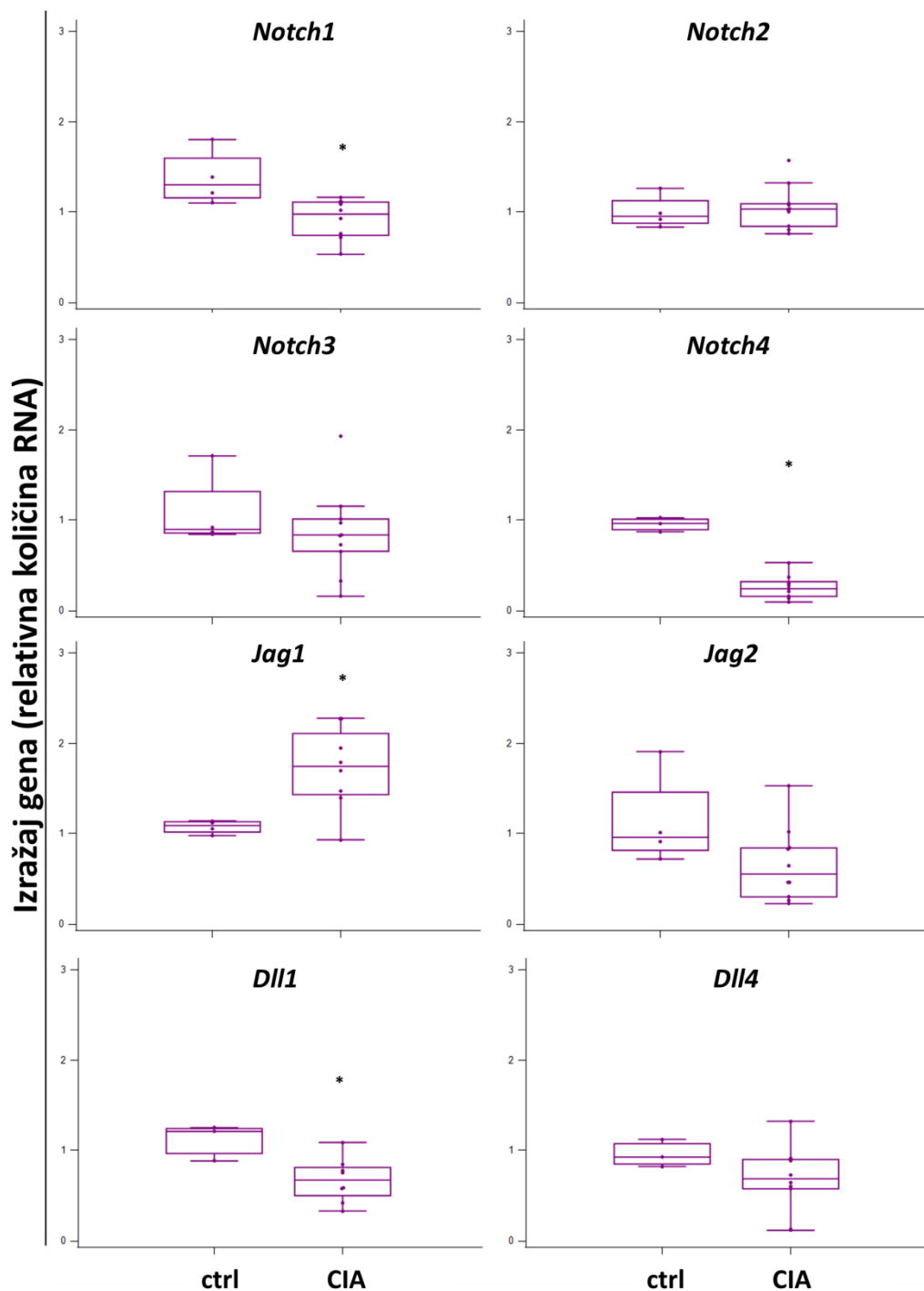
Nadalje smo uspoređivali frekvenciju osteoklastnih progenitora u artritisu u odnosu na kontrolne miševe. Miševima soja C57BL/6 izazvali smo artritis imunizacijom pilećim kolagenom, te smo populacije osteoklastnih progenitora analizirali 35. dan nakon primarne imunizacije. Prethodno smo pokazali da u artritisu dolazi do umnažanja nezrelih i zrelih mijeloidnih stanica, a populacija osteoklastnih progenitora značajno je brojnija u koštanoj srži (fenotipa  $CD45^{+}Ly6G^{-}CD3^{-}B220^{-}NK1.1^{-}CD11b^{-/lo}CD115^{+}$ ) i perifernim hematopoetskim tkivima (fenotipa  $CD45^{+}Ly6G^{-}CD3^{-}B220^{-}NK1.1^{-}CD11b^{+}CD115^{+}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (53). Populacija osteoklastnih progenitora umnaža se s intenzitetom bolesti te je udio osteoklastnih progenitora razmjeran kliničkoj ocjeni artritisa (Slika 7).



**Slika 7. Povećan udio osteoklastnih progenitora u artritisu.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Od sekundarne imunizacije do žrtvovanja klinički je praćen razvoj znakova artritisa uz bodovanje svake šape zasebno do maksimalnog zbroja od 16 bodova po mišu. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž analizirana je protočnom citometrijom. (A) Prikazan je udio stanica osteoklastnih progenitora ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+CX3CR1^+$ ) među svim stanicama  $CD45^+Ly6G^-$ , u neimuniziranih (ctrl) i artritčnih (CIA) miševa kao medijan uz interkvartilni raspon. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (Mann-Whitney U test) (B) Udio osteoklastnih progenitora pozitivno korelira s kliničkom ocjenom artritisa.  $\rho$  – Spearmanov koeficijent korelacije

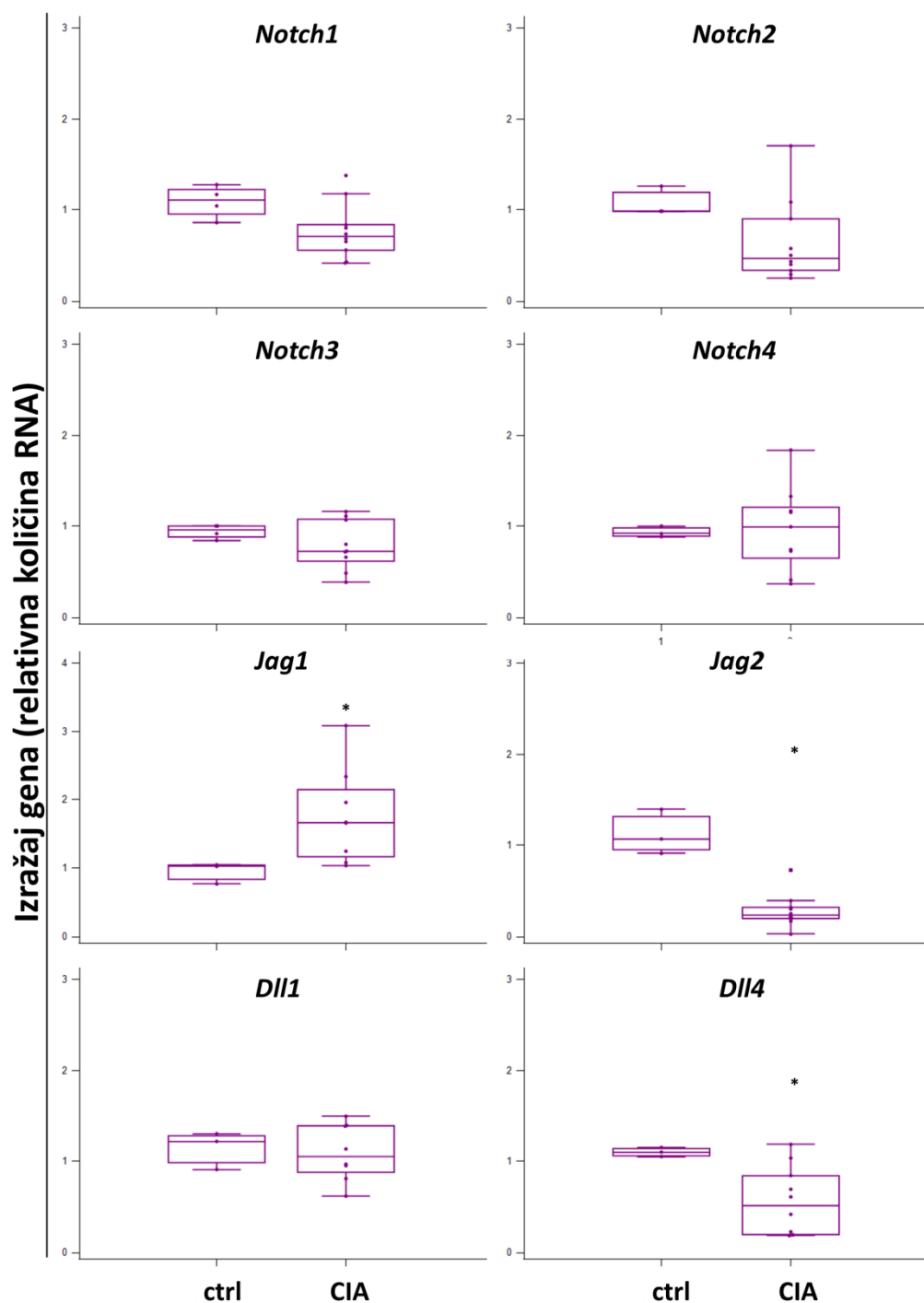
### 5.1.2. Izražaj komponenti signalnog puta Notch u mišjim osteoklastnim progenitorima i promjene izazvane artritisom

U sljedećem setu pokusa cilj je bio utvrditi je li signalni put Notch aktivan u hematopoetskim stanicama te postoje li promjene povezane s artritisom, što smo istražili utvrđivanjem izražaja gena za receptore i ligande u suspenzijama koštane srži i slezene. Miševima soja C57BL/6 izazvali smo artritis imunizacijom pilećim kolagenom. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije, kada očekujemo vrhunac incidencije klinički razvijenog artritisa, te smo usporedili izražaj komponenti signalnog puta Notch s izražajem u neimuniziranih miševa. Izolirali smo RNA iz suspenzija mišje periartikularne koštane srži tibije te iz suspenzije slezena. RNA smo obrnuto prepisali u cDNA te izražaj gena analizirali pomoću kvantitativnog PCR-a. U suspenzijama smo potvrdili izražaj komponenta signalnog puta Notch i to receptore *Notch1* do *Notch4*, te ligande *Jag1*, *Jag2*, *Dll1* i *Dll4* (Slike 8 i 9). U suspenziji periartikularne koštane srži miševa s artritisom na genskoj razini nalazimo manji izražaj receptora *Notch1* i *Notch4* te liganda *Dll1*, dok je genski izražaj *Jag1* povećan u odnosu na neimunizirane kontrole (Slika 8). U slezeni pak nalazimo niži izražaj gena za ligande *Jag2* i *Dll4* dok je izražaj *Jag1* također povećan u miševa s artritisom (Slika 9).



**Slika 8. Izražaj komponenti signalnog puta Notch u periartikularnoj koštanoj srži.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i iz suspenzije periartikularne koštane srži izolirana je RNA, prepisana u cDNA i određen je izražaj gena pomoću qPCR-a. Na grafovima je prikazan izražaj gena komponenata signalnog puta Notch u neimuniziranih kontrola (ctrl) i artritčnih (CIA) miševa izražen kao relativna količina RNA u odnosu na endogenu kontrolu *Actb*. Rezultati su prikazani kao medijan uz interkvartilni raspon. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (Mann-Whitney U test).





**Slika 9. Izražaj komponenti signalnog puta Notch u slezeni.** Miševima je izazvan artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i iz suspenzije slezene izolirana je RNA, prepisana u cDNA i određen je izražaj gena pomoću qPCR-a. Na grafovima je prikazan izražaj gena komponenata signalnog puta Notch u neimuniziranih kontrola (ctrl) i artritičnih (CIA) miševa izražen kao relativna količina RNA u odnosu na endogenu kontrolu *Actb*. Rezultati su prikazani kao medijan uz interkvartilni raspon. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (Mann-Whitney U test).

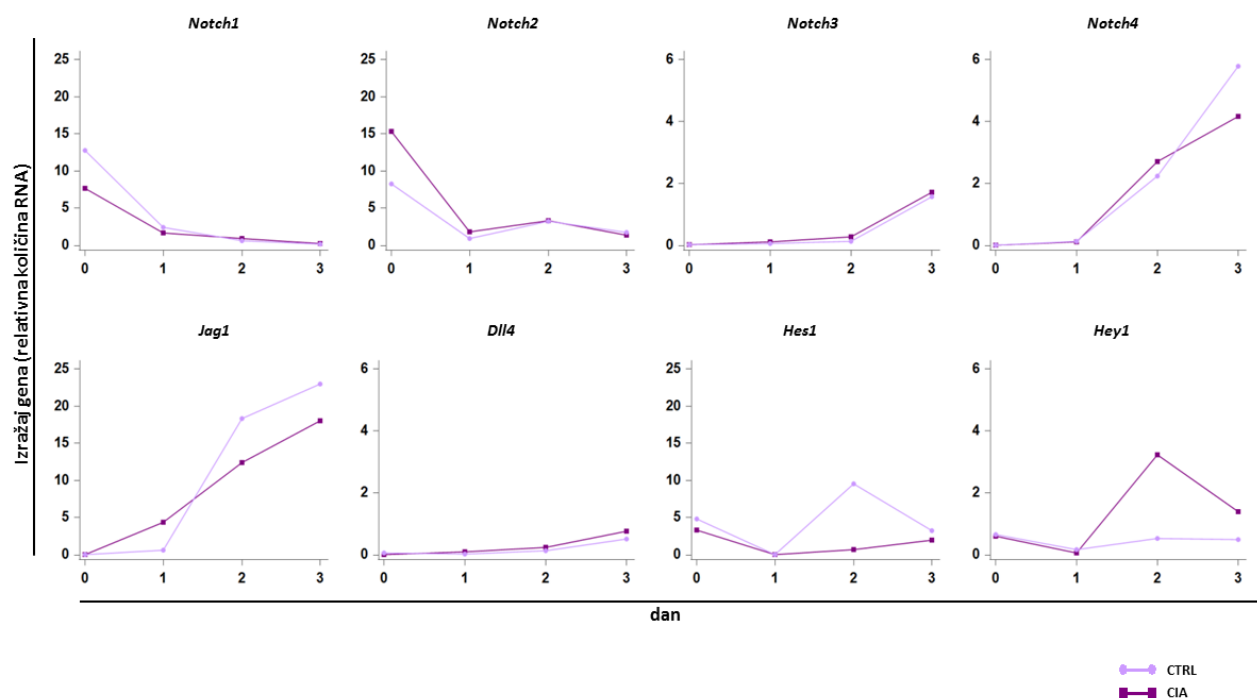
Nadalje smo istražili aktivnost signalnog puta Notch specifično u osteoklastnim progenitorima, te promjene tijekom njihove diferencijacije. Izražaj komponenata signalnog puta Notch potvrdili smo i u transkriptima izoliranim iz sortiranih osteoklastnih progenitora (dan 0). Razvrstane osteoklastne progenitore iz periartikularne koštane srži smo uzgajali u osteoklastogenoj kulturi, uz dodatak čimbenika RANKL i M-CSF, te smo iz preosteoklasta (usmjerenih osteoklastnih progenitora) izolirali RNA tijekom tri uzastopna dana kulture (Slika 10).

Uspoređujući relativnu količinu RNA, osteoklastni progenitori izražavaju najviše receptora *Notch1* i *Notch2*, te je izražaj *Notch1* veći u osteoklastnim progenitorima izoliranim iz neimuniziranih miševa, dok je izražaj *Notch2* oko dva puta veći u osteoklastnim progenitorima miševa s artritisom (Slika 10). S diferencijacijom osteoklasta izražaj oba receptora se smanjuje, dok izražaj receptora *Notch3* i *Notch4*, kojih je relativno malo u svježe razvrstanih osteoklastnih progenitora, raste tijekom diferencijacije. Trećeg dana kulture nema razlike između izražaja receptora *Notch3* i *Notch4* u dvije grupe miševa.

Od dva analizirana liganda signalnog puta Notch, genskog izražaja *Jag1* i *Dll4* ima relativno malo u svježe razvrstanim osteoklastnim progenitorima, ali i njihov izražaj raste s diferencijacijom (Slika 10). Izražaj *Jag1* raste većom dinamikom u odnosu na druge analizirane ligande te je treći dan kulture nešto viši u osteoklasta iz kontrolnih neimuniziranih miševa.

Analizom izražaja dva klasična transkripcijska cilja signalnog puta Notch, pokazali smo da je *Hes1* jednako izražen u svježe razvrstanim osteoklastnim progenitorima u obje skupine miševa, dok je *Hey1* relativno manje izražen u odnosu na *Hes1* i također ne pokazuje razliku u izražaju među grupama. S diferencijacijom osteoklasta izražaj *Hes1* smanjuje se u miševa s artritisom, dok u neimuniziranih miševa raste da bi treći dan kulture razina izražaja bila jednaka kao u razvrstanim osteoklastnim progenitorima. Izražaj *Hey1* s druge strane ostaje nepromijenjen u kontrolnih miševa, a raste u osteoklasta diferenciranih iz osteoklastnih progenitora miševa s artritisom.

Iz navedenih rezultata zaključili smo da postoji specifična dinamika izražaja gena za komponente signalnog puta Notch tijekom diferencijacije osteoklasta, te da artritis mijenja taj izražaj poglavito u smislu smanjenja izražaja gena za *Notch1*, a pojačanja izražaja gena za *Notch2*, što govori u prilog specifičnoj aktivaciji signalnog puta Notch u artritisu.



**Slika 10. Izražaj komponenti signalnog puta Notch tijekom diferencijacije osteoklastnih progenitora.**

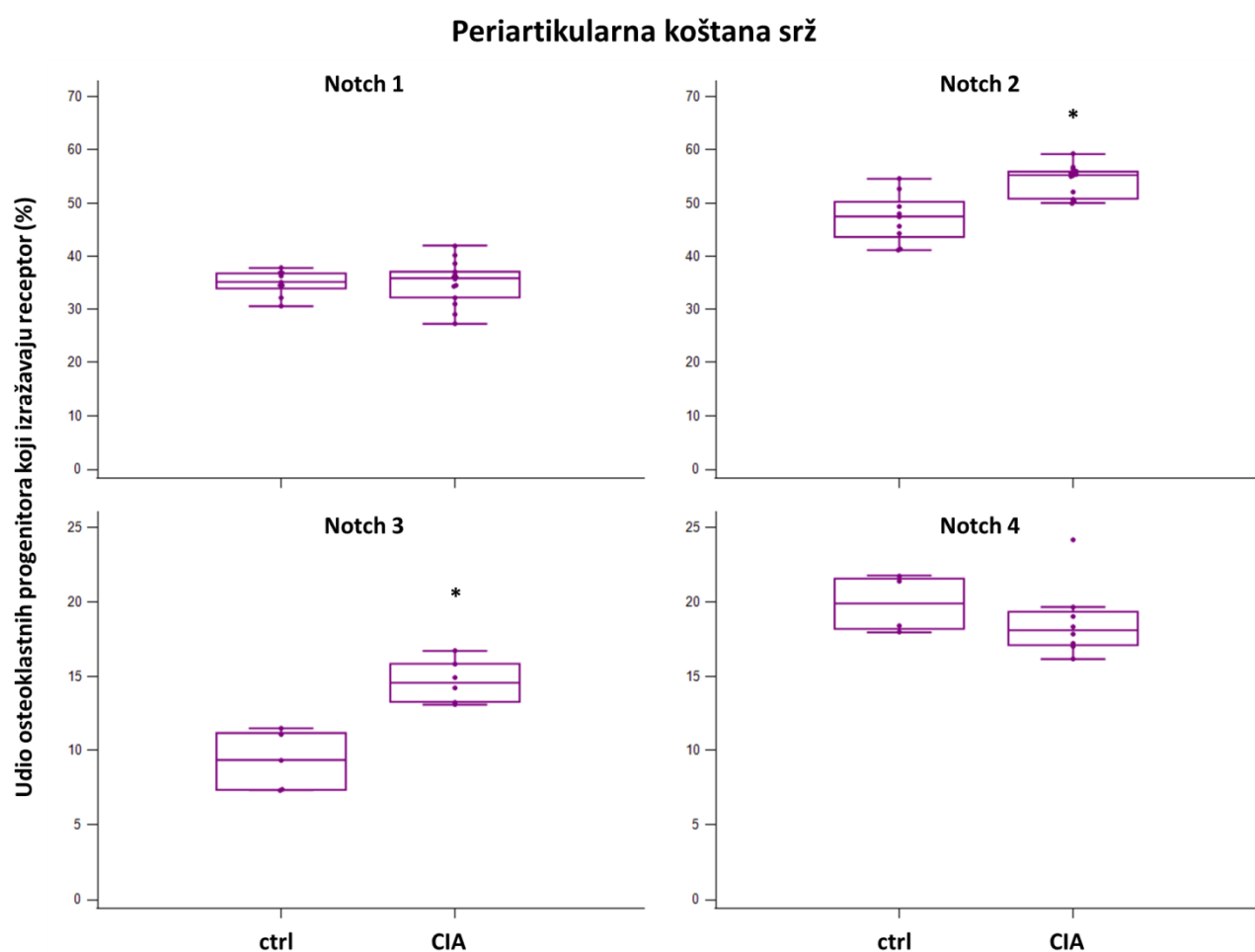
Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž analizirana je na protočnoj citometriji. Razvrstane su stanice osteoklastnih progenitora periartikularne koštane srži ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{+/-}CD115^+$ ) iz neimuniziranih kontrola (CTRL) i artritčnih (CIA) miševa te su zasađene u osteoklastogenu kulturu. Iz stanica je izolirana RNA tijekom četiri uzastopna dana (dan 0 do dan 3), prepisana u cDNA i određen je izražaj gena pomoću qPCR-a. Na grafovima je prikazan izražaj gena komponenata signalnog puta Notch kao relativna količina RNA u odnosu na endogenu kontrolu *Actb*.

Izražaj komponenata signalnog puta Notch odredili smo i na proteinskoj razini analizom protočnom citometrijom te imunohistokemijski na histološkim rezovima mišjih stražnjih šapa. Protočno-citometrijskom analizom utvrdili smo izražaj sva četiri receptora Notch na osteoklastnim progenitorima u periartikularnoj i sustavnoj koštanoj srži, slezeni i leukocitima periferne krvi. Receptori Notch 1 i Notch 2 su izraženi na najvećem postotku osteoklastnih progenitora, dok su Notch 3 i Notch 4 izraženi na manjem udjelu progenitora u svim analiziranim tkivima (Slike 11 do 14).

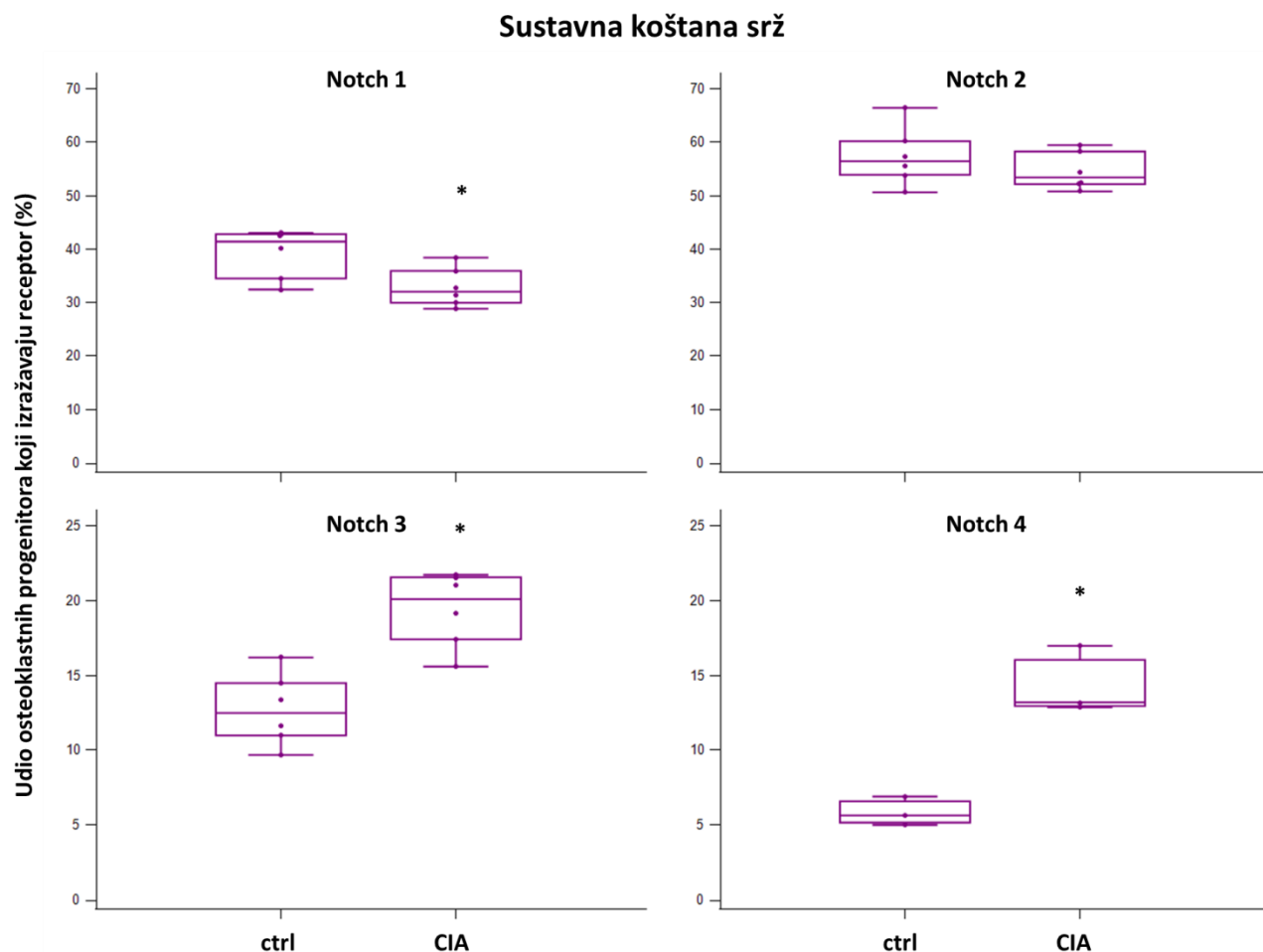
U periartikularnoj koštanoj srži u neimuniziranih miševa, receptor Notch 1 izražava oko 35%, receptor Notch 2 oko 45%, receptor Notch 3 oko 10%, a receptor Notch 4 oko 20% osteoklastnih progenitora (Slika 11). U artritisu se povećava udio osteoklastnih progenitora koji izražavaju receptor Notch 2 (55%) i Notch 3 (15%). U sustavnoj koštanoj srži neimuniziranih miševa, u odnosu na periartikularnu srž, receptore Notch izražava nešto veći udio osteoklastnih

progenitora (Notch 1 40%, Notch 2 55%, Notch 3 15%), s iznimkom receptora Notch 4 kojeg izražava svega oko 5% osteoklastnih progenitora (Slika 12). U miševa s artritisa dolazi do porasta udjela progenitora koji izražavaju receptor Notch 3 (na oko 20%) i Notch 4 (na oko 15%).

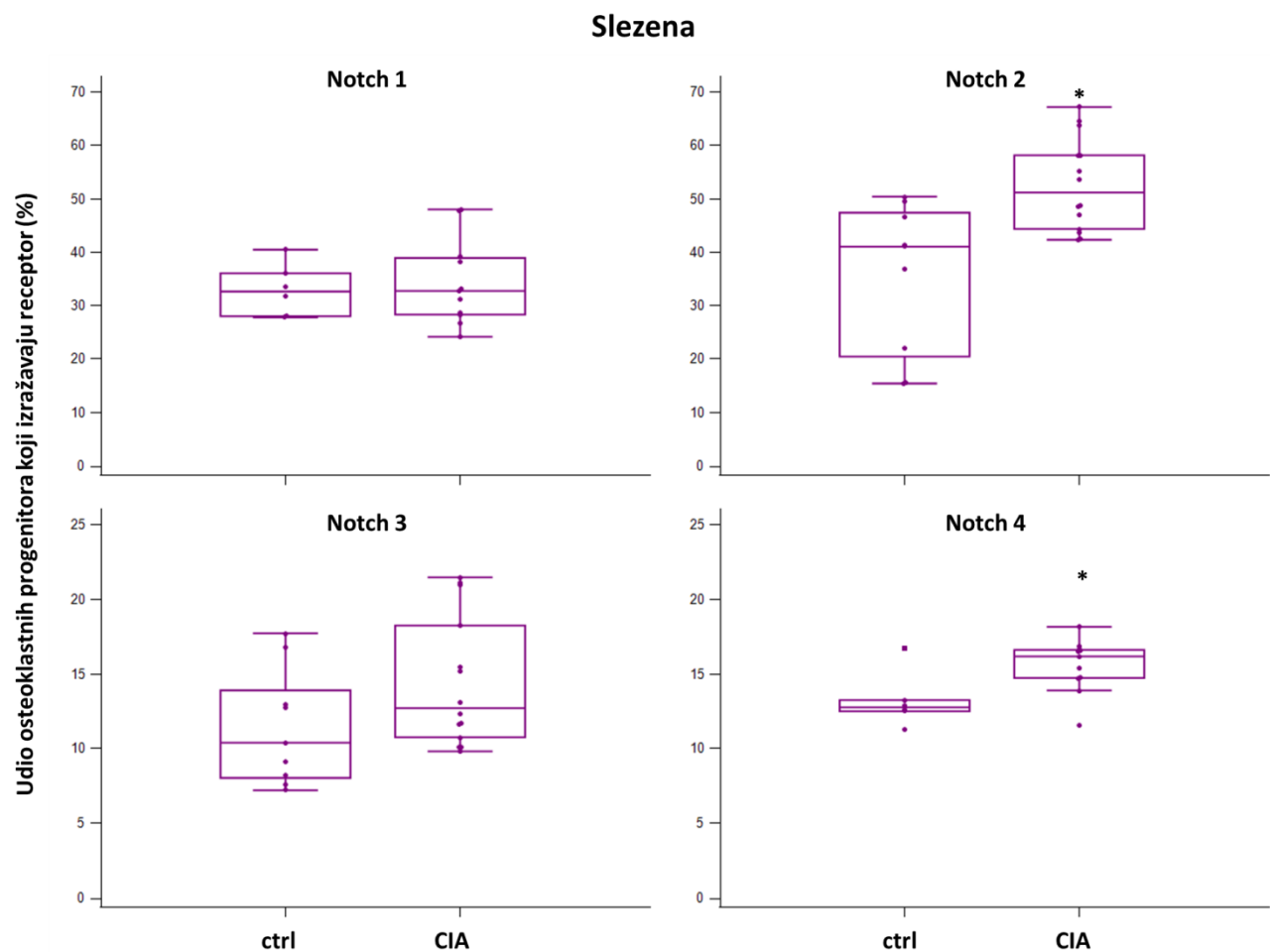
U slezeni receptor Notch 1 izražava oko 30%, Notch 2 oko 40%, Notch 3 i Notch 4 oko 10% osteoklastnih progenitora (Slika 13). U artritisu raste udio osteoklastnih progenitora koji izražavaju receptor Notch 2 (na oko 50%) i Notch 4 (na oko 15%). Izražaj receptora signalnog puta Notch na osteoklastnim progenitorima iz periferne krvi sličan je kao u osteoklastnim progenitorima iz slezene, s time da u artritisu dodatno raste izražaj receptora Notch 3 (s oko 5% na oko 15%) (Slika 14).



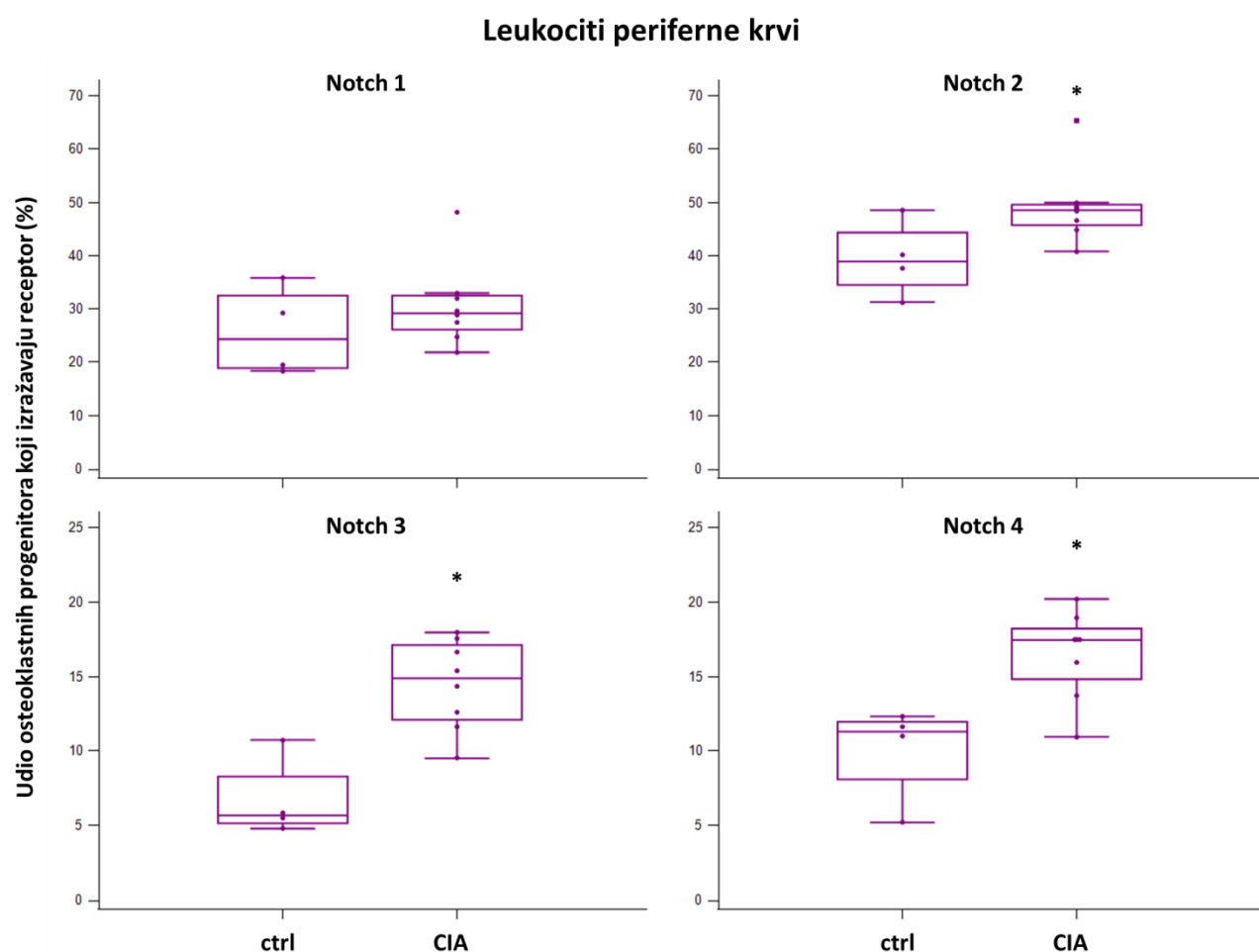
**Slika 11. Izražaj pojedinih receptora signalnog puta Notch na osteoklastnim progenitorima periartikularne koštane srži.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž analizirana je protočnom citometrijom. Prikazan je udio stanica osteoklastnih progenitora (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>) koji izražava pojedini receptor Notch signalnog puta, u neimuniziranih (ctrl) i artritičnih (CIA) miševa. Rezultati su prikazani kao medijan uz interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na kontrolu (Mann-Whitney U test).



**Slika 12. Izražaj pojedinih receptora signalnog puta Notch na osteoklastnim progenitorima sustavne koštane srži.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i sustavna koštana srž analizirana je protočnom citometrijom. Prikazan je udio stanica osteoklastnih progenitora ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) koji izražava pojedini receptor Notch signalnog puta, u neimuniziranih (ctrl) i artritičnih (CIA) miševa. Rezultati su prikazani kao medijan uz interkvartilni raspon. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (Mann-Whitney U test).



**Slika 13. Izražaj pojedinih receptora signalnog puta Notch na osteoklastnim progenitorima slezene.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i suspenzija slezene analizirana je protočnom citometrijom. Prikazan je udio stanica osteoklastnih progenitora (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>) koji izražava pojedini receptor Notch signalnog puta, u neimuniziranih (ctrl) i artritičnih (CIA) miševa. Rezultati su prikazani kao medijan uz interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na kontrolu (Mann-Whitney U test).

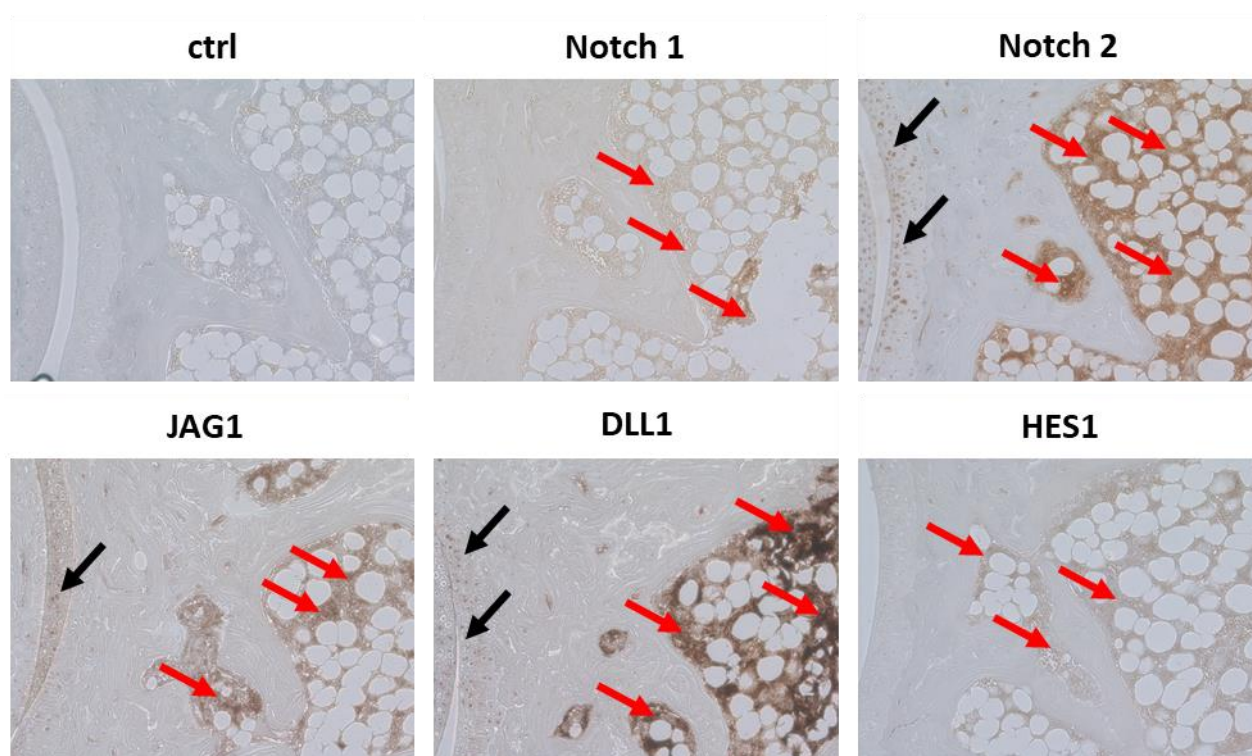


**Slika 14. Izražaj pojedinih receptora signalnog puta Notch na osteoklastnim progenitorima periferne krvi.**

Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i leukociti periferne krvi analizirani su protočnom citometrijom. Prikazan je udio stanica osteoklastnih progenitora (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>) koji izražava pojedini receptor Notch signalnog puta, u neimuniziranih (ctrl) i artritičnih (CIA) miševa. Rezultati su prikazani kao medijan uz interkvartilni raspon.

\*p < 0,05 u odnosu na kontrolu (Mann-Whitney U test).

Osim protočno-citometrijski, proteinsku razinu komponenata signalnog puta Notch analizirali smo i imunohistokemijski, na histološkim rezovima stražnjih šapa. Potvrdili smo izražaj receptora Notch 1 i Notch 2, liganada DLL1 i JAG1 te transkripcijskog cilja HES1 u miševa s artritismom (Slika 15). Kako smo već prije pokazali, imunizirani miševi imaju infiltraciju hematopoetskih stanica u periartikularnu koštanu srž, dok periartikularnu koštanu srž neimuniziranih miševa pretežito čine masne stanice (53, 102). Stanice koštane srži imaju jak izražaj oba liganada (DLL1 i JAG1) i receptora Notch 2 u koštanoj srži, a njihov izražaj možemo vidjeti i u hondrocitima. S druge strane receptor Notch 1 izražava tek dio stanica koštane srži. Također, izražaj transkripcijskog čimbenika HES1 poglavito se uočava u stanicama koštane srži (Slika 15).



**Slika 15. Imunohistokemijska analiza izražaja komponenti signalnog puta Notch u zglobovima stražnjih šapa miševa s artritismom.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i stražnje su šape pripremljene za histološku analizu. Izražaj receptora Notch 1 i Notch 2, liganada JAG1 i DLL1 te transkripcijskog cilja HES1 analiziran je imunohistokemijski na histološkim rezovima tibiotarnog zgloba u sagitalnoj ravni. Vežanje protutijela vizualizirano je razvijanjem smeđe boje 3,3'-diaminobenzidin (DAB). Rezultati su interpretirani u odnosu na negativne kontrolne rezove bez dodanih primarnih protutijela (ctrl bojanja), a pozitivnost je razmatrana u koštano tkivu (zglobna hrskavica i subhondralna kost) i u hematopoetskim stanicama koštane srži, uz povećanje 200x. Crvene strelice – koštana srž, crne strelice – hondrociti.



## **5.2. Inhibicija signalnog puta Notch neutralizacijskim protutijelima *in vitro* i *in vivo***

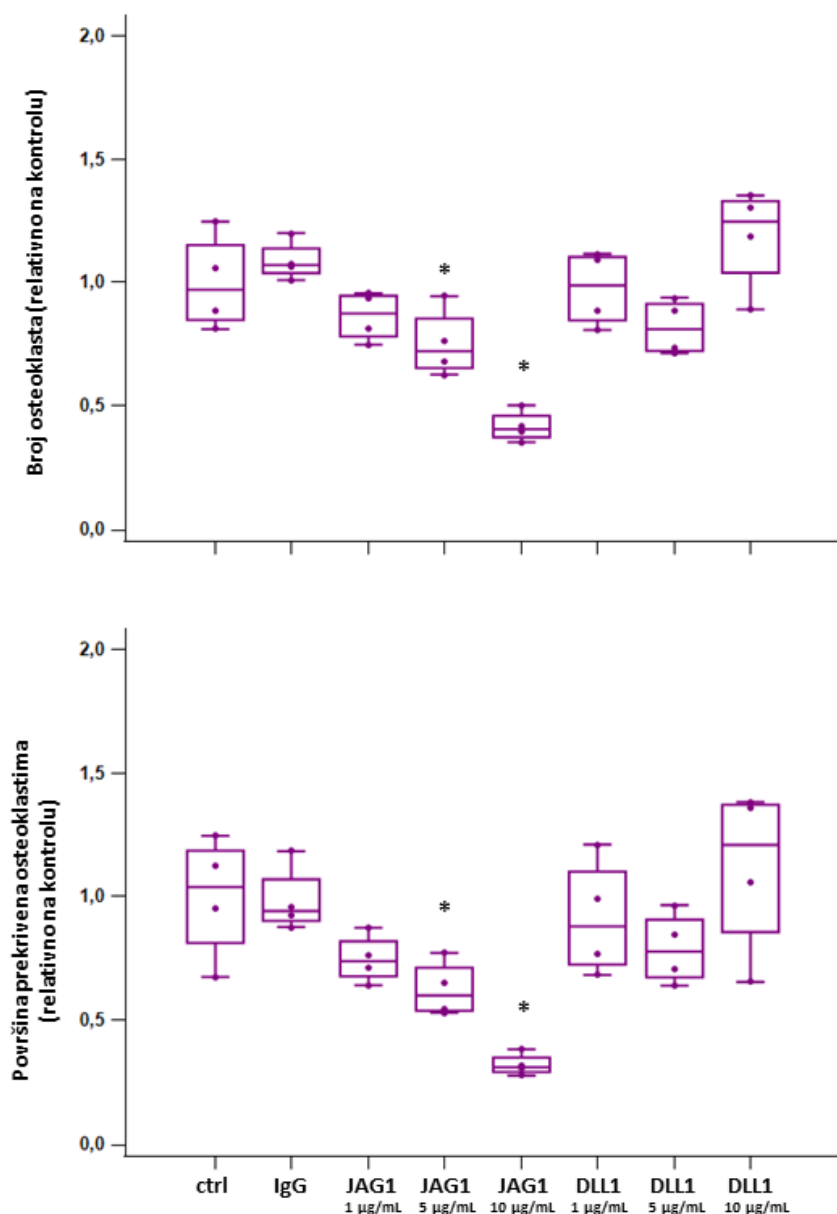
U dosadašnjem prikazu rezultata potvrdili smo izražaj receptora i liganada signalnog puta Notch na osteoklastnim progenitorima u koštanoj srži i na periferiji. Sljedeći korak nam je bio utvrditi kako na razvoj osteoklasta djeluje modulacija signalnog puta Notch putem Notch-liganda.

### **5.2.1. Učinak liganda Notch na diferencijaciju mišjih osteoklasta *in vitro***

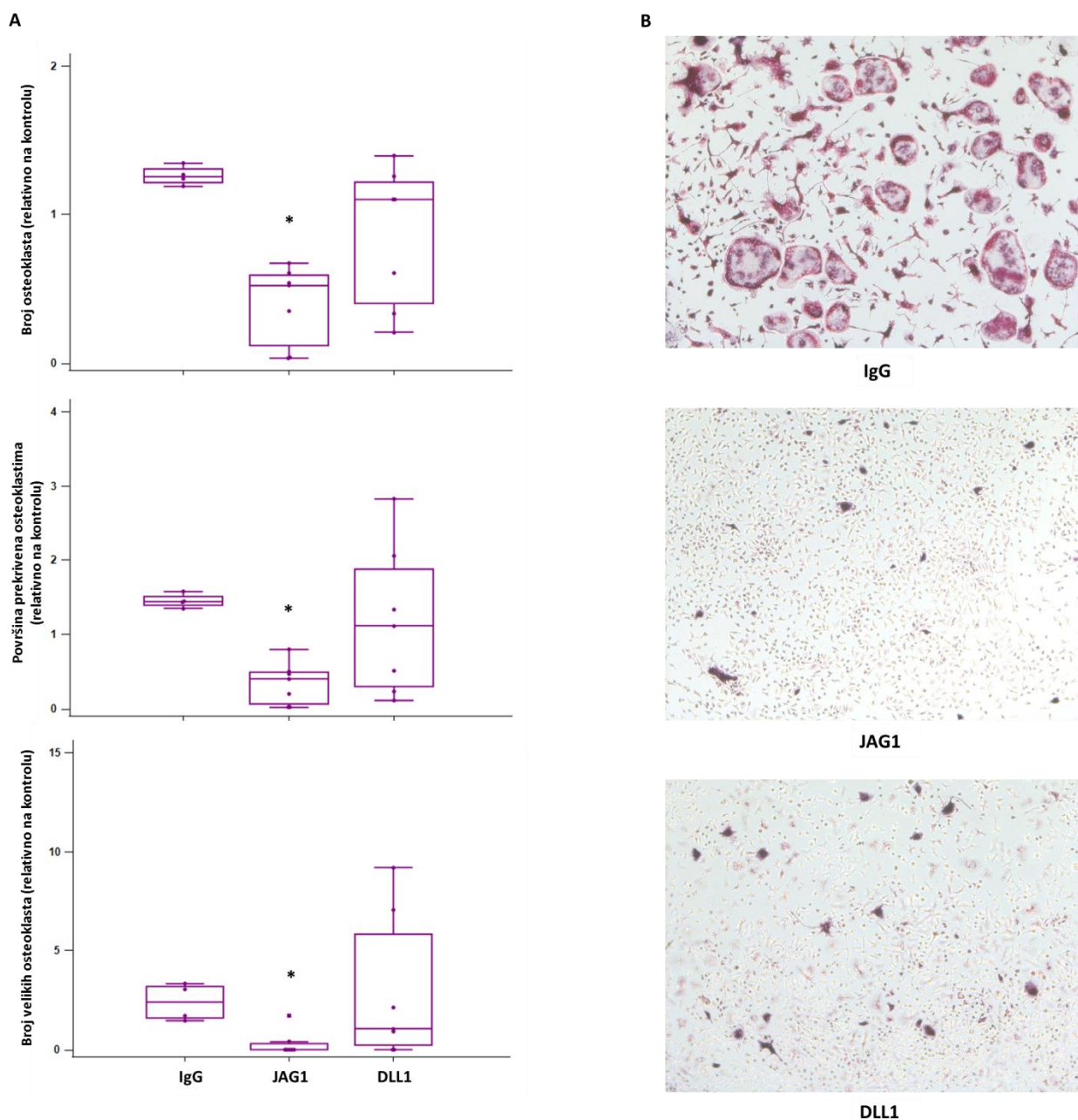
Kako bismo utvrdili učinak stimulacije signalnog puta Notch na diferencijaciju osteoklasta, potaknuli smo sortirane osteoklastne progenitore u osteoklastogenoj kulturi ligandima JAG1 i DLL1. Za prijenos signala potreban je kontakt između stanica te dodavanje otopljenih liganada u kulturu ne može potaknuti signalni put Notch. Zato smo osteoklastne progenitore posadili u zdence čije smo dno prethodno obložili protutijelom na ljudski IgG, a zatim dodali rekombinantne ligande u obliku vezanom za Fc-fragment imunoglobulina JAG1-Fc ili DLL1-Fc, prema opisanom protokolu istraživanja Ashley i suradnika (88). Time smo osigurali da su ligandi Notch imobilizirani na dnu zdenca te vezanjem na receptor Notch dovode do konformacijske promjene receptora, što omogućava cijepanje i prijenos signala unutar stanice.

U prvom setu pokusa istražili smo učinak različitih koncentracija liganada na diferencijaciju osteoklasta. Zasadili smo sortirane osteoklastne progenitore iz periartikularne koštane srži kontrolnih miševa na zdence obložene ligandima JAG1 ili DLL1 u trima različitim koncentracijama (1, 5 i 10 µg/mL), uz daljnji dodatak čimbenika RANKL i M-CSF za poticanje diferencijacije osteoklasta. JAG1 već u koncentraciji od 5 µg/mL inhibira diferencijaciju osteoklasta, a taj učinak raste s dozom (Slika 16). Pri koncentraciji od 10 µg/mL, stimulacija ligandom JAG1 trostruko smanjuje broj TRAP<sup>+</sup> osteoklasta. S druge strane, stimulacija ligandom DLL1 nije pokazala učinak ovisan o dozi, uz naznaku inhibicije osteoklastogeneze (Slika 16). U daljnjim pokusima smo koristili dozu od 10 µg/mL za oba liganda.

Sljedeći korak bio je istražiti imaju li ligandi isti učinak na diferencijaciju osteoklastnih progenitora izoliranih iz miševa s artritismom. Kao što možemo vidjeti na Slici 17 poticanje signalnog puta Notch s oba liganda dovelo je do inhibicije osteoklastogeneze, s time da je učinak liganda JAG1 bio snažniji i uzrokovao diferencijaciju manjeg broja manjih osteoklasta. Taj nalaz mogao bi upućivati na zaključak da su osteoklastni progenitori u artritisu podložniji regulaciji signalnim putem Notch od progenitora iz kontrolnih miševa. Sukladno učinku na broj osteoklasta, stimulacijom ligandima JAG1 i DLL1 uočili smo višestruko povećan izražaj gena specifičnih za mijeloidnu lozu *Fms* i *Rank*, dok su geni specifični za diferencijaciju osteoklasta *Fos* i *Ctsk* bili višestruko niži u preosteoklastima stimuliranim ligandima (Slika 18).

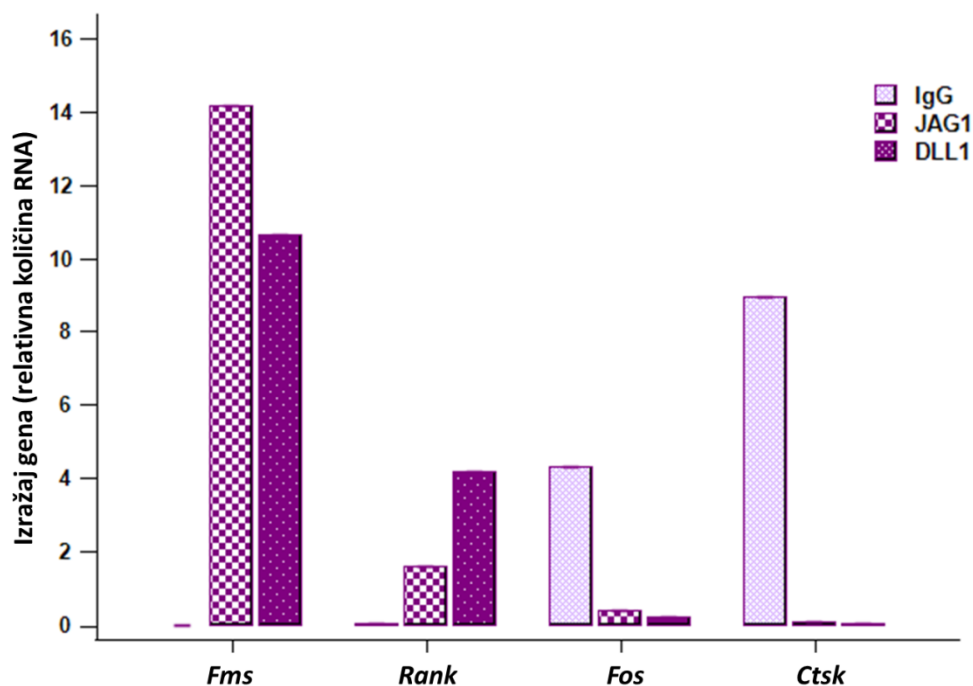


**Slika 16. Ispitivanje učinka različitih doza liganada JAG1 i DLL1 na diferencijaciju osteoklasta kontrolnih neimuniziranih miševa.** Neimunizirani miševi starosti 3-4 mjeseca su žrtvovani, te je izolirana periartikularna koštana srž iz distalnih tibija, analizirana je protočnom citometrijom te su razvrstane stanice osteoklastnih progenitora ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) zasađene u osteoklastogenu kulturu potaknutu čimbenicima RANKL i M-CSF. Zdenci su prethodno obloženi anti-ljudskim IgG te imobiliziranim ligandima signalnog puta Notch u različitim koncentracijama. Prikazan je broj osteoklasta i površina zdenca prekrivena osteoklastima, normalizirano na kontrolnu kulturu (ctrl). Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (Kruskal-Wallisov test). IgG – zdenci obloženi anti-ljudskim IgG.



**Slika 17. Ispitivanje učinka liganada JAG1 i DLL1 na diferencijaciju osteoklasta u miševa s artritisom.**

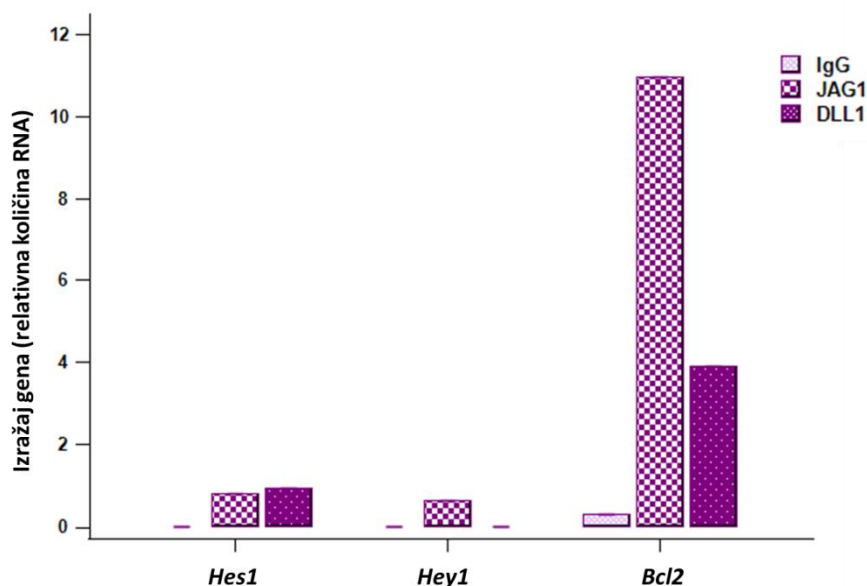
Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž analizirana je protočnom citometrijom. Razvrstane su stanice osteoklastnih progenitora ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) te su zasađene u osteoklastogenu kulturu potaknutu čimbenicima RANKL i M-CSF. Zdenci su prethodno obloženi anti-ljudskim IgG te imobiliziranim ligandima signalnog puta Notch u koncentraciji 10  $\mu\text{g/mL}$ . (A) Prikazan je broj osteoklasta, površina zdenca prekrivena osteoklastima i broj velikih osteoklasta (veći od 125  $\mu\text{m}$ ), normalizirano na kontrolnu kulturu. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (Kruskal-Wallisov test). (B) Prikazana su reprezentativna vidna polja  $TRAP^+$  osteoklasta pod svjetlosnim mikroskopom (100x) nakon 4 dana kulture u obloženim zdencima. IgG – zdenci obloženi anti-ljudskim IgG.



**Slika 18. Izražaj osteoklastnih diferencijacijskih gena nakon poticanja signalnog puta Notch ligandima.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž analizirana je protočnom citometrijom. Razvrstane su stanice osteoklastnih progenitora ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) te su zasađene u osteoklastogenu kulturu potaknutu čimbenicima RANKL i M-CSF u zdence prethodno obložene anti-ljudskim IgG te ligandima JAG1 ili DLL1 u koncentraciji 10  $\mu\text{g/mL}$ . Iz stanica je izolirana RNA drugi dan kulture, prepisana u cDNA i određen je izražaj gena pomoću qPCR-a. Na grafovima je prikazan izražaj diferencijacijskih gena kao relativna količina RNA u odnosu na endogenu kontrolu *Hmbs*.

### 5.2.2. Aktivacija transkripcijskih ciljeva signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima

Aktivacija transkripcijskih ciljeva signalnog puta Notch potvrđena je i analizom izražaja gena koji predstavljaju transkripcijske ciljeve signalnog puta Notch (*Hes1*, *Hey1* i *Bcl2*) u uzorcima izoliranim iz staničnih kultura preosteoklasta u zdencima obloženim ligandima. Za anti-apoptotski gen *Bcl2* opisano je da je podložan regulaciji signalnim putem Notch (119). U stanicama potaknutim ligandom JAG1 višestruko je veći izražaj gena *Hes1*, *Hey1* i *Bcl2*, dok je u stanica potaknutim ligandom DLL1 pojačan izražaj gena *Hes1* i *Bcl2*. Ligandi podjednako potiču izražaj gena *Hes1*, dok je izražaj *Bcl2* jače potaknut ligandom JAG1 (Slika 19). S obzirom na to da se gen *Bcl2* nametnuo kao dobar pokazatelj aktivacije signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima, nadalje smo ga koristili za potvrdu modulacije signalnog puta Notch.



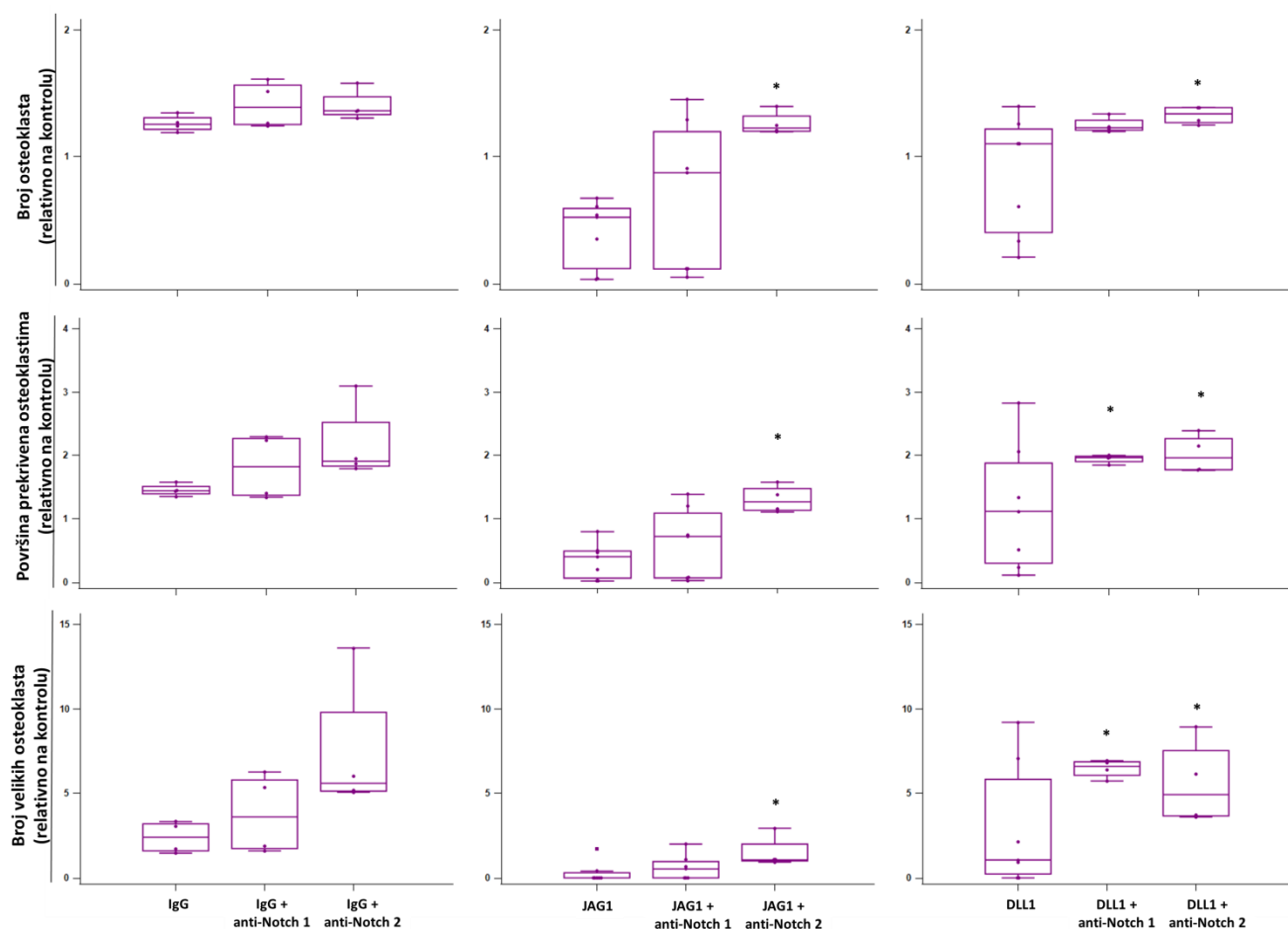
**Slika 19. Izražaj transkripcijskih ciljeva nakon poticanja ligandima signalnog puta Notch.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž analizirana je protočnom citometrijom. Razvrstane su stanice osteoklastnih progenitora ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{+/-}CD115^+$ ) te su zasađene u osteoklastogenu kulturu potaknutu čimbenicima RANKL i M-CSF u zdence prethodno obložene anti-ljudskim IgG te ligandima JAG1 ili DLL1 u koncentraciji 10  $\mu\text{g/mL}$ . Iz stanica je izolirana RNA drugi dan kulture, prepisana u cDNA i određen je izražaj gena pomoću qPCR-a. Na grafovima je prikazan izražaj gena transkripcijskih ciljeva signalnog puta Notch kao relativna količina RNA u odnosu na endogenu kontrolu *Hmbs*.

### 5.2.3. Učinak inhibicije signalnog puta Notch na diferencijaciju mišjih osteoklastnih progenitora *in vitro*

Nakon što smo pokazali da signal putem liganada Notch ima učinak na diferencijaciju osteoklastnih progenitora, proveli smo pokuse u kojima smo selektivno inhibirali receptore Notch *in vitro* i *in vivo*. Koristili smo neutralizacijska protutijela koja se vežu na domenu NRR pojedinog receptora i sprječavaju cijepanje receptora te prijenos signala unutar stanice.

Razvrstane osteoklastne progenitore zasadili smo u zdence prethodno obložene ligandima JAG1 ili DLL1 u koncentraciji od 10  $\mu\text{g/mL}$ , dok su kontrolni zdenci bili obloženi samo nespecifičnim anti-IgG. U stanični medij dodali smo 20  $\mu\text{g/mL}$  protutijela anti-Notch 1 ili anti-Notch 2, a u kontrolne zdence kontrolna protutijela. Dodavanje protutijela u kontrolne zdence nije imalo učinak na ukupni broj diferenciranih osteoklasta i površinu prekrivenu osteoklastima, ali osteoklasti uzgajani s dodatkom anti-Notch 2 protutijela bili su nešto veći nego uz dodatak kontrolnih protutijela. Nadalje, inhibicijom receptora Notch 2 dijelom je poništen inhibicijski učinak liganda JAG1 na diferencijaciju osteoklasta te je broj osteoklasta u obrađenoj skupini

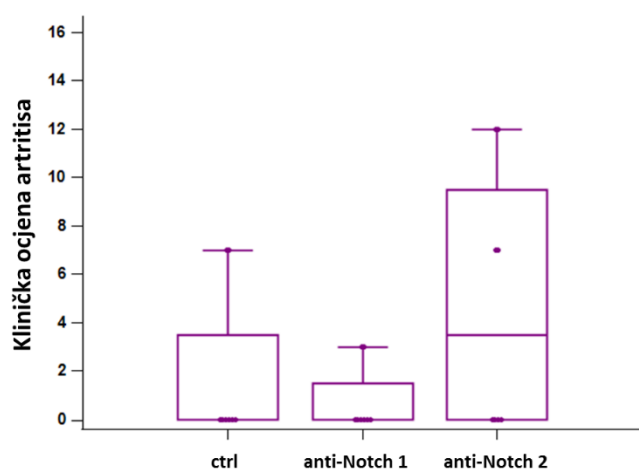
bio jednak broju u kontrolnim IgG zdencima. Dodavanjem anti-Notch 1 protutijela u istoj koncentraciji nismo postigli značajan učinak. Kako inhibicija osteoklastogeneze ligandom DLL1 nije bila toliko snažna kao ligandom JAG1, oba protutijela imala su značajan učinak i rezultirala većim ukupnim brojem osteoklasta kao i stvaranjem većih osteoklasta (Slika 20).



**Slika 20. Ispitivanje *in vitro* učinka neutralizacijskih protutijela na receptore Notch 1 i 2 na diferencijaciju osteoklasta u miševa s artritisom.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž analizirana je protočnom citometrijom. Razvrstani osteoklastni progenitori ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) zasađeni su u osteoklastogenu kulturu potaknutu čimbenicima RANKL i M-CSF. Zdenci su prethodno obloženi anti-ljudskim IgG te ligandima JAG1 ili DLL1 u koncentraciji 10  $\mu\text{g/mL}$ . U zdence su dodana anti-Notch 1 ili anti-Notch 2 protutijela ili kontrolna protutijela u koncentraciji od 20  $\mu\text{g/mL}$ . Prikazan je broj osteoklasta, površina zdenca prekrivena osteoklastima i broj velikih osteoklasta (veći od 125  $\mu\text{m}$ ) normalizirano na kontrolnu kulturu. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \* $p < 0,05$  u odnosu na kontrolu (Kruskal-Wallisov test).

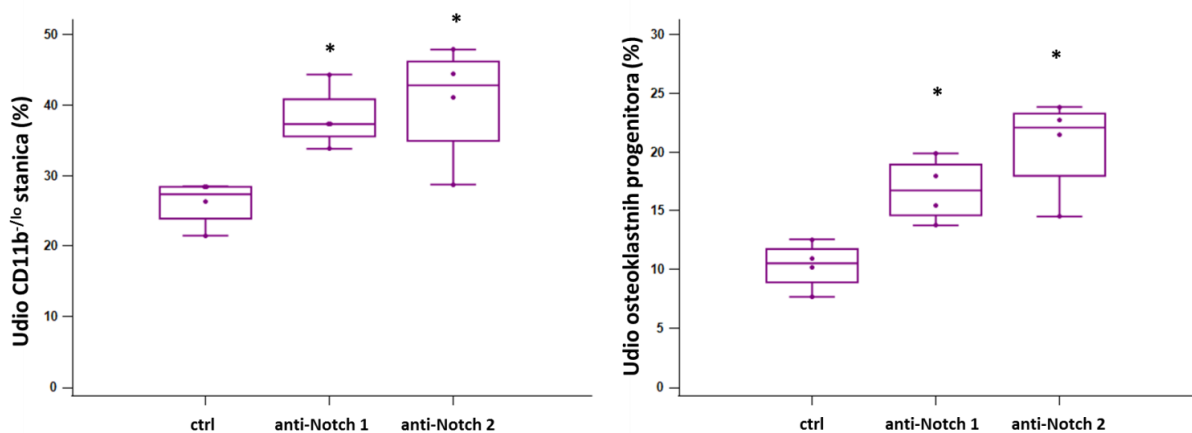
#### 5.2.4. Učinak inhibicije signalnog puta Notch na diferencijaciju osteoklastnih progenitora i aktivnost mišjih osteoklasta *in vivo*

Uz *in vitro* model, neutralizacijska protutijela primijenili smo u imuniziranih miševa *in vivo*, počevši od 19. dana nakon primarne imunizacije. Miševi su intraperitonealno dobivali 1 mg/kg anti-Notch 1, anti-Notch 2 ili kontrolnih protutijela svaki treći dan. Nakon 33 dana od početka protokola izazivanja artritisa, miševi su žrtvovani te je iz prikupljenih tkiva analiziran fenotip stanica koštane srži, slezene i periferne krvi, ispitan je osteoklastogeni potencijal izoliranih progenitora, izražaj gena kultiviranih preosteoklasta te je analizirana koštana resorpcija.

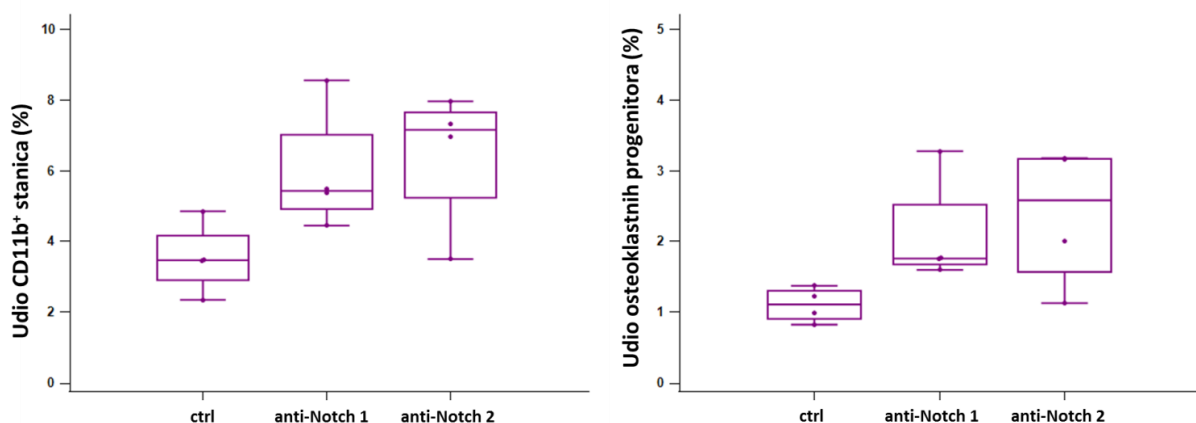


**Slika 21. Učinak obrade neutralizacijskim protutijelima na receptore Notch 1 i 2 *in vivo* na incidenciju i intenzitet artritisa.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Od 19. dana nakon primarne imunizacije miševi su intraperitonealno dobivali 1 mg/kg anti-Notch 1, anti-Notch 2 ili kontrolnih (ctrl) protutijela svaki treći dan. Od sekundarne imunizacije do žrtvovanja klinički je praćen razvoj znakova artritisa uz bodovanje svake šape zasebno. Maksimalni ukupni zbroj po mišu iznosi 16 bodova. Prikazana je klinička ocjena artritisa za svakog miša u pokusnoj skupini i rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

Klinički nismo uočili značajnu razliku u težini artritisa između miševa koji su dobivali neutralizacijska protutijela i miševa koji su dobivali kontrolna protutijela (Slika 21). Postoji velika heterogenost unutar pojedinih skupina jer je incidencija artritisa u modelu CIA u miševa soja C57BL/6 oko 60%, pa dio miševa nije razvio artritis. Miševi obrađeni neutralizacijskim protutijelima imaju značajno više osteoklastnih progenitora CD115<sup>+</sup> u periartikularnoj koštanoj srži od kontrolnih miševa, a također imaju značajno veći udio mijeloidnih stanica CD11b<sup>-/lo</sup> (Slika 22), populacije za koje smo prethodno pokazali da su pozitivno povezane s intenzitetom artritisa (53, 102). Miševi su također imali veći udio mijeloidnih stanica CD11b<sup>+</sup> i osteoklastnih progenitora CD115<sup>+</sup> u slezeni, no razlika između skupina nije bila značajna (Slika 23).

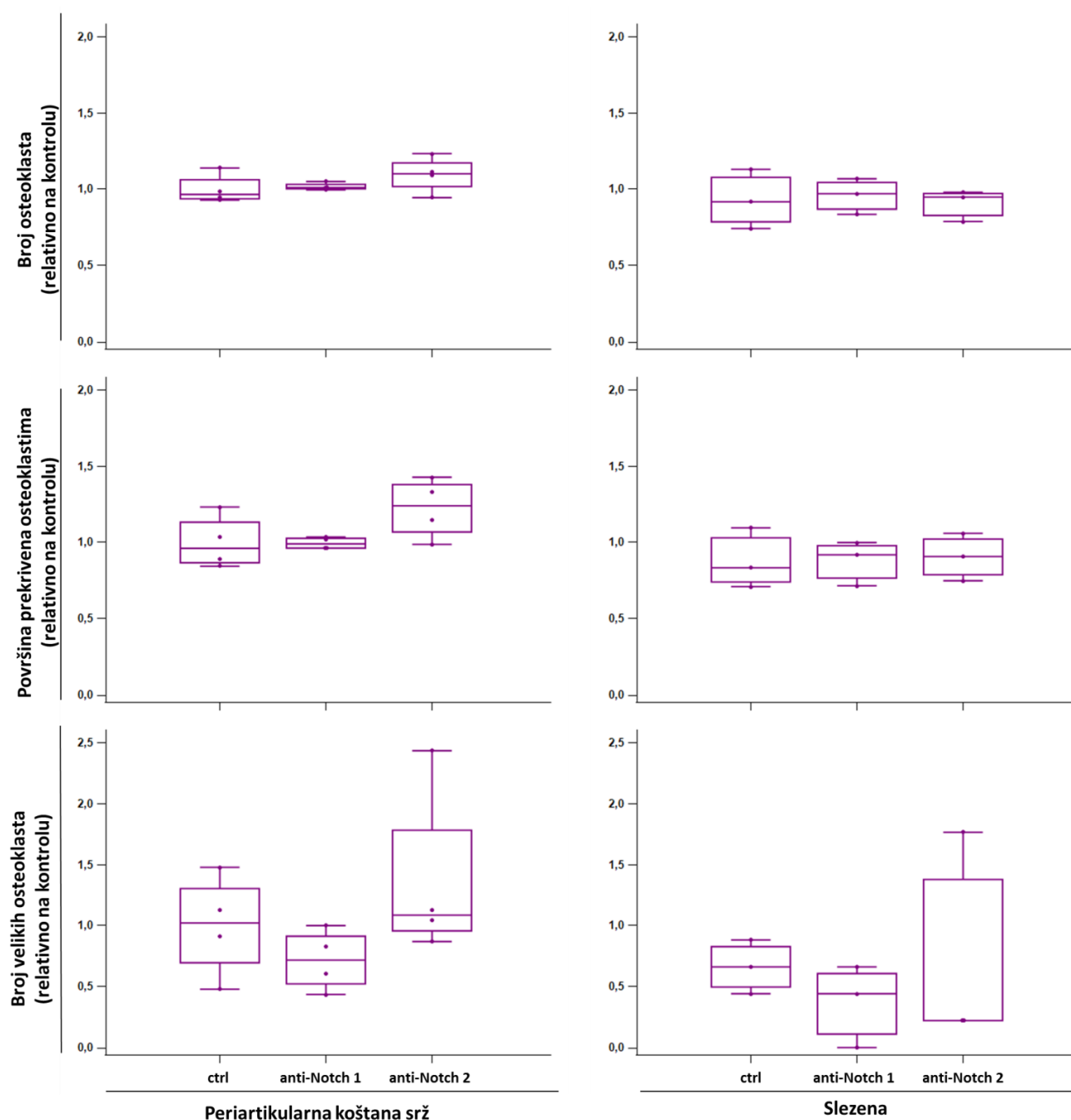


**Slika 22. Učinak obrade neutralizacijskim protutijelima na receptore Notch 1 i 2 *in vivo* na udio stanica povezanih s artritisom u periartikularnoj koštanoj srži.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Od 19. dana nakon primarne imunizacije miševi su intraperitonealno dobivali 1 mg/kg anti-Notch 1, anti-Notch 2 ili kontrolnih (ctrl) protutijela svaki treći dan. Miševi su žrtvovani 33 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž analizirana je protočnom citometrijom. Prikazan je udio mijeloidnih stanica CD11b<sup>-/-</sup> i osteoklastnih progenitora (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/-</sup>CD115<sup>+</sup>) u odnosu na populaciju CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na miševe koji su obrađeni kontrolnim protutijelima (Kruskal-Wallisov test).



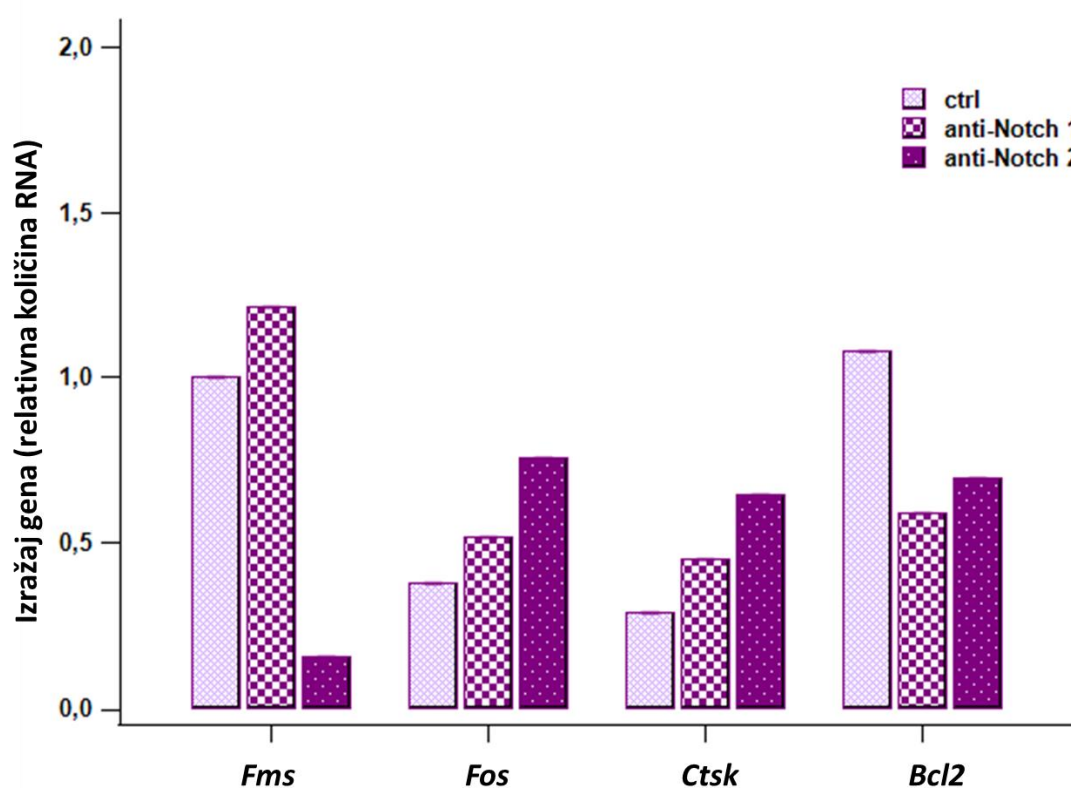
**Slika 23. Učinak obrade neutralizacijskim protutijelima na receptore Notch 1 i 2 *in vivo* na udio stanica povezanih s artritisom u slezeni.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Od 19. dana nakon primarne imunizacije miševi su intraperitonealno dobivali 1 mg/kg anti-Notch 1, anti-Notch 2 ili kontrolnih (ctrl) protutijela svaki treći dan. Miševi su žrtvovani 33 dana nakon primarne imunizacije i suspenzija slezene je analizirana protočnom citometrijom. Prikazan je udio mijeloidnih stanica CD11b<sup>+</sup> i osteoklastnih progenitora (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>) u odnosu na populaciju CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.



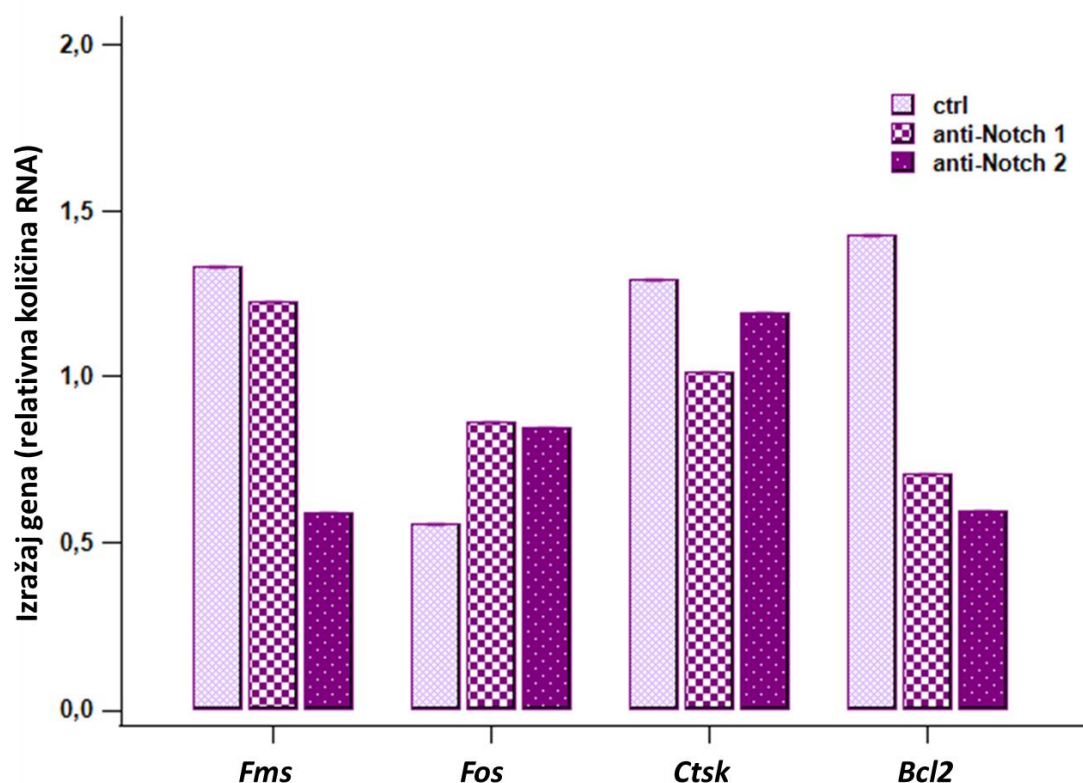


**Slika 24. Učinak obrade neutralizacijskim protutijelima na receptore Notch 1 i 2 *in vivo* na diferencijaciju osteoklasta *in vitro*.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Od 19. dana nakon primarne imunizacije miševi su intraperitonealno dobivali 1 mg/kg anti-Notch 1, anti-Notch 2 ili kontrolnih (ctrl) protutijela svaki treći dan. Miševi su žrtvovani 33 dana nakon primarne imunizacije, a razvrstani osteoklastni progenitori iz periartikularne koštane srži ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) i slezene ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+CD115^+$ ) zasađeni su u osteoklastogenu kulturu. Prikazan je broj osteoklasta, površina zdenca prekrivena osteoklastima i broj velikih osteoklasta (veći od 125  $\mu m$ ) normalizirano na kontrolnu kulturu. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \* $p < 0,05$  u odnosu na miševe koji su obrađeni kontrolnim protutijelima (Kruskal-Wallisov test).

Nadalje smo iz periartikularne koštane srži i slezene miševa obrađenih neutralizacijskim protutijelima izolirali osteoklastne progenitore te ih uzgojili u osteoklastogenoj kulturi. Međutim, između skupina miševa nismo uočili značajne razlike u broju i veličini osteoklasta (Slika 24). Na genskoj razini, preosteoklasti periartikularne koštane srži izolirani iz osteoklastogene kulture u skupini obrađenoj protutijelom anti-Notch 2 izražavaju manje gena za *Fms*, a više gena za *Fos* i *Ctsk* od kontrolnih miševa, dok je učinak na pojačanje izražaja gena za *Fos* i *Ctsk* slabiji u skupini obrađenoj protutijelom anti-Notch 1 (Slika 25). U odnosu na koštanu srž, učinak na preosteoklaste u slezeni sličan je za gene *Fms* i *Fos* (Slika 26). Također obrada protutijelima smanjila je izražaj gena *Bcl2*, što govori u prilog kočenju signalnog puta Notch nakon davanja protutijela *in vivo*.

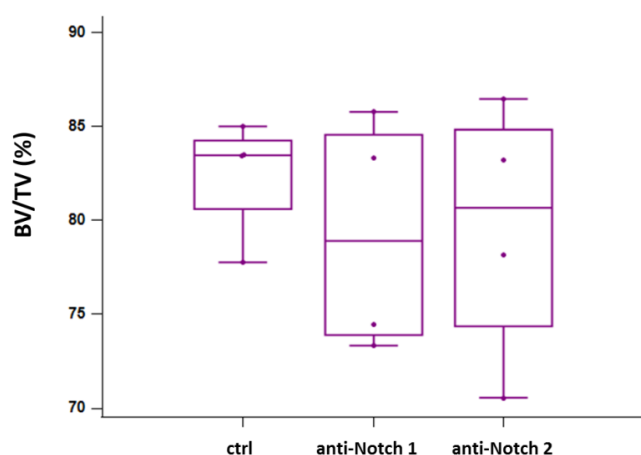


**Slika 25. Učinak obrade neutralizacijskim protutijelima na receptore Notch 1 i 2 *in vivo* na izražaj diferencijacijskih gena u preosteoklastima iz periartikularne koštane srži.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Od 19. dana nakon primarne imunizacije miševi su intraperitonealno dobivali 1 mg/kg anti-Notch 1, anti-Notch 2 ili kontrolnih (ctrl) protutijela svaki treći dan. Miševi su žrtvovani 33 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž analizirana je protočnom citometrijom. Razvrstane su stanice osteoklastnih progenitora ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) te su zasađene u osteoklastogenu kulturu potaknutu čimbenicima RANKL i M-CSF. Iz stanica je izolirana RNA drugi dan kulture, prepisana u cDNA i određen je izražaj gena pomoću qPCR-a. Na grafovima je prikazan izražaj osteoklastnih diferencijacijskih gena kao relativna količina RNA u odnosu na endogenu kontrolu *Hmbs*.

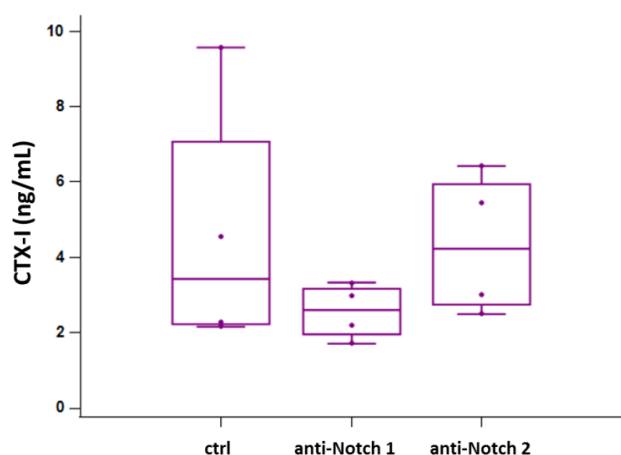


**Slika 26. Učinak obrade neutralizacijskim protutijelima na receptore Notch 1 i 2 *in vivo* na izražaj osteoklastnih diferencijacijskih gena u preosteoklastima iz slezene.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Od 19. dana nakon primarne imunizacije miševi su intraperitonealno dobivali 1 mg/kg anti-Notch 1, anti-Notch 2 ili kontrolnih (ctrl) protutijela svaki treći dan. Miševi su žrtvovani 33 dana nakon primarne imunizacije i suspenzija slezene je analizirana protočnom citometrijom. Razvrstane su stanice osteoklastnih progenitora (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>) te su zasađene u osteoklastogenu kulturu potaknutu čimbenicima RANKL i M-CSF. Iz stanica je izolirana RNA drugi dan kulture, prepisana u cDNA i određen je izražaj gena pomoću qPCR-a. Na grafovima je prikazan izražaj osteoklastnih diferencijacijskih gena kao relativna količina RNA u odnosu na endogenu kontrolu *Hmbs*.

Analizom koštanog volumena talusa postupkom  $\mu$ CT, nismo uočili značajnu razliku među skupinama, ali životinje koje su dobivale neutralizacijska protutijela imale su nešto manji volumen mineralizirane kosti (Slika 27). Također smo mjerili koncentraciju razgradnog produkta kolagena CTX-I u serumu, međutim nismo utvrdili razlike u razini ovog markera koštane resorpcije među pojedinim skupinama (Slika 28). Razlog takvog nalaza i nepostojanja značajnih razlika može biti u razmjerno malom broju obrađenih miševa i varijabilne težine izazvanog artritisa, što predstavlja nedostatak upotrijebljenog modela artritisa. Također, miševi su žrtvovani u jednoj vremenskoj točki, koja ne mora nužno biti najprikladnija za sve provedene analize.



**Slika 27. Učinak obrade neutralizacijskim protutijelima na receptore Notch 1 i 2 *in vivo* na gubitak koštanog volumena talusa.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Od 19. dana nakon primarne imunizacije miševi su intraperitonealno dobivali 1 mg/kg anti-Notch 1, anti-Notch 2 ili kontrolnih (ctrl) protutijela svaki treći dan. Miševi su žrtvovani 33 dana nakon primarne imunizacije i stražnje šape su izgobljene i fiksirane u 4% paraformaldehidu. Analiza promjena koštanog metabolizma i koštane destrukcije u artritisu napravljena je snimanjem mikrokompjutoriziranom tomografijom i analizom pomoću programa CTAn (SkyScan). Određen je udio mineralizirane (kortikalne i trabekularne) kosti u ukupnom volumenu (BV/TV; %) fragmenta talusa debljine 0,3-0,4 mm u skupini obrađenoj kontrolnim protutijelima te anti-Notch 1 ili anti-Notch 2 protutijelima. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.



**Slika 28. Učinak obrade neutralizacijskim protutijelima na receptore Notch 1 i 2 *in vivo* na koncentraciju CTX-I u serumu.** Miševima je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Od 19. dana nakon primarne imunizacije miševi su intraperitonealno dobivali 1 mg/kg anti-Notch 1, anti-Notch 2 ili kontrolnih (ctrl) protutijela svaki treći dan. Anesteziranim miševima 33 dana nakon primarne iz orbitalnog sinusa uzet je uzorak krvi iz kojeg je izoliran serum. Imunoenzimskom metodom (ELISA, prema engl. enzyme-linked immunosorbent assay) izmjerena je koncentracija C-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (CTX-I, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*). Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

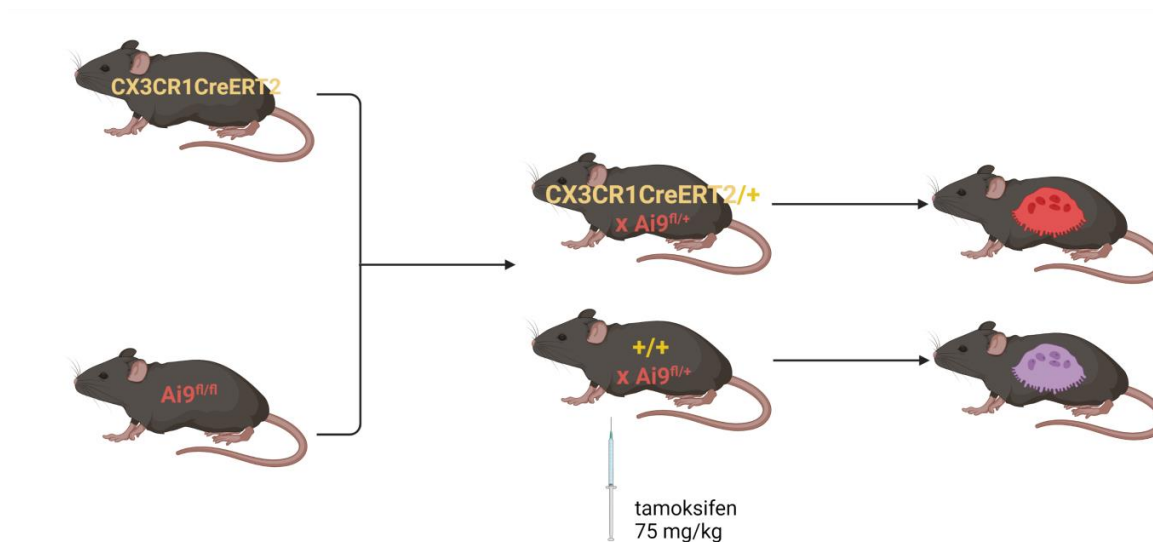
### 5.3. Utišavanje signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima *in vivo*

Prethodno opisanim pokusima s primjenom neutralizacijskih protutijela na receptore Notch ispitali smo učinak inhibicije signalnog puta Notch na aktivnost osteoklasta i koštanu resorpciju. Međutim davanjem protutijela *in vivo* ne osiguravamo specifičnost djelovanja na pojedinu vrstu stanica, tako da učinak protutijela nije nužno rezultat djelovanja samo na osteoklastne progenitore. Brojne stanice, uključujući i koštane i imunosne, izražavaju receptore Notch, pa je davanjem protutijela nemoguće razgraničiti izravne i neizravne učinke neutralizacije signala. U daljnjem istraživanju uloge signalnog puta Notch u modelu artritisa, koristili smo transgenični mišji model u kojem smo selektivno isključili transkripcijski čimbenik Rbpjk (RBP-J) u osteoklastnim progenitorima s aktivnim promotorom za CX3CR1. Uz to, koristili smo u dijelu pokusa mišju liniju CX3CR1CreERT2 križanu s reporterskom mišjom linijom u svrhu vizualizacije rekombinacije Cre, te mišju liniju CX3CR1CreERT2 križanu s linijom u kojoj je pojačan izražaj domene NICD vezane uz receptor Notch 1.

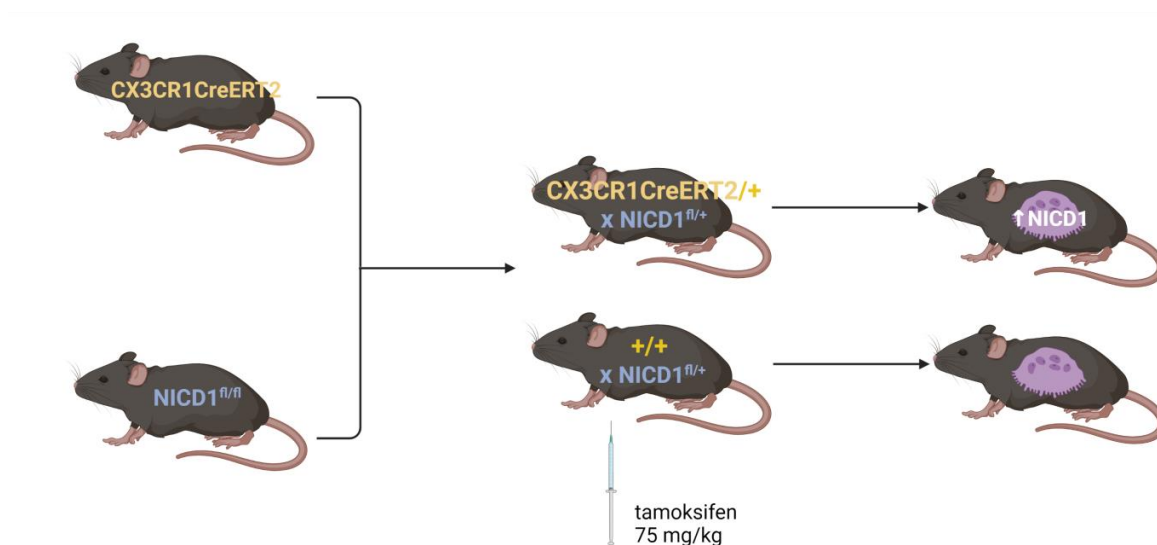
#### 5.3.1. Optimizacija uzgoja i križanja transgeničnih mišjih sojeva

Za sljedeće setove pokusa koristili smo transgenične mišje modele CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup> CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> i CX3CR1CreERT2/NICD1<sup>fl/+</sup>. Ti sojevi sadrže rekombinazu Cre vezanu za modificirani estrogenski receptor (CreERT2) pod kontrolom promotora za kemokinski receptor CX3CR1 (miševi CX3CR1CreERT2), specifično izražen u monocitnoj lozi. Nadalje smo mišji soj CX3CR1CreERT2 križali s mišjim sojem u kojem genu za fluorescentni protein TdTomato prethodi STOP sekvenca označena sekvencama *loxP* (miševi Ai9<sup>fl/fl</sup>) (Slika 29).

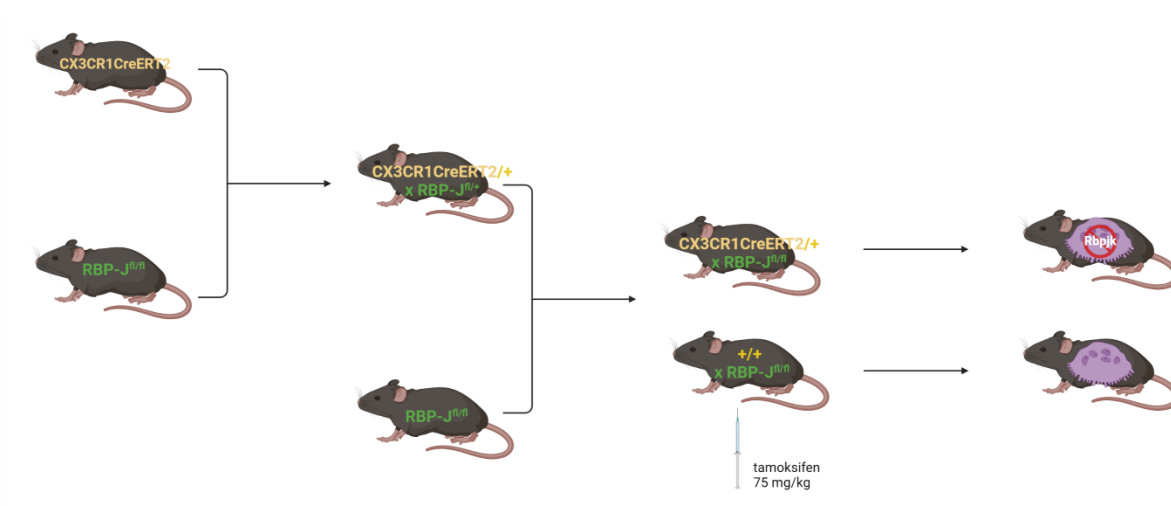
Po istom principu križali smo mišji soj CX3CR1CreERT2 s mišjim sojem NICD<sup>fl/fl</sup> u kojem genu za unutarstaničnu podjedinicu receptora Notch 1 prethodi STOP sekvenca označena sekvencama *loxP*. Miševi potomci imaju pojačan izražaj unutarstanične domene NICD receptora Notch 1 (Slika 30). Mišji soj CX3CR1CreERT2 također smo križali s mišjim sojem u kojem je gen RBP-J, koji posreduje provođenje kanonskog signalnog puta Notch, označen sekvencama *loxP* (Slika 31). S obzirom na to da ciljni miševi moraju biti homozigoti za RBP-J<sup>fl/fl</sup> kako bismo postigli utišavanje kanonskog signalnog puta Notch, križanje provodimo u dva koraka. Miševe po odvajanju genotipiziramo kako bismo potvrdili prisutnost željenog genotipa (Slika 32). U pokusima smo kao kontrolu ciljnom genotipu, koristili miševe koji ne izražavaju rekombinazu Cre (Cre-), te su jednako obrađeni tamoksifenom kao i odgovarajući Cre+ miševi.



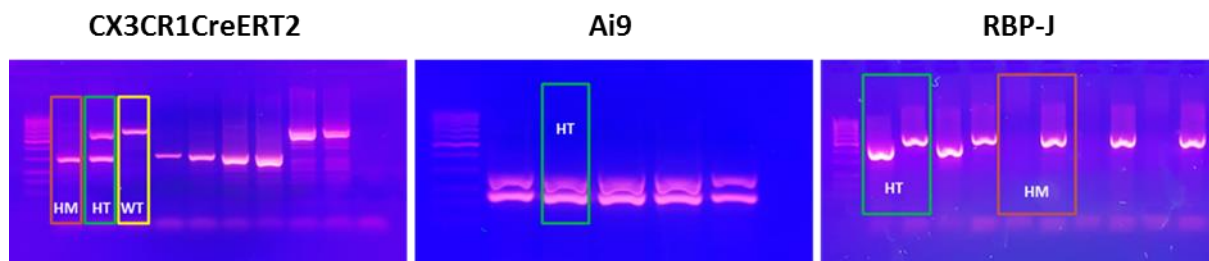
**Slika 29. Prikaz križanja i davanja tamoksifena miševima soja CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup>.** Miševe soja CX3CR1CreERT2 križali smo s miševima soja Ai9<sup>fl/fl</sup>. Potomstvo je heterozigotno za oba alela. Za indukciju Cre-rekombinacije miševima smo davali intraperitonealne injekcije tamoksifena u dozi od 75 mg/kg. Kontrolni miševi bili su miševi Ai9<sup>fl/+</sup> koji ne izražavaju rekombinazu Cre. CX3CR1CreERT2 – rekombinaza Cre vezana za estrogenski receptor pod kontrolom promotora za kemokinski receptor CX3CR1; Ai9<sup>fl</sup> - gen za fluorescentni protein TdTomato kojem prethodi STOP sekvenca između dvije sekvence *loxP*. Napravljeno koristeći BioRender.com



**Slika 30. Prikaz križanja i davanja tamoksifena miševima soja CX3CR1CreERT2/NICD1<sup>fl/+</sup>.** Miševe soja CX3CR1CreERT2 križali smo s miševima soja NICD1<sup>fl/fl</sup>. Potomstvo je heterozigotno za oba alela. Za indukciju Cre-rekombinacije miševima smo davali intraperitonealne injekcije tamoksifena u dozi od 75 mg/kg. Kontrolni miševi bili su miševi NICD1<sup>fl/+</sup> koji ne izražavaju rekombinazu Cre. CX3CR1CreERT2 - rekombinaza Cre vezana za estrogenski receptor pod kontrolom promotora za kemokinski receptor CX3CR1; NICD1<sup>fl</sup> - gen za unutarstaničnu podjedinicu receptora Notch 1 kojem prethodi STOP sekvenca označena sekvencama *loxP*. Napravljeno koristeći BioRender.com



**Slika 31. Prikaz križanja i davanja tamoksifena miševima soja CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup>.** Miševe soja CX3CR1CreERT2 križali smo s miševima soja RBP-J<sup>fl/fl</sup>. Potomstvo je heterozigotno za oba alela te se miševi ponovo križaju s miševima soja RBP-J<sup>fl/fl</sup> kako bi bili homozigotni za RBP-J<sup>fl</sup> na oba alela. Za indukciju Cre-rekombinacije miševima smo davali intraperitonealne injekcije tamoksifena u dozi od 75 mg/kg. CX3CR1CreERT2 - rekombinaza Cre vezana za estrogenski receptor pod kontrolom promotora za kemokinski receptor CX3CR1; RBP-J<sup>fl</sup> – RBP-J gen (koji posreduje provođenje Notch signala) između dvije sekvence *loxP*. Napravljeno koristeći BioRender.com



**Slika 32. Genotipizacija transgeničnih miševa.** Genomska DNA izolira se iz repa okoćenih miševa. Upotrebom odgovarajućih početnica umnaža se divlji tip transkripta ili transgenični transkript kako bi se identificirali miševi divljeg soja te heterozigotni ili homozigotni miševi za ciljani transkript. Na slici su prikazani gelovi nakon elektroforeze DNA izolirane iz repova transgeničnih miševa. HM – homozigoti za transgen; HT – heterozigoti za transgen; WT – miš divljeg genotipa

### 5.3.2. Uvođenje transgeničnih mišjih linija, primjena tamoksifena i praćenje označenih stanica

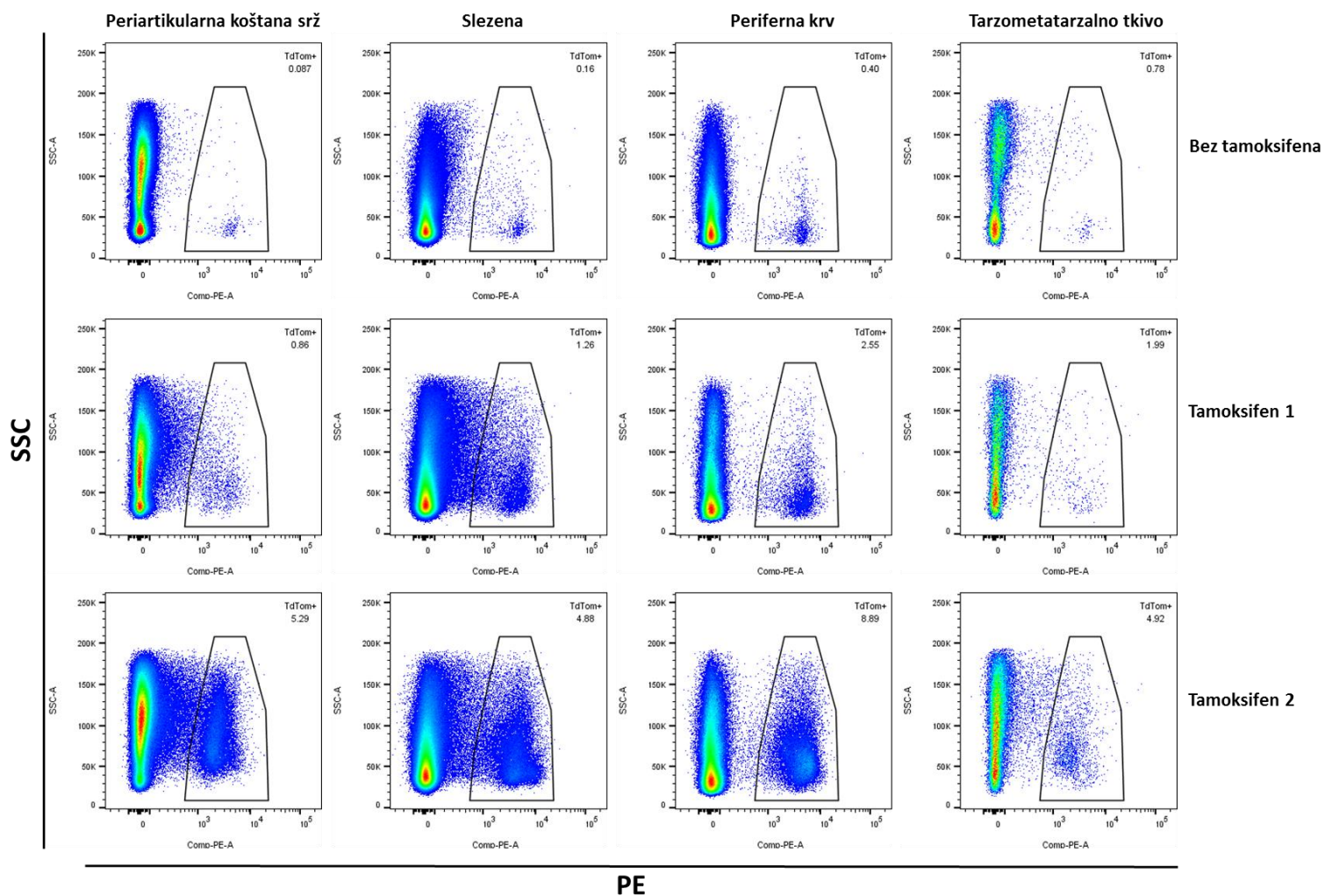
Miševe križanog soja CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup> koristili smo kako bismo utvrdili učinkovitost Cre-rekombinacije, odredili fenotip označenih stanica u pojedinom odjeljku te provjerili osteoklastogeni potencijal Cre<sup>+</sup> stanica. Tamoksifenom inducujemo proizvodnju fluorescentnog proteina TdTomato u stanicama koje u trenutku davanja tamoksifena izražavaju gen za CX3CR1, kao i u svim potomcima tih stanica. Već smo pokazali da ta populacija stanica sadrži u velikom udjelu CD115<sup>+</sup> osteoklastne progenitore. Te stanice potom možemo pratiti na protočnom citometru na kanalu PE, kao i na fluorescentnom mikroskopu.

Najprije smo proveli set pokusa kojima smo utvrdili da nebojene stanice miševa divljeg tipa ne svijetle u PE kanalu, dok nebojene stanice Cre<sup>+</sup> miševa kojima nismo davali tamoksifen imaju nešto zanemarive pozadinske fluorescencije u tom kanalu, znatno manje u odnosu na miševe kojima smo davali tamoksifen (Slika 33).

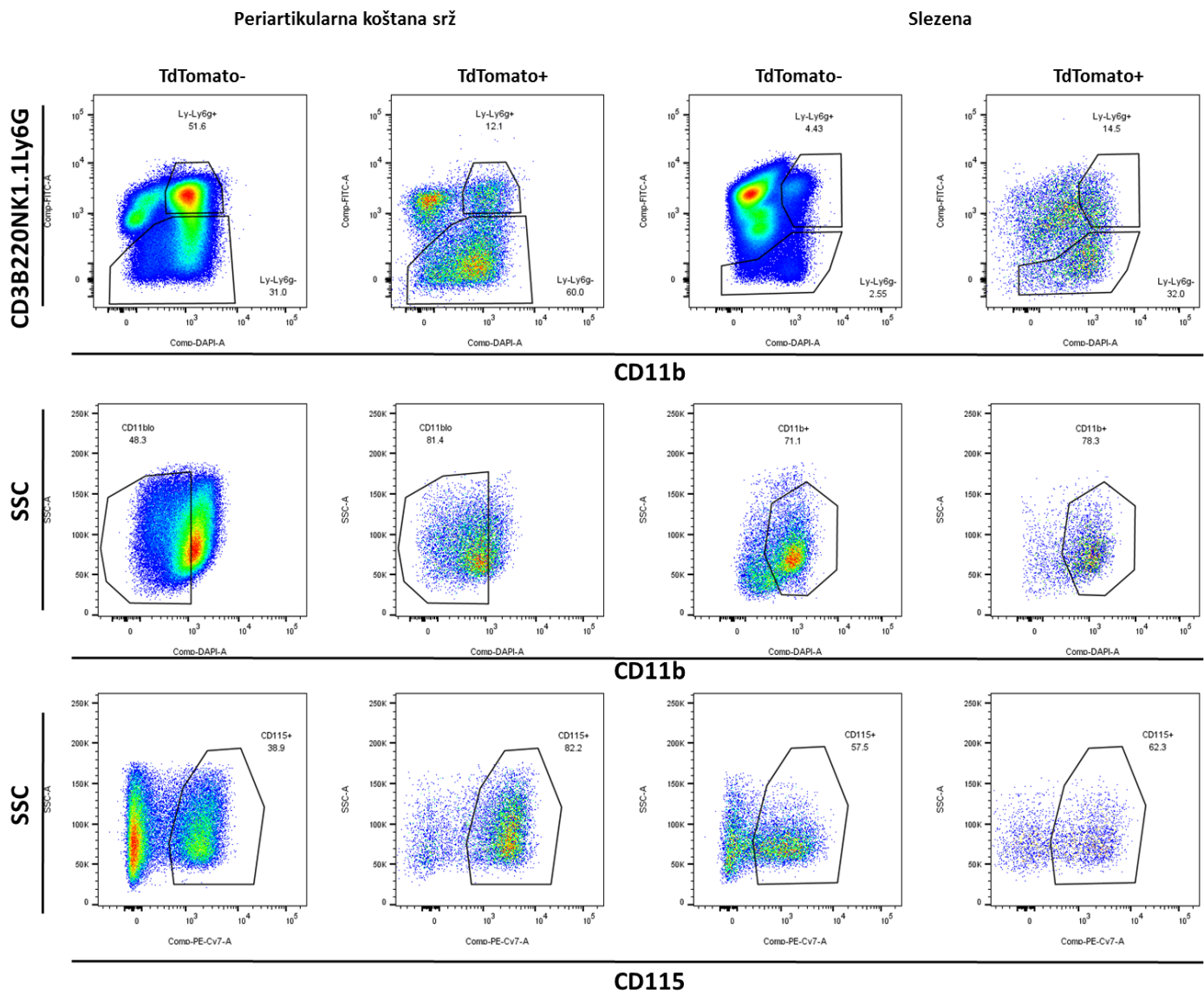
U daljnjem setu pokusa označili smo stanice koje su potaknute razvojem artritisa tako da smo indukciju rekombinaze Cre započeli sa sekundarnom imunizacijom (21 dan nakon primarne imunizacije), kada počinjemo opažati nastanak klinički jasnog artritisa. Istražili smo dva različita protokola *in vivo* davanja tamoksifena: intraperitonealnom injekcijom tamoksifena otopljenog u kukuruznom ulju (75 mg/kg) dvokratno u vrijeme sekundarne imunizacije te intraperitonealnom injekcijom svaki drugi dan počevši sa sekundarnom imunizacijom (Slika 33). Potvrdili smo da drugim protokolom možemo označiti i do pet puta više stanica, ovisno o analiziranom tkivu, te smo za daljnje pokuse koristili navedeni protokol. To upućuje na zaključak da su CX3CR1<sup>+</sup> stanice relativno kratkog vijeka i brzog obrtaja, te se svakim davanjem tamoksifena označavaju nove generacije stanica. Također je moguće da dio CX3CR1<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora infiltrira periartikularna područja i prione uz površinu kosti, te nije dostupan analizi pri istrcavanju koštane srži.

TdTomato<sup>+</sup> stanice nalazimo u koštanoj srži, slezeni, među leukocitima periferne krvi te u tarzometatarzalnom tkivu. U daljnjim pokusima analizirali smo jesu li stanice TdTomato<sup>+</sup> obogaćene osteoklastnim progenitorima te smo istražili njihov fenotip u odnosu na fenotip stanica TdTomato<sup>-</sup> u koštanoj srži i slezeni miševa s artritismom. Potvrdili smo da su TdTomato<sup>+</sup> stanice pretežito Ly6G<sup>-</sup>, te ih je od njih oko 80% CD11b<sup>-/lo</sup> u koštanoj srži odnosno CD11b<sup>+</sup> u slezeni od čega je 60-80% osteoklastnih progenitora (Slika 34). Navedeni rezultati potvrđuju da je među stanicama TdTomato<sup>+</sup> višestruko veći udio osteoklastnih progenitora nego među stanicama TdTomato<sup>-</sup>.



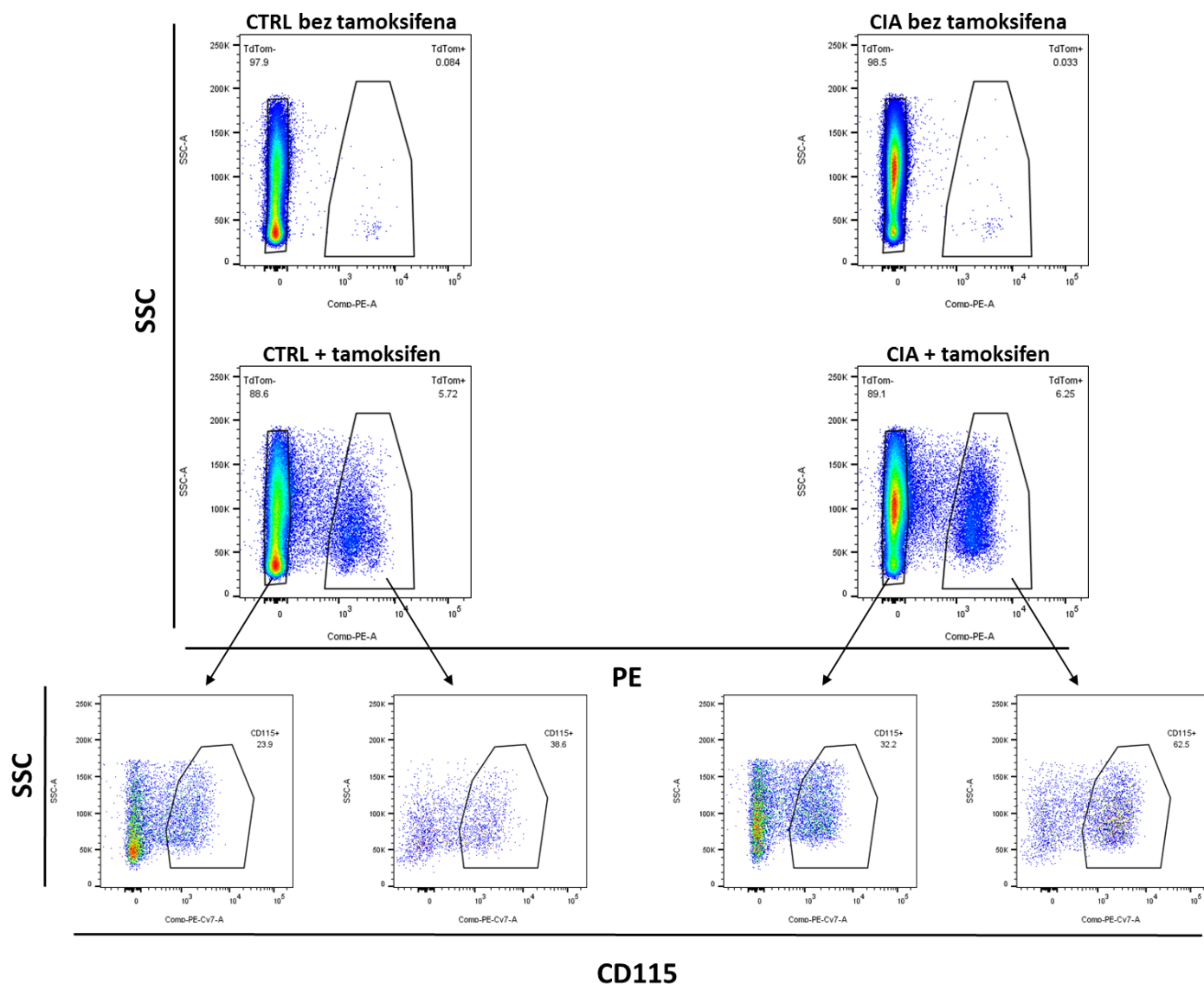


**Slika 33. Ispitivanje protokola *in vivo* davanja tamoksifena u svrhu aktivacije rekombinaze Cre.** Miševima CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup> izazvali smo artritis imunizacijom pilećim kolagenom. Istražili smo dva različita protokola *in vivo* davanja tamoksifena: intraperitonealnom injekcijom tamoksifena otopljenog u kukuruznom ulju (75 mg/kg) dvokratno u vrijeme sekundarne imunizacije (Tamoksifen 1) te intraperitonealnom injekcijom svaki drugi dan počevši sa sekundarnom imunizacijom (Tamoksifen 2). Miševe smo žrtvovali 35 dana nakon primarne imunizacije i analizirali suspenzije periartikularne koštane srži, slezene, periferne krvi i tarzometatarzalnog tkiva protočnom citometrijom. Prikazani su reprezentativni točkasti grafikoni svih stanica na PE kanalu na kojem svijetli protein TdTomato, za miševe kojima nismo davali tamoksifen (Bez tamoksifena) i dva protokola davanja tamoksifena. SSC – postranični rasap prema engl. *side scatter*



**Slika 34. Usporedni fenotip TdTomato<sup>-</sup> i TdTomato<sup>+</sup> stanica u periartikularnoj koštanoj srži i slezeni.**

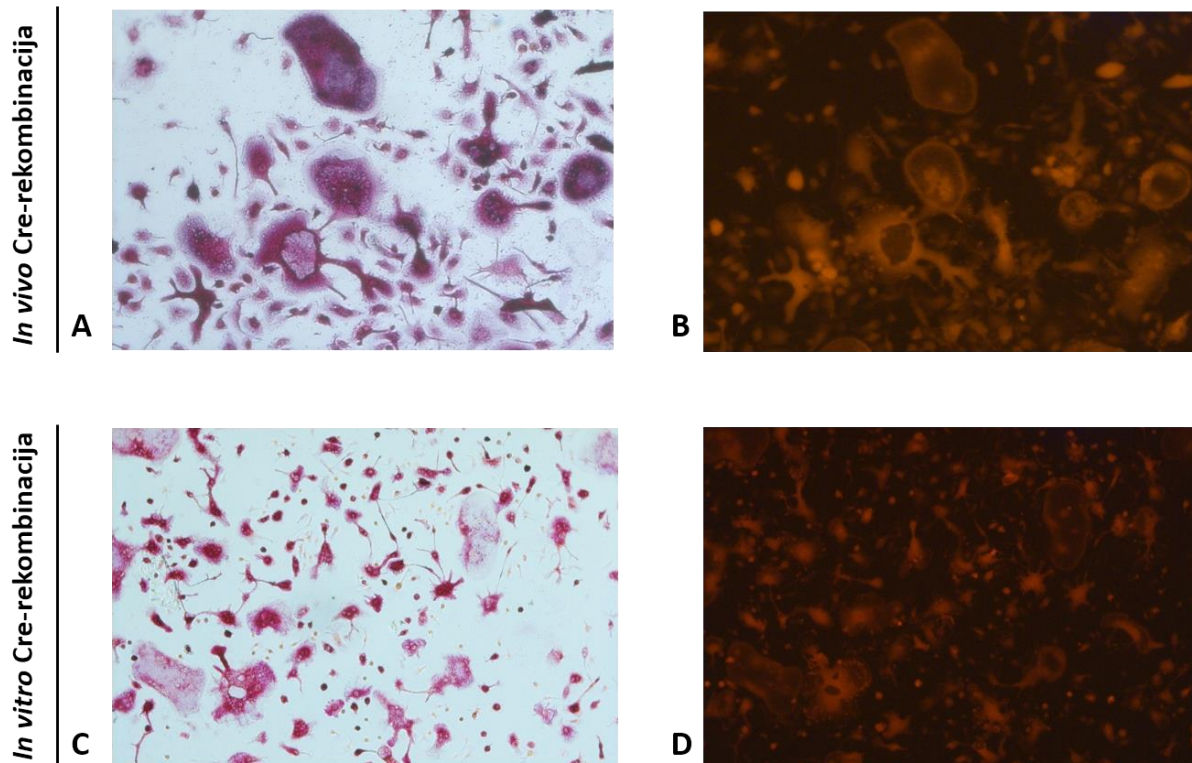
Miševima CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup> izazvali smo artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Miševe smo žrtvovali 35 dana nakon primarne imunizacije i analizirali suspenzije periartikularne koštane srži i slezene protočnom citometrijom. Usporedno su prikazani reprezentativni točkasti grafikoni TdTomato<sup>-</sup> i TdTomato<sup>+</sup> svih hematopoetskih CD45<sup>+</sup> stanica na biljege limfocita (CD3, B220, NK1.1), granulocita (Ly6G), integrin CD11b i receptor za M-CSF (CD115). SSC – postranični rasap prema engl. *side scatter*



**Slika 35. Usporedba fenotipa osteoklastnih progenitora u periartikularnoj koštanoj srži imuniziranih i neimuniziranih miševa.** Miševima CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup> izazvali smo artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II (CIA). Miševi su od sekundarne imunizacije dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo neimunizirane miševe CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup> (CTRL). Miševe smo žrtvovali 35 dana nakon primarne imunizacije i analizirali suspenzije periartikularne koštane srži protočnom citometrijom. Prikazani su reprezentativni točkasti grafikoni svih stanica na PE kanalu na kojem svijetli protein TdTomato, za miševe CTRL i CIA koji su dobivali tamoksifen u usporedbi s miševima CTRL i CIA koji nisu dobivali tamoksifen. U najdonjem redu prikazani su TdTomato<sup>+</sup> i TdTomato<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup> osteoklastni progenitori iz CTRL i CIA miševa obrađenih tamoksifenom. SSC – postranični rasap prema engl. *side scatter*

Kao što smo ranije pokazali, u artritisu se povećava udio osteoklastnih progenitora te smo htjeli istražiti povećava li se udio označenih osteoklastnih progenitora TdTomato<sup>+</sup> u artritisu u odnosu na kontrolnu neimuniziranu skupinu miševa u kojih nije izazvan artritis. Usporednom analizom TdTomato<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora u neimuniziranih miševa i miševa s artritisom, uočili smo da se udio TdTomato<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora povećava otprilike dvostruko u artritisu. Razlika udjela TdTomato<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora između imunizirane skupine i miševa s artritisom je puno manja (Slika 35). Iz navedenih rezultata zaključili smo da je mišja linija CX3CR1CreERT2 prikladna za označavanje osteoklastnih progenitora potaknutih artritisom te daljnju modulaciju signalnog puta Notch.

Osteoklastne progenitore iz populacije TdTomato<sup>+</sup> smo razvrstali i zasadili u staničnu kulturu uz dodatak osteoklastogenih čimbenika. Potvrdili smo njihov osteoklastogeni potencijal pokazavši da se stanice diferenciraju u TRAP<sup>+</sup> osteoklaste koji izražavaju fluorescentni protein TdTomato, što smo vizualizirali fluorescentnim mikroskopom (Slika 36). Osim *in vivo* indukcije rekombinaze Cre intraperitonealnim davanjem tamoksifena u kukuruznom ulju, istražili smo i *in vitro* indukciju dodavanjem vodotopivog 4-OHT u etanolu. Sortirane osteoklastne progenitore miševa križanog soja CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup> zasadili smo u osteoklastogenoj kulturi uz dodatak 1  $\mu$ M 4-OHT. Na kraju diferencijacijske kulture, potvrdili smo multinuklearne TRAP<sup>+</sup> osteoklaste koji izražavaju TdTomato, vidljivo pod fluorescentnim mikroskopom (Slika 36).



**Slika 36. Diferencijacija osteoklasta iz TdTomato<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora.** (A, B) Miševima soja CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup> davali smo tamoksifen *in vivo* kako bismo inducirali izražaj fluorescentnog proteina TdTomato u monocitnoj lozi. Stanice koštane srži smo analizirali protočnom citometrijom te izdvojili TdTomato<sup>+</sup> osteoklastne progenitore (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-lo</sup>CD115<sup>+</sup>) koje smo zasadili u staničnu kulturu uz dodatak osteoklastogenih čimbenika. Slike prikazuju reprezentativna vidna polja nakon četiri dana kultivacije. (A) Višejezgreni osteoklasti obojeni na TRAP pod svjetlosnim mikroskopom (B) Višejezgrene TdTomato<sup>+</sup> stanice pod fluorescentnim mikroskopom. (C, D) Suspenzije koštane srži miševa soja CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup> analizirali protočnom citometrijom te izdvojili osteoklastne progenitore (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-lo</sup>CD115<sup>+</sup>) koje smo zasadili u staničnu kulturu uz dodatak osteoklastogenih čimbenika RANKL i M-CSF. U stanične kulture dodavali smo 4-hidroksitamoksifen kako bismo inducirali Cre-rekombinaciju i izražaj fluorescentnog proteina TdTomato. Slike prikazuju reprezentativna vidna polja nakon četiri dana kultivacije. (C) Višejezgreni osteoklasti obojeni na TRAP pod svjetlosnim mikroskopom (D) Iste osteoklaste vizualizirali smo pod fluorescentnim mikroskopom i utvrdili da izražavaju fluorescentni protein TdTomato.



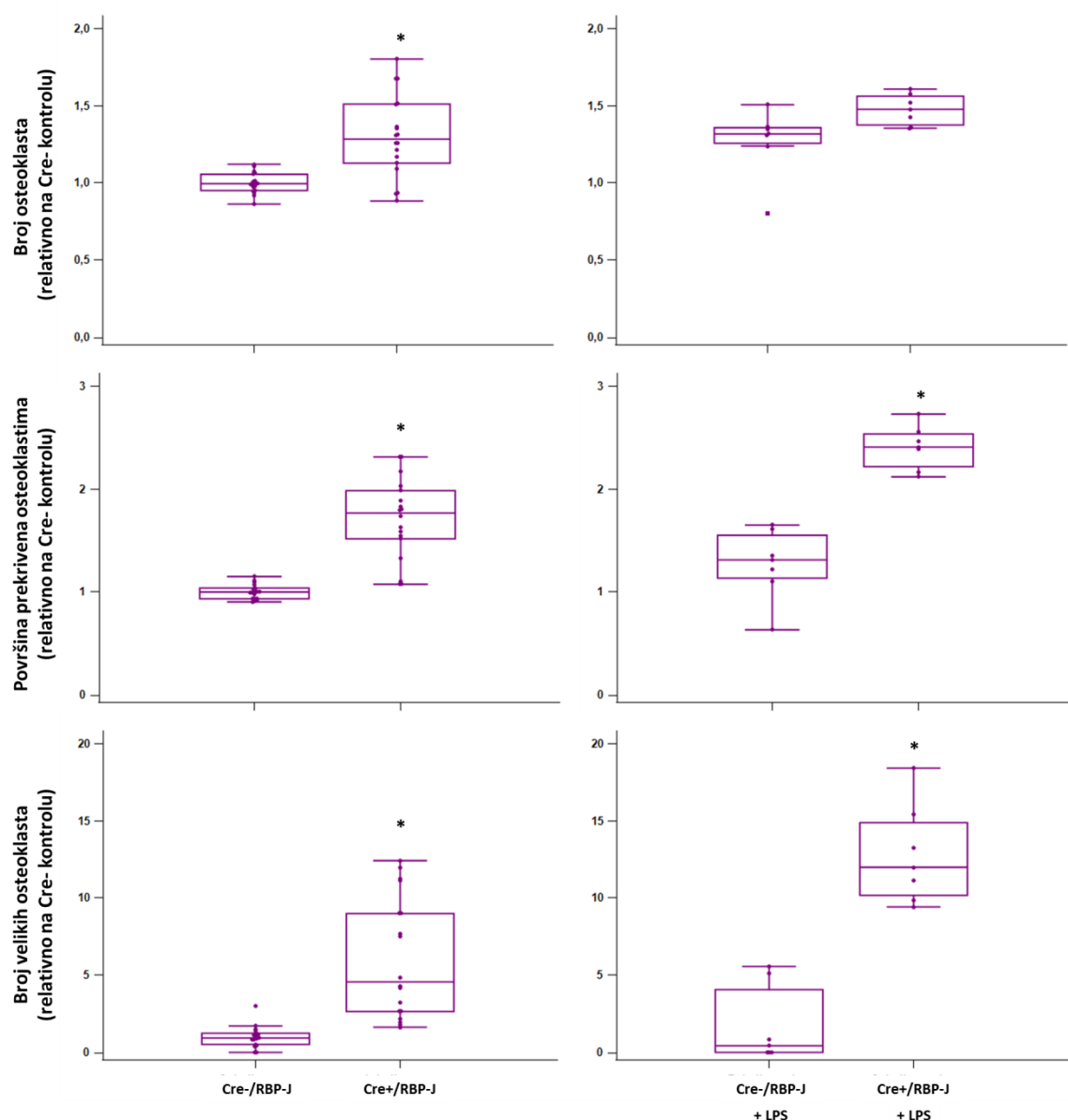
### 5.3.3. Učinak genetski utišanog signalnog puta Notch na diferencijaciju osteoklastnih progenitora *in vitro*

Nakon što smo utvrdili da model CX3CR1CreERT2 možemo koristiti za ciljnu modulaciju osteoklastnih progenitora, u sljedećim setovima pokusa koristili smo miševe križanog soja CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup>. Davanjem tamoksifena potiče se izrezivanje lokusa Rbpjk koji posreduje prijenos kanonskog signalnog puta Notch. Tako u potomstvu koje je homozigotno za RBP-J<sup>fl</sup> alel dobivamo osteoklastne progenitore s utišanim signalnim putem Notch (Cre+/RBP-J). Kao kontrole u svim pokusima, koristili smo RBP-J<sup>fl/fl</sup> miševe koji ne izražavaju Cre rekombinazu (Cre-/RBP-J) koje smo obradili tamoksifenom kao miševe Cre+/RBP-J (Slika 31).

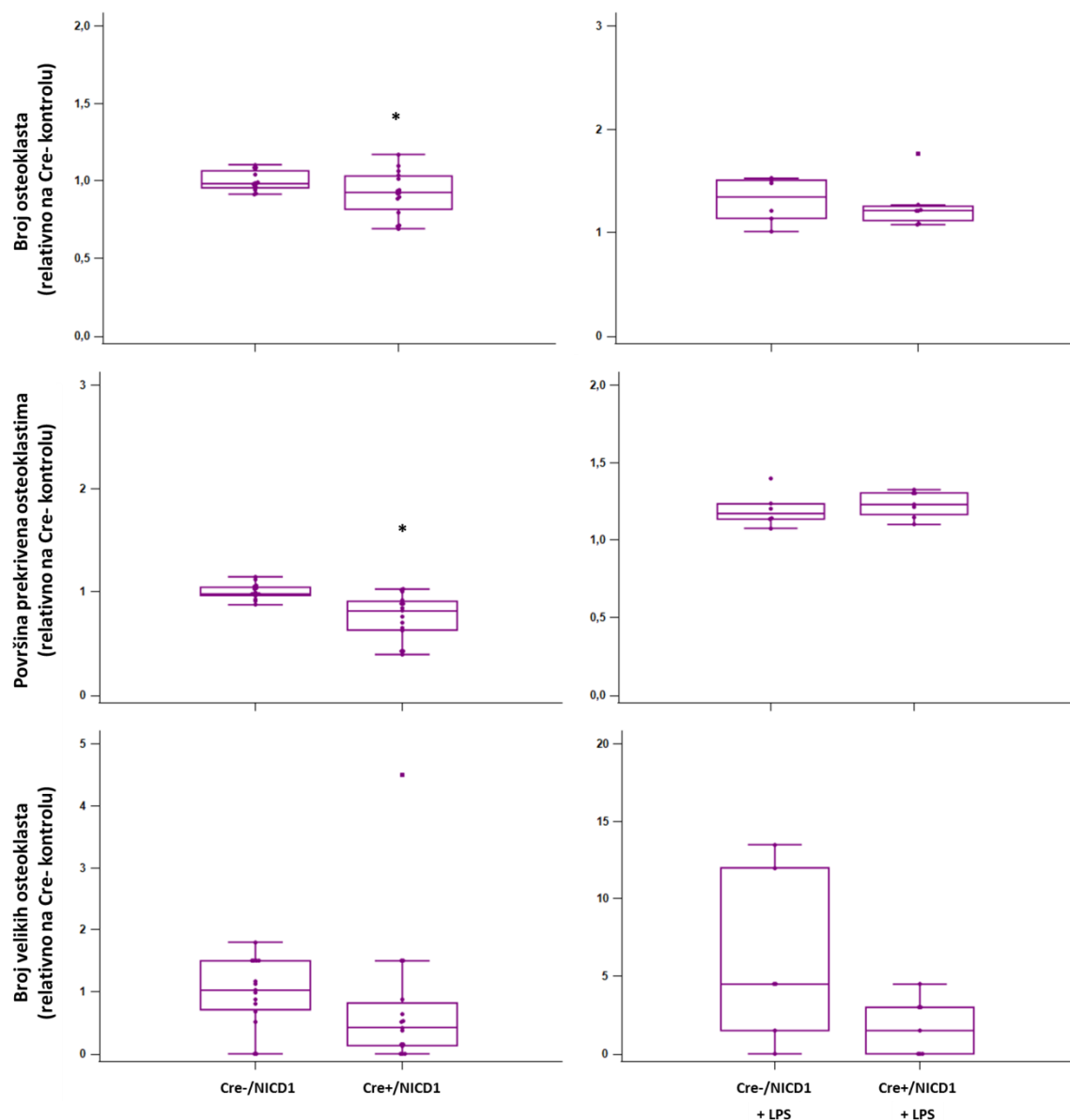
Prvi set pokusa uključivao je ispitivanje učinka *in vitro* utišavanja kanonskog signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima na diferencijaciju osteoklasta. Osteoklastne progenitore izolirane iz koštane srži neimuniziranih miševa CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> zasadili smo u osteoklastogenoj kulturi te uzgajali uz dodatak 4-OHT. U diferenciranim kulturama osteoklastnih progenitora miševa Cre+/RBP-J bilo je ukupno više osteoklasta koji su bili veći te prekrivali veći dio zdenca. Također, protočno-citometrijskom analizom fenotipa drugi dan kulture, utvrdili smo pojačan izražaj receptora RANK na površini Cre+/RBP-J preosteoklasta (Slika 37). Kako bismo oponašali uvjete upale *in vitro*, u kulture preosteoklasta dodali smo LPS drugi dan kulture. Rezultat djelovanja LPS-a na diferencijaciju osteoklasta ovisi o trenutku dodavanja, s time da koči diferencijaciju preosteoklasta koji nisu potaknuti RANKL-om, a potiče diferencijaciju preosteoklasta prethodno potaknutih RANKL-om (120). Dodatak LPS-a doveo je do pojačane osteoklastogeneze u obje skupine, ali razmjerno više u kulturama osteoklastnih progenitora miševa Cre+/RBP-J (Slika 37).

Kao dodatnu potvrdu pro-osteoklastogenog učinka utišavanja signalnog puta Notch, proveli smo set pokusa koristeći miševe križanog soja CX3CR1CreERT2/NICD1<sup>fl/+</sup> (Cre+/NICD1). U tog soja primjenom tamoksifena dolazi do izrezivanja STOP sekvence prije aktivirane unutarstanične podjedinice receptora Notch 1 (Slika 30). U miševa Cre+/NICD1 imamo ukupno manji broj osteoklasta kao i manju površinu prekrivenu osteoklastima u zdencu (Slika 38). U uvjetima upale, dodatkom LPS-a gubi se razlika među kulturama Cre- i Cre+ miševa.

S druge strane izražaj receptora RANK niži je u Cre+/NICD1 miševa u odnosu na Cre-/NICD1 miševe, te ostaje značajno niži i s dodatkom LPS-a. Nasuprot tome izražaj receptora RANK povećan je u Cre+/RBP-J miševa s dodatnim pojačanjem u uvjetima upale (Slika 39). Iz toga smo zaključili da aktivacija signalnog puta Notch putem receptora Notch 1 djeluje inhibicijski na diferencijaciju osteoklasta, dok utišavanje signala Notch potiče osteoklastogenezu.

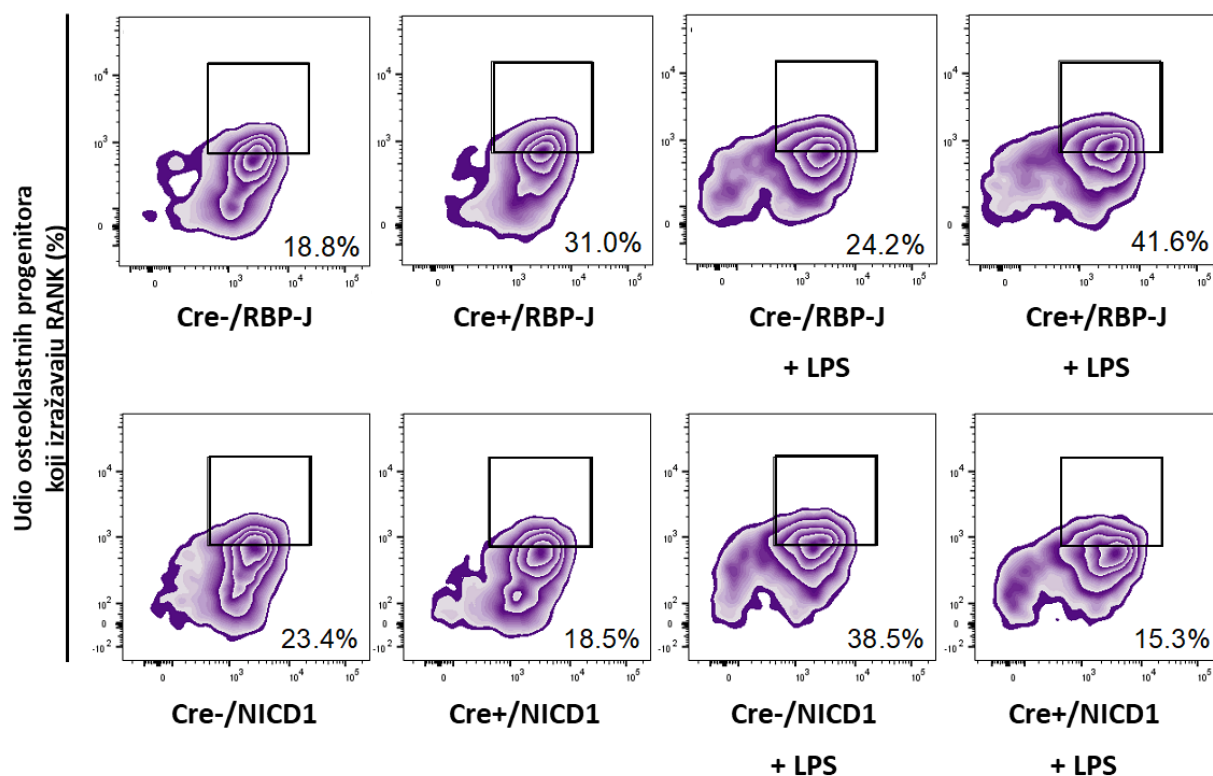


**Slika 37. Učinak inhibicije signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima *in vitro* na diferencijaciju osteoklasta.** Miševi CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre+/RBP-J) su korišteni kao izvor osteoklastnih progenitora. Kao kontrolnu skupinu koristili smo miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/RBP-J). Suspenzija koštane srži je analizirana protočnom citometrijom i razvrstane su stanice osteoklastnih progenitora (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>) te su zasađene u osteoklastogenu kulturu potaknutu čimbenicima RANKL i M-CSF. Za indukciju rekombinaze Cre *in vitro* korišten je hidroksitamoksifen. U drugom setu pokusa u zdenca je dodan lipopolisaharid *E. coli* (LPS) s drugom promjenom staničnog medija. Prikazan je broj osteoklasta, površina zdenca prekrivena osteoklastima i broj velikih osteoklasta (>125 μm) normaliziran na kulture Cre-/RBP-J bez dodatka LPS-a. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \*p <0,05 u odnosu na miševe Cre-/RBP-J (Mann-Whitney U test).



**Slika 38. Učinak aktivacije signalnog puta Notch putem receptora Notch 1 u osteoklastnim progenitorima *in vitro* na diferencijaciju osteoklasta.** Miševi CX3CR1CreERT2/NICD1<sup>fl/+</sup> (Cre+/NICD1) su korišteni kao izvor osteoklastnih progenitora. Kao kontrolnu skupinu koristili smo miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/NICD1). Suspenzija koštane srži je analizirana protočnom citometrijom i razvrstane su stanice osteoklastnih progenitora (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>) te su zasađene u osteoklastogenu kulturu potaknutu čimbenicima RANKL i M-CSF. Za indukciju rekombinaze Cre *in vitro* korišten je hidroksitamoksifen. U drugom setu pokusa u zdence je dodan lipopolisaharid *E. coli* (LPS) s drugom promjenom staničnog medija. Prikazan je broj osteoklasta, površina zdenca prekrivena osteoklastima i broj velikih osteoklasta (>125 μm) normaliziran na kulture Cre-/NICD1 bez dodatka LPS-a. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na miševe Cre-/NICD1 (Mann-Whitney U test).



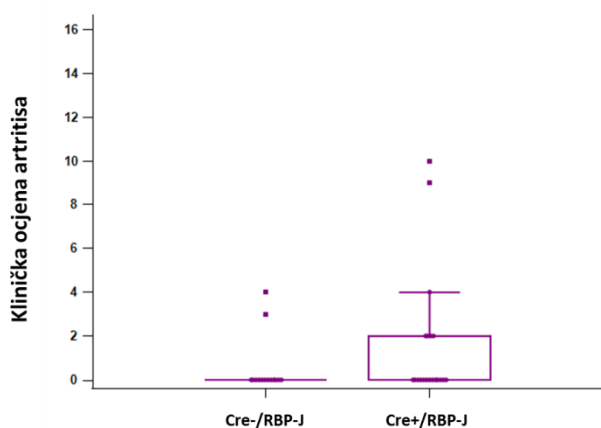


**Slika 39. Učinak modulacije signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima *in vitro* na izražaj receptora RANK.** Miševi CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre+/RBP-J) i CX3CR1CreERT2/NICD1<sup>fl/+</sup> (Cre+/NICD1) su korišteni kao izvor osteoklastnih progenitora. Kao kontrolnu skupinu koristili smo miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/RBP-J ili Cre-/NICD1). Suspenzija koštane srži je analizirana protočnom citometrijom i razvrstane su stanice (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>) osteoklastnih progenitora te su zasađene u osteoklastogenu kulturu potaknutu čimbenicima RANKL i M-CSF. Za indukciju rekombinaze Cre *in vitro* korišten je hidroksitamoksifen. U drugom setu pokusa u zdence je dodan lipopolisaharid *E. coli* (LPS) 12 sati prije analize fenotipa. Nakon 48 sati kulture, stanice su odlijepjene s dna zdenca pomoću enzima TrypLE<sup>TM</sup> Express (Gibco) i analizirane protočnom citometrijom. Prikazani su reprezentativni grafikoni izražaja receptora RANK na osteoklastnim progenitorima.

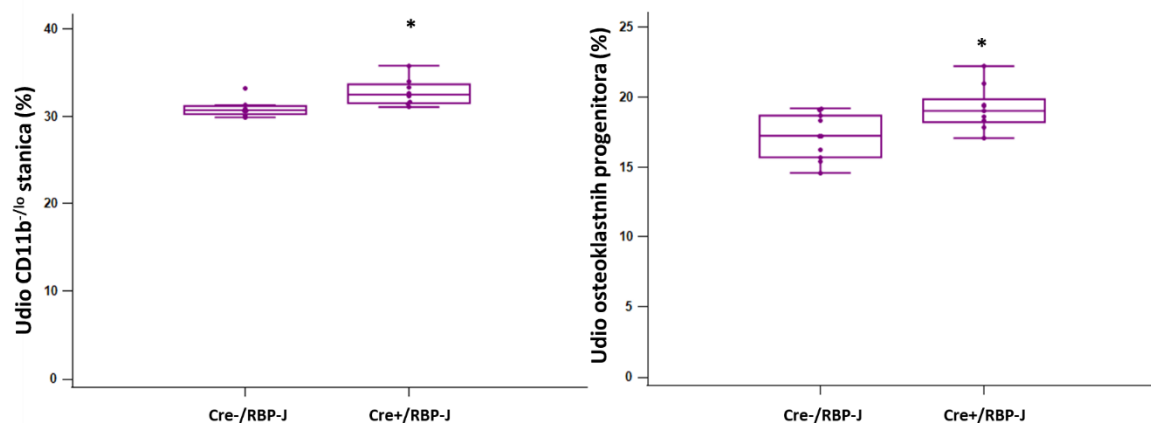
#### 5.3.4. Učinak genetski utišanog signalnog puta Notch na diferencijaciju i aktivnost osteoklasta *in vivo*

Nadalje smo učinak utišavanja signalnog puta Notch istraživali *in vivo*. Miševe smo imunizirali kolagenom te obradili tamoksifenom, počevši od 21. dana nakon primarne imunizacije, kako bismo potaknuli indukciju rekombinaze Cre *in vivo*. Imunizirane miševe Cre-/RBP-J ili Cre-/NICD1 obrađene tamoksifenom koristili smo kao kontrolnu skupinu. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije te smo za daljnje analize izolirali stražnje šape, slezenu, leukocite periferne krvi te krvni serum.

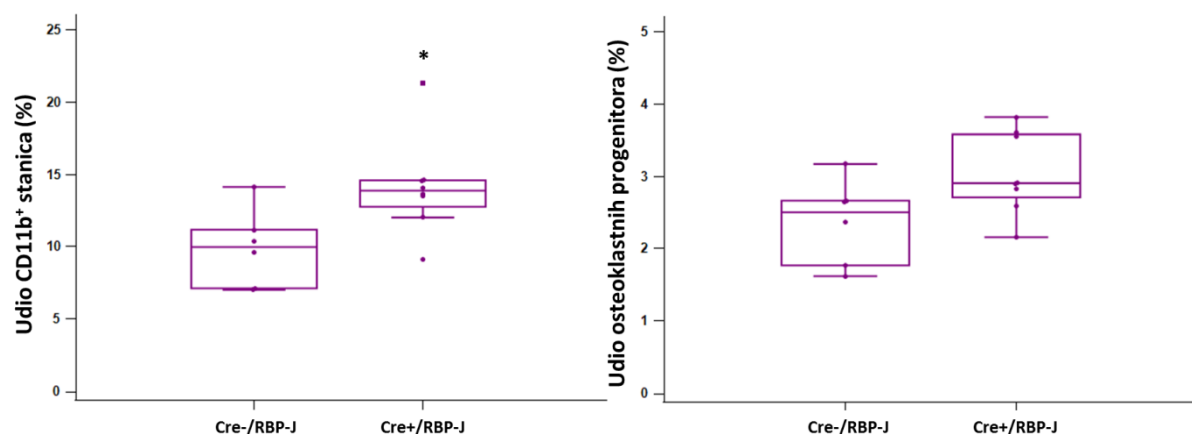
Nismo uočili značajnu razliku u incidenciji i intenzitetu artritisa među skupinama Cre-/RBP-J i Cre+/RBP-J, premda postoji tendencija artritisa većeg intenziteta u miševa Cre+/RBP-J (Slika 40). Međutim, analizom protočnom citometrijom utvrdili smo značajno povećan udio mijeloidnih stanica CD11b<sup>+/lo</sup> u periartikularnoj koštanoj srži odnosno stanica CD11b<sup>+</sup> u slezeni miševa Cre+/RBP-J (Slike 41 i 42). Udio CD115<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora u periartikularnoj koštanoj srži također je značajno povećan u Cre+/RBP-J miševa s artritismom u odnosu na odgovarajuće Cre-/RBP-J miševe. Nasuprot tome, u miševa Cre+/NICD1 postoji tendencija smanjenja udjela navedenih populacija u periartikularnoj koštanoj srži i slezeni u odnosu na miševe Cre-/NICD1 (Slike 43 i 44).



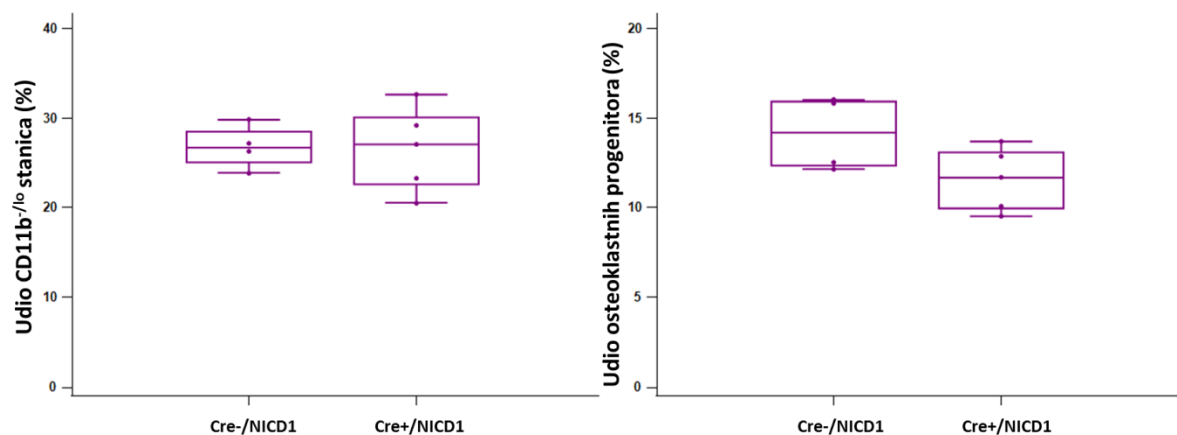
**Slika 40. Učinak inhibicije signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima na incidenciju i intenzitet artritisa.** Miševima CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre+/RBP-J) je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/RBP-J) koji su također dobivali tamoksifen. Od sekundarne imunizacije do žrtvovanja klinički je praćen razvoj znakova artritisa uz bodovanje svake šape zasebno. Maksimalni ukupni zbroj po mišu iznosi 16 bodova. Prikazana je klinička ocjena artritisa za svakog miša u pokusnoj skupini i rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.



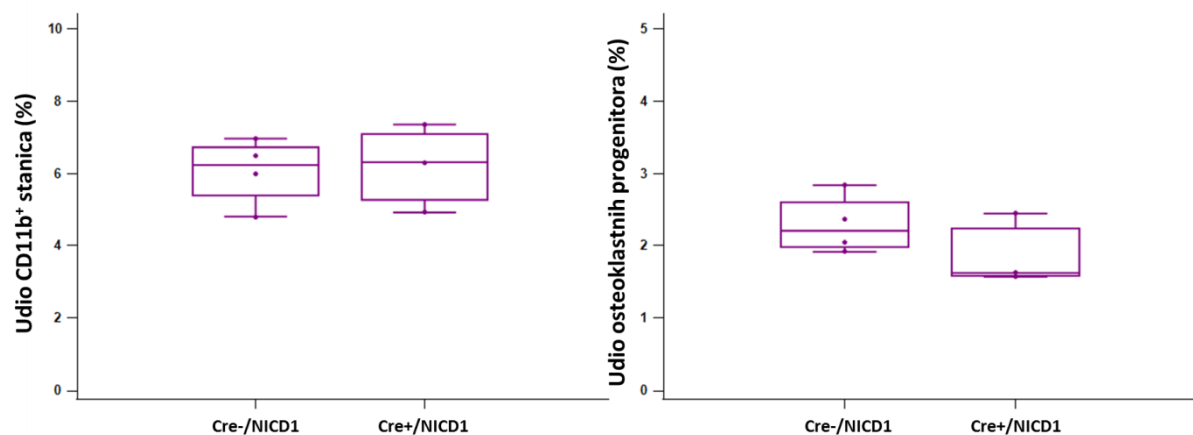
**Slika 41. Učinak utišavanja signalnog puta Notch *in vivo* na udio mijeloidnih stanica i osteoklastnih progenitora u periartikularnoj koštanoj srži.** Miševima CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre+/RBP-J) je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/RBP-J) koji su dobivali tamoksifen. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije. Prikazan je udio stanica periartikularne koštane srži CD11b<sup>lo</sup> i CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>lo</sup>CD115<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora u odnosu na populaciju CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na miševe Cre-/RBP-J (Mann-Whitney U test).



**Slika 42. Učinak utišavanja signalnog puta Notch *in vivo* na udio mijeloidnih stanica i osteoklastnih progenitora u slezeni.** Miševima CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre+/RBP-J) je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/RBP-J) koji su dobivali tamoksifen. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije. Prikazan je udio stanica slezene CD11b<sup>+</sup> i CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora u odnosu na populaciju CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na miševe Cre-/RBP-J (Mann-Whitney U test).

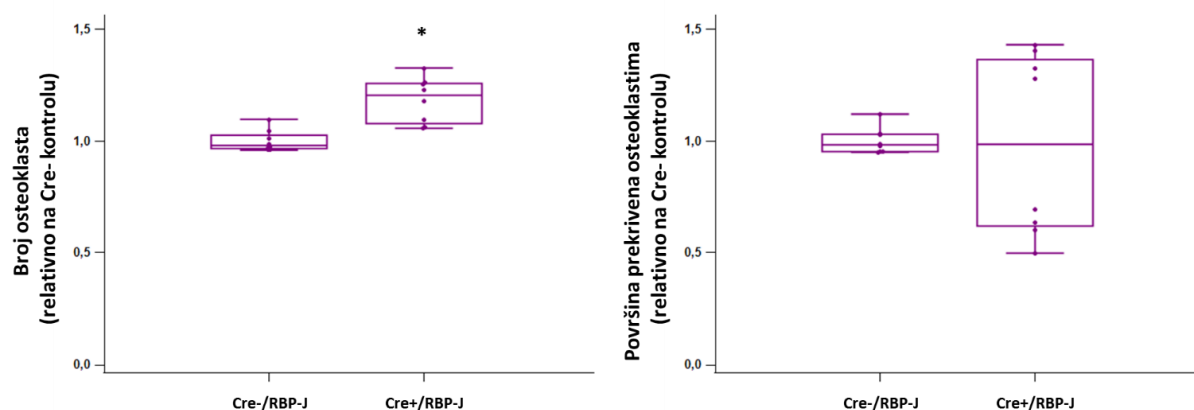


**Slika 43. Učinak aktivacije signalnog puta Notch putem receptora Notch 1 u osteoklastnim progenitorima *in vivo* na udio mijeloidnih stanica i osteoklastnih progenitora u periartikularnoj koštanoj srži.** Miševima CX3CR1CreERT2/NICD1<sup>fl/+</sup> (Cre+/NICD1) je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane mišve bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/NICD1) koji su dobivali tamoksifen. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž je analizirana protočnom citometrijom. Prikazan je udio stanica CD11b<sup>-/-</sup> i CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/-</sup>CD115<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora u odnosu na populaciju CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

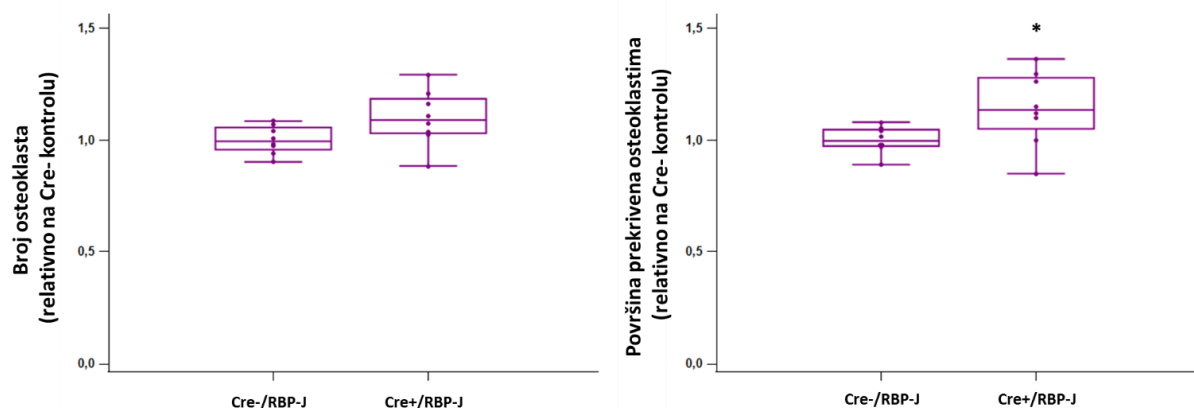


**Slika 44. Učinak aktivacije signalnog puta Notch putem receptora Notch 1 u osteoklastnim progenitorima *in vivo* na udio mijeloidnih stanica i osteoklastnih progenitora u slezeni.** Miševima CX3CR1CreERT2/NICD1<sup>fl/+</sup> (Cre+/NICD1) je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane mišve bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/NICD1) koji su također dobivali tamoksifen. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i suspenzija slezene je analizirana protočnom citometrijom. Prikazan je udio stanica CD11b<sup>+</sup> i CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora u odnosu na populaciju CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

Razvrstane osteoklastne progenitore izolirane iz periartikularne koštane srži i slezene miševa obrađenih tamoksifenom *in vivo* zasadili smo u osteoklastogenu kulturu. Osteoklastni progenitori iz periartikularne koštane srži miševa Cre+/RBP-J dali su veći broj osteoklasta u staničnoj kulturi (Slika 45), dok su progenitori izolirani iz slezene Cre+/RBP-J dali veće osteoklaste koji su pokrili veću površinu zdenca (Slika 46). Navedeni rezultati u skladu su s prethodno opisanim nalazima koji upućuju na zaključak da inhibicija kanonskog signalnog puta Notch djeluje poticajno na razvoj osteoklasta u modelu artritisa.



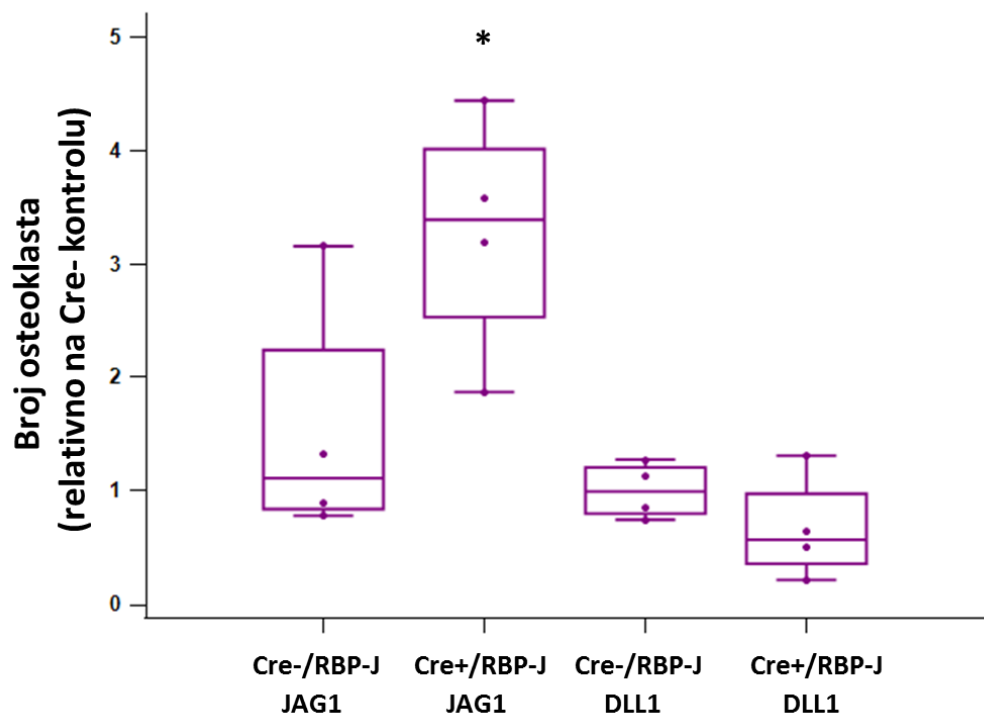
**Slika 45. Učinak utišavanja signalnog puta Notch *in vivo* na diferencijaciju osteoklasta iz osteoklastnih progenitora izoliranih iz periartikularne koštane srži.** Miševima CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre+/RBP-J) je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/RBP-J) koji su također dobivali tamoksifen. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž je analizirana protočnom citometrijom. Razvrstane su stanice osteoklastnih progenitora (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>) te su zasađene u osteoklastogenu kulturu. Prikazan je broj osteoklasta i površina zdenca prekrivena osteoklastima normalizirani na kulture Cre-/RBP-J. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \*p <0,05 u odnosu na miševe Cre-/RBP-J (Mann-Whitney U test).



**Slika 46. Učinak utišavanja signalnog puta Notch *in vivo* na diferencijaciju osteoklasta iz osteoklastnih progenitora izoliranih iz slezene.** Miševima CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre+/RBP-J) je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/RBP-J) koji su također dobivali tamoksifen. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i suspenzija slezene je analizirana protočnom citometrijom. Razvrstane su stanice osteoklastnih progenitora (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>) te su zasađene u osteoklastogenu kulturu. Prikazan je broj osteoklasta i površina zdenca prekrivena osteoklastima normalizirani na kulture Cre-/RBP-J. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na miševe Cre-/RBP-J (Mann-Whitney U test).

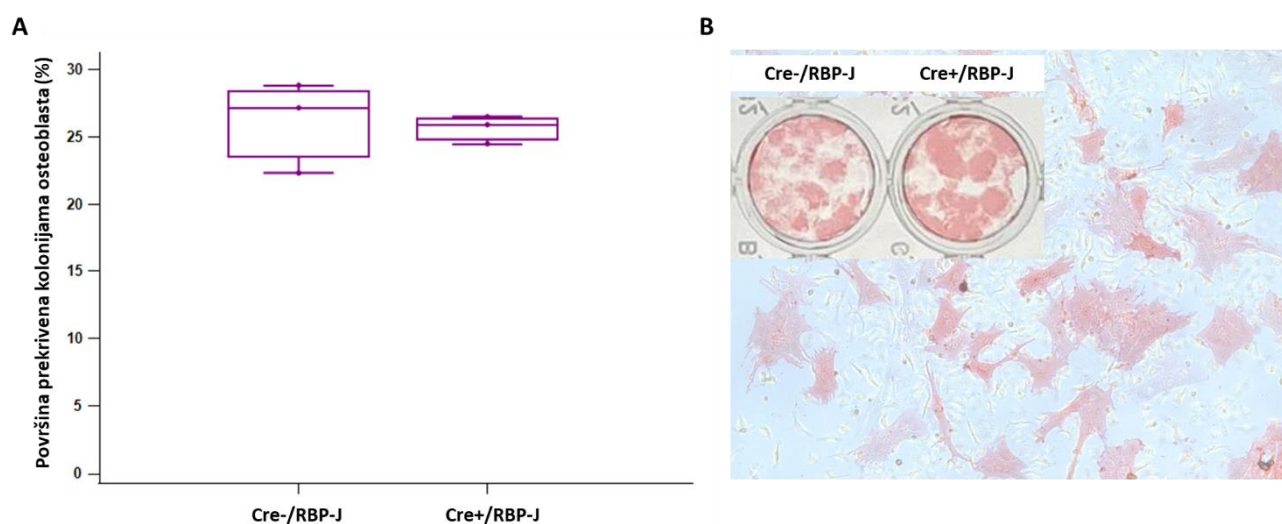
Prethodno smo pokazali da u osteoklastogenim kulturama oblaganje zdenaca ligandima signalnog puta Notch koči diferencijaciju osteoklasta. Stoga smo u sljedećem koraku istraživanja ispitali učinak liganada na diferencijaciju osteoklastnih progenitora izoliranih iz Cre+/RBP-J i Cre-/RBP-J miševa. S obzirom na zakočen kanonski signalni put Notch u osteoklastnim progenitorima iz miševa Cre+/RBP-J, očekivali smo da ligandi neće imati navedeni inhibicijski učinak ili će on biti znatno oslabljen.

Kad smo osteoklastne progenitore iz periartikularne koštane srži imuniziranih miševa zasadili na ligandima obložene zdence uočili smo da utišavanje signalnog puta Notch *in vivo* smanjuje inhibicijski učinak liganda JAG1 na diferencijaciju osteoklasta, dok utjecaj liganda DLL1 nije bio promijenjen (Slika 47). Moguće objašnjenje je da ligand DLL1 može djelovati i drugim putevima osim kanonskog signalnog puta, te da je pokuse također potrebno ponoviti uz obradu tamoksifenom *in vitro*.



**Slika 47. Učinak utišavanja signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima na diferencijaciju osteoklasta iz osteoklastnih progenitora potaknutih ligandima JAG1 i DLL1.** Miševima CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre+/RBP-J) je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/RBP-J). Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž je analizirana protočnom citometrijom. Razvrstane su stanice osteoklastnih progenitora (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup>) te su zasađene u osteoklastogenu kulturu uz dodatak 4-hidroksitamoksifena za indukciju rekombinaze Cre. Zdenci su prethodno obloženi imobiliziranim ligandima Notch signalnog puta u koncentraciji 10 µg/mL. Prikazan je broj osteoklasta i površina zdenca prekrivena osteoklastima normalizirani na kulture Cre-/RBP-J potaknute odgovarajućim ligandom. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na miševe Cre-/RBP-J (Kruskal-Wallisov test).

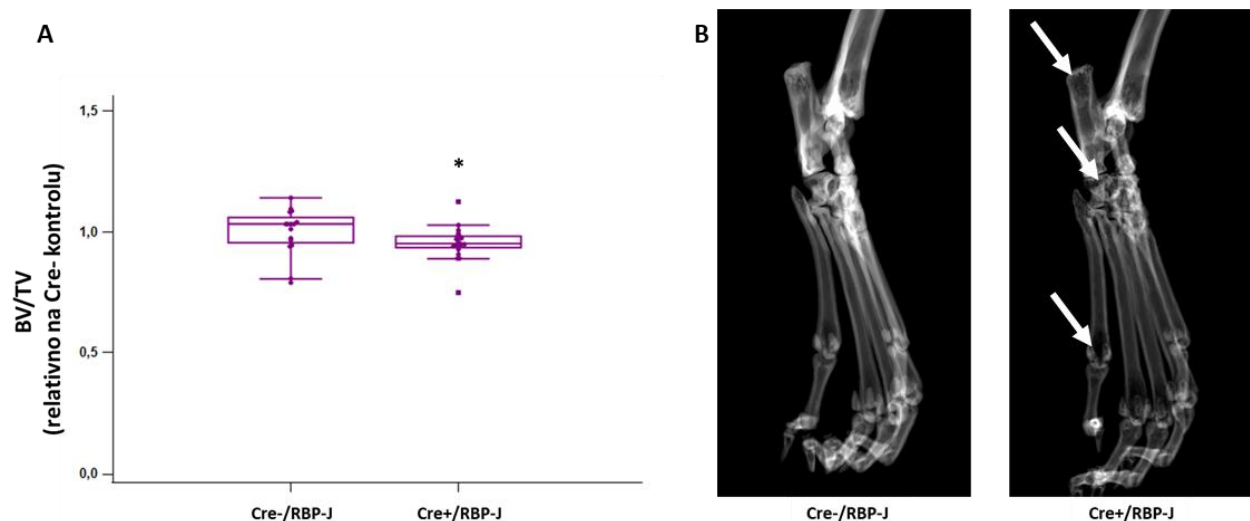
S obzirom na to da između osteoklastnih i osteoblastnih stanica u koštanoj srži postoji funkcionalna interakcija, na kraju smo istražili utječe li utišavanje signalnog puta Notch u CX3CR1<sup>+</sup> osteoklastnim progenitorima na diferencijacijsku aktivnost osteoblasta. Zasadili smo koštanu srž miševa Cre-/RBP-J i Cre+/RBP-J kojima je induciran artritis u osteoblastogenu staničnu kulturu. Nakon 14 dana diferencijacijske kulture nismo uočili razliku u broju i veličini ALP<sup>+</sup> kolonija diferenciranih osteoblasta između dvije skupine miševa (Slika 48).



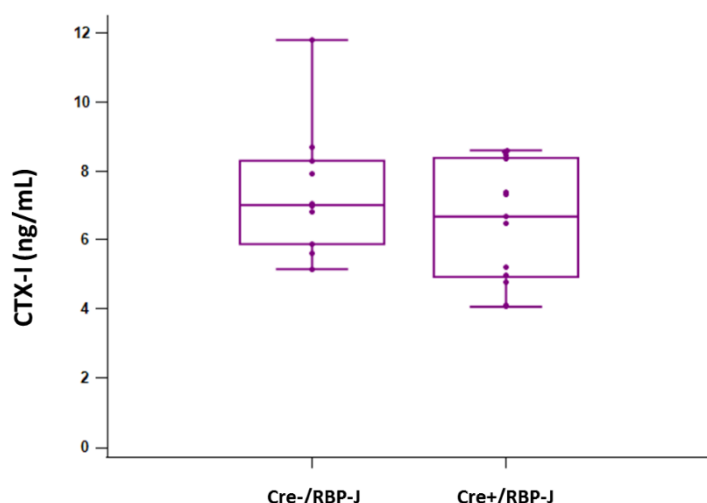
**Slika 48.** Učinak utišavanja signalnog puta Notch *in vivo* na diferencijaciju osteoblasta iz periartikularne koštane srži. Miševima CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre+/RBP-J) je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/RBP-J) koji su dobivali tamoksifen. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i periartikularna koštana srž je zasađena u osteoblastogenu kulturu potaknutu čimbenicima β-glicerofosfatom i askorbinskom kiselinom. Na kraju kulture (14. dan), stanice su fiksirane i obojene na izražaj alkalne fosfataze. (A) Prikazana je površina zdenca prekrivena kolonijama stanica koje izražavaju alkalnu fosfatazu. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. (B) Prikazani su reprezentativni zdenci diferenciranih osteoblasta miševa Cre-/RBP-J i Cre+/RBP-J, te reprezentativno vidno polje stanica 14. dan kulture pod svjetlosnim mikroskopom obojenim na izražaj alkalne fosfataze.



Osim diferencijacijskim kulturama osteoklasta i osteoblasta, učinak utišavanja signalnog puta Notch u CX3CR1<sup>+</sup> osteoklastnim progenitorima istražili smo i na razini ukupnog koštanog metabolizma. Analizom postupkom  $\mu$ CT u miševa s artritisom utvrdili smo značajno smanjen volumen koštane mase talusa u miševa s utišanim signalnim putem Notch u osteoklastnim progenitorima (Slika 49). Taj nalaz predstavlja važnu potvrdu pojačanog gubitka kosti u artritisu u uvjetima kočenja kanonskog signalnog puta Notch. Iz seruma miševa također smo odredili koncentraciju CTX-I, ali nismo utvrdili razliku u razini markera između dvije skupine miševa u analiziranoj vremenskoj točki žrtvovanja bez obzira na značajno veću koštanu resorpciju (Slika 50). Kako je već prije naglašeno, vremenska točka žrtvovanja možda ne odgovara točki najaktivnije resorpcije i može biti razlog neutvrđene razlike u koncentraciji CTX-I između miševa Cre<sup>+</sup>/RBP-J i Cre<sup>-</sup>/RBP-J.

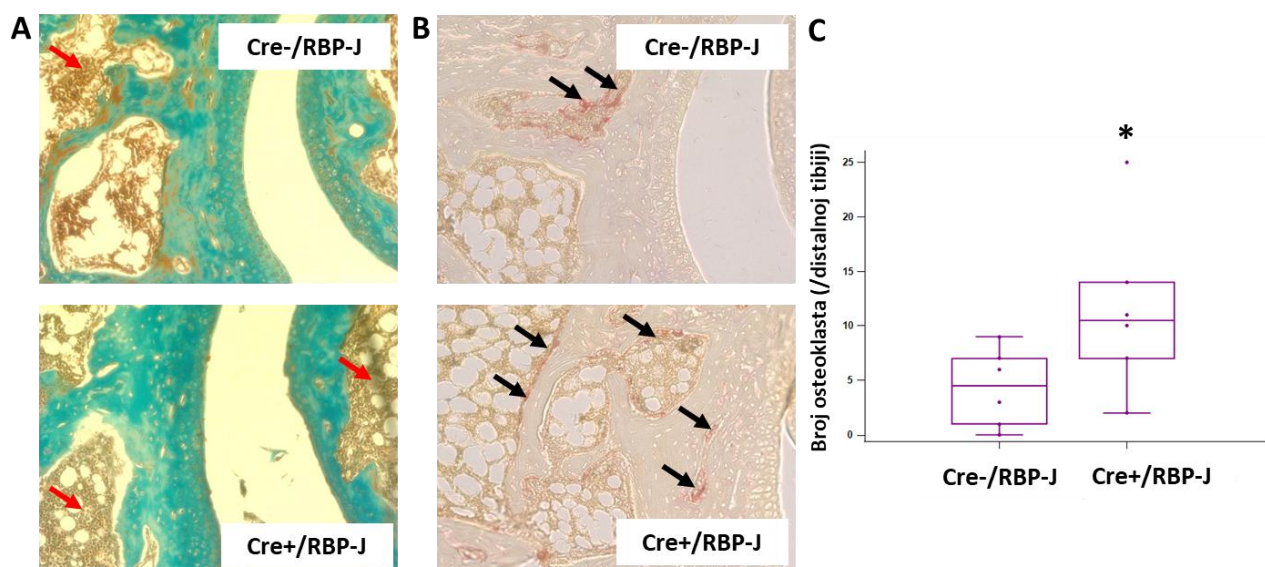


**Slika 49. Učinak utišavanja signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima na gubitak koštanog volumena talusa.** Miševima CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre<sup>+</sup>/RBP-J) je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre<sup>-</sup>/RBP-J) koji su dobivali tamoksifen. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i stražnje šape su izglobljene i fiksirane u 4% paraformaldehidu. Analiza promjena koštanog metabolizma i koštane destrukcije u artritisu napravljena je snimanjem mikrokompjutoriziranom tomografijom i analizom pomoću programa CTAn (SkyScan). (A) Određen je udio mineralizirane (kortikalne i trabekularne) kosti u ukupnom volumenu (BV/TV; %) fragmenta talusa debljine 0,3-0,4 mm. Rezultati su normalizirani na Cre<sup>-</sup>/RBP-J miševe i prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na miševe Cre<sup>-</sup>/RBP-J (Mann-Whitney U test). (B) Prikazane su reprezentativne rentgenske snimke stražnjih šapa miševa Cre<sup>+</sup>/RBP-J i Cre<sup>-</sup>/RBP-J. Bijele strelice prikazuju područja koštanog razaranja u artritisu.



**Slika 50. Učinak utišavanja signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima na koncentraciju CTX-I u serumu.** Miševima CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre+/RBP-J) je izazvan artritis imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/RBP-J) koji su dobivali tamoksifen. Anesteziranim miševima 35 dana nakon primarne imunizacije iz orbitalnog sinusa uzet je uzorak krvi iz kojeg je izoliran serum. Imunoenzimskom metodom (ELISA, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) izmjerena je koncentracija C-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (CTX-I, prema engl. *carboxy-terminal collagen crosslinks*). Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

U zadnjem setu pokusa usporedili smo morfološki nalaz zahvaćenih tibiotalarnih zglobova između skupina Cre+/RBP-J i Cre-/RBP-J miševa s artritismom. Na histološkim rezovima stražnjih šapa obojenim Goldner-Masson-trikromom vidi se područje distalne tibije obilno infiltrirano upalnim stanicama u miševa s artritismom (Slika 51). Na istim histološkim preparatima proveli smo bojanje na TRAP, te smo utvrdili da skupina Cre+/RBP-J miševa ima značajno veći broj TRAP<sup>+</sup> osteoklasta priljubljenih uz koštane površine distalne tibije u odnosu na Cre-/RBP-J miševe. Taj nalaz u skladu je s rezultatima analize postupkom  $\mu$ CT, te ukazuje na pojačanu koštanu razgradnju u artritisu u uvjetima koćenja kanonskog signalnog puta Notch *in vivo*.



**Slika 51. Učinak utišavanja signalnog puta Notch *in vivo* na patohistološki nalaz upale zgloba u miševa s artritismom.** Miševima CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup> (Cre+/RBP-J) izazvan je artritis (CIA) imunizacijom pilećim kolagenom tipa II i od sekundarne imunizacije su dobivali tamoksifen (75 mg/kg intraperitonealno svaki drugi dan) za indukciju rekombinaze Cre. Kao kontrolnu skupinu koristili smo imunizirane miševe bez izražaja rekombinaze Cre (Cre-/RBP-J) koji su dobivali tamoksifen. Miševi su žrtvovani 35 dana nakon primarne imunizacije i stražnje šape su pripremljene za histološku analizu. Prikazani su reprezentativni histološki rezovi tibiotarnog zgloba za skupine Cre-/RBP-J i Cre+/RBP-J u sagitalnoj ravnini obojeni Goldner-Masson-trikromom (GMT) (A) i bojanjem na kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*) (B), uz povećanje 200x. Crvene strelice - područje osteitisa, crne strelice – TRAP<sup>+</sup> osteoklasti uz koštane površine distalne tibije. (C) Kvantificiran je broj osteoklasta u vidnom polju histološkog reza distalne tibije, uz povećanje 200x. Rezultati su izraženi po mišu, kao broj TRAP<sup>+</sup> osteoklasta po jednoj distalnoj tibiji za skupinu Cre-/RBP-J i Cre+/RBP-J. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. \*p < 0,05 u odnosu na miševe Cre-/RBP-J (Mann-Whitney U test).

Iz svega navedenog zaključili smo da početna hipoteza rada, u kojoj smo pretpostavili da će inhibicija signalnog puta Notch ublažiti razvoj artritisa i aktivnost osteoklasta, nije potvrđena, nego je uočen suprotan učinak. Utišavanje signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima koji izražavaju kemokinski receptor CX3CR1 djeluje tako da potiče diferencijaciju osteoklasta i koštanu resorpciju u artritisu, dok pojačan signal putem receptora Notch 1 ima manje uočljiv, ali suprotan učinak, odnosno koči sazrijevanje osteoklastnih progenitora.

## 6. Rasprava

Cilj ovog rada bio je utvrditi ulogu signalnog puta Notch u diferencijaciji osteoklastnih progenitora u mišjem modelu reumatoidnog artritisa. Koristili smo model artritisa potaknutog kolagenom u miševa divljega tipa C57BL/6 i dva dvostruko transgenična mišja soja u kojima je moduliran signalni put Notch. Kako bismo istražili ulogu signalnog puta Notch u miševa divljeg tipa signalni put inhibirali smo neutralizacijskim protutijelima, koje smo primjenjivali *in vitro* i *in vivo*, a u transgeničnim sojevima smo utišali ili potaknuli signalni put Notch specifično u osteoklastnim progenitorima koji izražavaju kemokinski receptor CX3CR1.

Uzevši u obzir dostupnu literaturu u kojoj se opisuje važnost signalnog puta Notch u razvoju i aktivnosti osteoklasta, pretpostavili smo da će utišavanje signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima smanjiti osteoklastogeni potencijal i smanjiti razaranje kosti u artritisu. Međutim, već smo u pokusima s neutralizacijskim protutijelima pokazali da inhibicija signalnog puta Notch zapravo ima suprotan učinak od očekivanog i pojačava osteoklastogenezu. Zbog toga smo nadopunili početni plan istraživanja, te smo uz transgenični model u kojem utišavamo signalni put Notch u osteoklastnim progenitorima uspjeli dopremiti i uzgojiti i transgenične miševa s pojačanom aktivacijom receptora Notch 1 u osteoklastnim progenitorima. Uvođenje oba transgenična modela omogućilo je dodatnu karakterizaciju učinka signalnog puta Notch u osteoklastogenezi u kontekstu upale i artritisa.

### 6.1. Osteoklastni progenitori koji izražavaju receptor CX3CR1 umnoženi su u mišjem modelu artritisa

U prvom setu pokusa cilj nam je bio karakterizirati osteoklastne progenitore, posebice subpopulaciju koja izražava CX3CR1, s obzirom na kasnije korištene transgenične mišje sojeve. Potvrdili smo prisutnost monocitnih populacija u koštanoj srži, slezeni i perifernoj krvi i kontrolnih i artritčnih miševa, koje se u staničnoj kulturi uz dodatak osteoklastogenih čimbenika M-CSF i RANKL diferenciraju u zrele osteoklaste koji izražavaju enzim TRAP i imaju sposobnost koštane razgradnje. Potvrdili smo da osteoklastne progenitore nalazimo u populaciji hematopoetskih stanica. Osteoklastni progenitori koštane srži fenotipa CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>-/lo</sup>CD115<sup>+</sup> djelomično se razlikuju od progenitora u slezeni i perifernoj krvi fenotipa CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> po niskom izražaju molekule CD11b, koja je dio integrina β2. Time je naše istraživanje u skladu s prethodnim istraživanjima, kojima je također potvrđeno da osteoklastni progenitori koštane srži imaju niži izražaj molekule CD11b od perifernih osteoklastnih progenitora (52, 56). Jacquin i

suradnici opisali su dinamiku izražaja biljega CD11b ovisno o stupnju zrelosti osteoklastnih progenitora, s početnim slabim izražajem u koštanoj srži, pojačanjem dodatkom čimbenika M-CSF u osteoklastogenoj kulturi *in vitro*, te ponovnim sniženjem dodatkom čimbenika RANKL (55). S druge strane, ako pretpostavimo da dio perifernih osteoklastogenih progenitora infiltrira periartikularno područje, posebice u artritisu, postoji mogućnost da nakon udomljavanja ti progenitori smanjuju izražaj biljega CD11b, što je pokazano za različite integrine (53). Brojne druge istraživačke skupine opisale su fenotip osteoklastnih progenitora pomoću manje ili više sličnih površinskih staničnih biljega, te su međusobno podudarne po tome da osteoklastni progenitori izražavaju hematopoetske biljege mijeloidne loze, ali ne izražavaju limfoidne i granulocitne biljege (56-60).

Naša je skupina prethodno potvrdila da izolirani osteoklastni progenitori imaju oligopotentni diferencijacijski potencijal te zadržavaju mogućnost diferencijacije u makrofage ili dendritične stanice, što se slaže s opisima postojanja zajedničkog progenitora MODP (57, 58, 114). Diferencijacijski potencijal  $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$  osteoklastnih progenitora prema trima mijeloidnim linijama pokazan je u prethodnim istraživanjima, uključujući i naše skupine (52, 56, 114). Osteoklastni progenitori su aktivne stanice koje imaju mogućnost migracije iz koštane srži na udaljena mjesta vođeni kemokinskim signalima, što je od posebne važnosti u patološkim stanjima poput upale ili koštanih prijeloma. Osteoklastni progenitori na svojoj površini izražavaju kemokinske receptore, s time da se posebno ističe izražaj receptora CCR2 i CX3CR1 (53). U ovom istraživanju potvrdili smo da kemokinski receptor CX3CR1 izražavaju gotovo svi progenitori iz koštane srži i ekstramedularnih tkiva, što opravdava upotrebu mišjeg soja CX3CR1CreERT2 kao njihovog biljega.

U mišjem modelu artritisa potaknutog kolagenom potvrdili smo povećanje populacije osteoklastnih progenitora  $CD115^+$  koje je razmjerno težini bolesti. Jedna od glavnih značajki reumatoidnog artritisa je postupno razaranje kosti do kojeg dolazi uslijed pojačane osteoklastogeneze. Patološka osteoklastogeneza u autoimunosnom artritisu posljedica je pro-osteoklastogenog utjecaja proupalnih medijatora i autoprotutijela te pojačanog stvaranja i novačenja osteoklastnih progenitora u zahvaćena tkiva (2, 13, 53, 102).

## **6.2. Porast udjela osteoklastnih progenitora koji izražavaju receptore signalnog puta Notch u artritisu**

Sljedeći cilj istraživanja bio je na definiranoj populaciji osteoklastnih progenitora utvrditi izražaj komponenti signalnog puta Notch. Najprije smo analizom osteoklastnih progenitora iz

različitih tkiva potvrdili izražaj sva četiri receptora signalnog puta Notch, na razini izražaja bjelančevina odnosno gena. Fenotipska analiza pokazala je da najveći udio osteoklastnih progenitora u analiziranim tkivima izražava receptore Notch 1 (oko 30-40%) i Notch 2 (oko 40-60%) i u kontrolnih i u artritičnih miševa, dok su receptori Notch 3 i Notch 4 izraženi na znatno manjem udjelu osteoklastnih progenitora. Nadalje smo uočili da u artritisu povećan udio osteoklastnih progenitora u periartikularnoj koštanoj srži i perifernim tkivima (slezena i periferna krv) izražava receptor Notch 2 i Notch 3 u odnosu na kontrolne miševe, a osteoklastni progenitori perifernih tkiva dodatno imaju i povećan izražaj receptora Notch 4. Do sada nije provedena sustavna analiza izražaja receptora Notch na osteoklastnim progenitorima svježe izoliranim iz različitih tkiva niti su analizirane promjene izazvane artritisom. Sekine i suradnici potvrdili su izražaj receptora Notch 2 i Notch 3 na osteoklastnim progenitorima iz koštane srži fenotipa CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>, ali je analiza rađena nakon trodnevne kulture uz dodatak čimbenika M-CSF (87). Daljnjom diferencijacijom tih stanica u osteoklaste uočili su povećan izražaj receptora Notch 1. Bai i suradnici su analizom makrofaga koštane srži, koje su koristili kao prethodnike osteoklasta, utvrdili izražaj receptora Notch 1 i Notch 3, no nisu detektirali izražaj receptora Notch 2 (86). Taj se nalaz dosta razlikuje od naših rezultata, a razlika bi se mogla objasniti time da su koristili makrofage koštane srži kao izvor osteoklastnih progenitora, dok je naša populacija sortiranih progenitora znatno homogenija. Uz to, izražaj su analizirali na staničnom lizatu postupkom imunoblota, u odnosu na imunofenotipizaciju definirane populacije osteoklastnih progenitora koju smo mi proveli.

Genski izražaj komponenti signalnog puta Notch pratili smo i tijekom diferencijacije sortiranih osteoklastnih progenitora koštane srži *in vitro* te smo utvrdili da postoji određena dinamika izražaja koja se mijenja u artritisu. Neposredno nakon sortiranja, osteoklastni progenitori artritičnih miševa imaju viši izražaj gena za *Notch2* a niži izražaj gena za *Notch1*. U sortiranim osteoklastnim progenitorima geni za *Notch3* i *Notch4* razmjerno su slabije izraženi, ali njihov izražaj raste s osteoklastogenom kulturom. Ashley i suradnici utvrdili su izražaj sva četiri gena za receptore Notch tijekom diferencijacije osteoklasta iz makrofaga koštane srži (88). Genski izražaj receptora *Notch1* i *Notch2* u stanicama makrofagne linije RAW potaknutim čimbenikom RANKL, uz izostanak izražaja gena za receptore *Notch3* i *Notch4*, pokazali su Fukushima i suradnici (90). Izražaj receptora Notch 1 i Notch 2 pokazali su i na proteinskoj razini, te slično našim rezultatima, utvrdili razmjerno veći izražaj receptora Notch 2. Također su pokazali da tijekom diferencijacije osteoklasta raste izražaj transkripcijskog čimbenika *Hes1* što potvrđuje aktivaciju signalnog puta Notch.

Uz receptore Notch, analizirali smo i izražaj liganada Notch u izoliranim hematopoetskim tkivima i tijekom diferencijacije sortiranih osteoklastnih progenitora. Ligandi signalnog puta Notch očekivano su izraženi u hematopoetskim tkivima s obzirom na ulogu toga puta u regulaciji hematopoeze i funkcije imunskih stanica (77, 78). U kontekstu našeg modela, specifično smo pokazali da je u periartikularnoj koštanoj srži i slezeni miševa s artritisom veći izražaj gena za ligand *Jag1*. Nadalje smo pokazali da se tijekom diferencijacije osteoklastnih progenitora pojačava izražaj gena za ligande *Jag1* i *Dll1*, a slično su pokazali i Sekine i suradnici (87). Ista studija pokazala je izražaj gena za ligand *Jag2* u kultiviranim stanicama koštane srži potaknutim čimbenikom M-CSF. S diferencijacijom tih stanica u osteoklaste, uočen je porast izražaja gena za *Dll1* i *Jag1*. Ashley i suradnici su opisali smanjenje izražaja gena za ligande *Jag1* i *Jag2*, a porast izražaja gena za ligand *Dll4* tijekom diferencijacije osteoklasta (88). Navedeno upućuje na zaključak da su osteoklastni progenitori podložni regulaciji putem signalnog puta Notch tijekom diferencijacije u osteoklaste, a signale mogu dobiti iz neposredne okoline. U artritisu se ta dinamika mijenja promjenom izražaja receptora na osteoklastnim progenitorima i liganda u njihovom okolišu, od čega možemo istaknuti, na temelju našeg i sličnih istraživanja, pojačan izražaj receptora Notch 2 i Notch 3, te liganada JAG1 i DLL1.

### 6.3. Poticanje liganima signalnog puta Notch inhibira diferencijaciju osteoklasta

Nakon što smo potvrdili izražaj receptora signalnog puta Notch na osteoklastnim progenitorima, istražili smo koji učinak na njihovu diferencijaciju ima poticanje liganima signalnog puta Notch koristeći *in vitro* model pločica obloženih liganima Notch. Aktivaciju signalnog puta Notch nakon poticanja liganima potvrdili smo analizom izražaja transkripcijskih ciljeva signalnog puta Notch, i to *Hes1*, *Hey1* i *Bcl2*. Transkripcijski ciljevi *Hes1* i *Hey1* uobičajeno se koriste za potvrdu aktivacije signalnog puta Notch (67, 68). Uz to, *Bcl2* često se rabi kao biljeg aktivacije signalnog puta Notch u stanicama koje intenzivno proliferiraju i diferenciraju (119, 121, 122).

Preosteoklasti potaknuti ligandom JAG1 imali su veći izražaj sva tri gena za transkripcijske ciljeve *Hes1*, *Hey1* i *Bcl2* u odnosu na kontrolu koja nije potaknuta ligandom, a preosteoklasti potaknuti ligandom DLL1 imali su veći izražaj gena *Hes1* i *Bcl2*. Ligand JAG1 imao je jasan učinak ovisan o dozi na inhibiciju diferencijacije osteoklastnih progenitora iz kontrolnih miševa i miševa s artritisom. Sukladno tome, geni specifični za diferencijaciju osteoklasta bili su višestruko niži u preosteoklasta potaknutih ligandom JAG1. Isti učinak liganda JAG1 na osteoklastogenezu pokazali su i istraživače skupine Bai i Sekine, dok su Fukushima i suradnici

pokazali obrnuti učinak (86, 87, 90). Zanimljivo, Fukushima i suradnici opisali su stimulacijski učinak na osteoklastogenezu ne samo imobiliziranim ligandom već i topivim oblikom liganda JAG1 (90). U literaturi je opisano da topivi ligandi signalnog puta Notch imaju inhibicijski, a ne stimulacijski učinak na signalni put Notch, jer ne dovode do konformacijske promjene potrebne za izlaganje mjesta cijepanja receptora, a svojim vezanjem sprječavaju svrsishodno vezanje imobiliziranog liganda i poticanje nizvodne signalizacije (68). U kontrolnih miševa, poticanje ligandom DLL1 nije imalo jasan učinak ovisan o dozi, dok je u miševa s artritisom dovelo do inhibicije osteoklastogeneze i smanjenja izražaja gena koji su pokazatelj osteoklastne diferencijacije, što je moguće odraz diferencijalne regulacije osteoklastogeneze u fiziološkim i patološkim uvjetima. Yamada i suradnici utvrdili su da poticanje izoliranih stanica mišje koštane srži kao i adherentnih stanica koštane srži prethodno potaknutih čimbenikom M-CSF imobiliziranim ligandom DLL1 dovodi do smanjenog broja diferenciranih osteoklasta u odnosu na kontrolu (85). Za poticanje ligandom DLL1, Sekine i suradnici su utvrdili da za razliku od liganda JAG1, DLL1 potiče osteoklastogenezu, a inhibicija neutralizacijskih protutijelima na DLL1 smanjuje broj osteoklasta *in vitro*. Nadalje su utvrdili da poticanje ligandom JAG1 jače potiče aktivaciju domene NICD receptora Notch 1, dok poticanje ligandom DLL1 jače potiče aktivaciju domene NICD receptora Notch 2 (87). Ponovo treba istaknuti da je ta skupina autora za izvor osteoklastnih progenitora koristila makrofage koštane srži prethodno potaknute čimbenikom M-CSF. Prema dostupnoj literaturi, naše istraživanje po prvi put prikazuje učinak liganada Notch na homogenu populaciju sortiranih nezrelih osteoklastnih progenitora. Progenitori koje smo izolirali nalaze se u stadiju diferencijacije u kojoj još uvijek imaju potencijal usmjeravanja prema osteoklastima, dendritičnim stanicama i makrofagima, kako smo prethodno pokazali (114).

Na heterogenost populacija koje su korištene kao prethodnice osteoklasta kao izvor razlika u rezultatima djelovanja liganda Notch osvrnuli su se i Ashley i suradnici u svom istraživanju (88). Naime, u pokušaju da rastumače razlike u istraživanju učinaka signalnog puta Notch u osteoklastogenezi, ispitali su učinke poticanja ligandima u tri različita protokola: sađenje adherentnih makrofaga koštane srži s čimbenicima M-CSF i RANKL na zdence obložene imobiliziranim ligandima, sađenje neadherentnih makrofaga koštane srži na ligandima-obložene zdence i sađenje neadherentnih makrofaga koštane srži na zdence obložene ligandima samo uz čimbenik M-CSF uz naknadno dodavanje čimbenika RANKL. Ta tri protokola oponašala su tri različite vremenske točke poticanja signalnog puta Notch: poticanje čimbenikom RANKL prije aktivacije signalnog puta Notch, poticanje čimbenikom RANKL istovremeno s aktivacijom signalnog puta Notch i poticanje čimbenikom RANKL nakon



aktivacije signalnog puta Notch. Prvim protokolom uočili su pojačanu osteoklastogenezu u zdencima obloženim ligandima signalnog puta Notch. Drugim protokolom ligand JAG1 smanjio je osteoklastogenezu, međutim sađenjem većeg broja stanica uspjeli su postići broj osteoklasta jednak kontrolnoj skupini. U trećem protokolu ligand JAG1 inhibirao je osteoklastogenezu bez obzira na gustoću sađenja stanica. Time su pokazali da je rezultat aktivacije signalnog puta Notch ovisan o vremenskom trenutku poticanja te da je za potpuno sazrijevanje i spajanje osteoklasta potrebna aktivacija signalnog puta Notch, međutim da u nezreljim stanicama aktivacija potiskuje diferencijaciju prema osteoklastnoj lozi (88). S obzirom na navedeno, inhibicija ligandima koju smo utvrdili moguće je odraz ranijeg stadija u sazrijevanju sortiranih osteoklastnih progenitora u odnosu na makrofage koštane srži koji su korišteni u većini sličnih istraživanja.

#### **6.4. Inhibicija receptora Notch 1 i Notch 2 neutralizacijskim protutijelima u artritisu potiče diferencijaciju osteoklasta**

Nakon što smo utvrdili da ligandi Notch inhibiraju diferencijaciju sortiranih osteoklastnih progenitora, logično je bilo istražiti učinak potiskivanja signalnog puta Notch na osteoklastogenezu. Dodavanjem neutralizacijskih protutijela na receptore Notch 1 i Notch 2 u osteoklastogene kulture potaknute ligandima, poništili smo inhibicijski učinak liganda DLL1 na diferencijaciju osteoklasta. Poticanje ligandom JAG1 jače je inhibiralo osteoklastogenezu, tako da je samo neutralizacijsko protutijelo na receptor Notch 2 poništilo inhibicijski učinak liganda. Sekine i suradnici koristili su agonistička protutijela na receptore Notch i pokazali da poticanje receptora Notch 1 smanjuje osteoklastogenezu, dok poticanje receptora Notch 2 pojačava razvoj osteoklasta (87). Canalis i suradnici su pokazali sličnu ulogu receptora Notch 2 u osteoklastogenezi koristeći neutralizacijska protutijela na receptor Notch 2 u mišjem modelu sindroma Hajdu-Cheney (91). Naime sindrom je posljedica mutacije u genu za receptor Notch 2, pa receptor postaje pretjerano aktivan dovodeći do osteoporoze i patoloških koštanih prijeloma. *In vitro* obradom osteoklastogenih kultura makrofaga koštane srži neutralizacijskim protutijelom na receptor Notch 2, smanjili su stvaranje osteoklasta i koštanu razgradnju. Ponovno, sva navedena istraživanja koristila su heterogenu populaciju kao ishodište osteoklastnih progenitora, koja je uz progenitorske stanice vrlo vjerojatno uključivala i puno zrelije stadije osteoklastne loze.

Uz model učinka neutralizacijskih protutijela na diferencijaciju osteoklasta *in vitro*, miševe s artritisom obradili smo neutralizacijskim protutijelima na receptore Notch 1 i Notch 2 *in vivo*. S obzirom na to da miševi soja C57BL/6 imaju relativno nižu incidenciju razvoja artritisa u

odnosu na podložnije sojeve, razlika u incidenciji i težini artritisa među skupinama koje su dobivale neutralizacijska protutijela i neobrađenu skupinu nije bila značajna. Međutim miševi obrađeni neutralizacijskim protutijelima imali su značajno više osteoklastnih progenitora u koštanoj srži i slezeni. Također imali su nešto manji volumen mineralizirane kosti u stražnjim šapama, no s obzirom na broj obrađenih životinja razlika se nije pokazala statistički značajna. Time smo pokazali da inhibicija receptora Notch 1 i Notch 2 tijekom razvoja artritisa *in vivo* vjerojatno dovodi do pojačanog stvaranja osteoklastnih progenitora, koji spajanjem u zrele osteoklaste pridonose patološkoj razgradnji kosti u artritisu. U mišjem modelu sindroma Hajdu-Cheney, liječenjem miševa neutralizacijskim protutijelima na receptor Notch 2 postignuto je ublažavanje osteopenije i smanjenje broja osteoklasta *in vivo* (91). Nadalje, Fukushima i suradnici su pokazali da se blokiranjem signalnog puta Notch nespecifičnim inhibitorom  $\gamma$ -sekretazom u kasnijim stadijima osteoklastogeneze, koja je ovisna o čimbeniku RANKL, smanjuje broj osteoklasta diferenciranih iz makrofaga koštane srži (90). Moguće obrazloženje o različitom djelovanju protutijela je trenutak aktivacije receptora Notch 2, čiji je signal potreban u kasnijim fazama osteoklastogeneze, a pretjerana aktivacija dovodi do osteopenije. Nasuprot tome, u ranijim fazama signal putem receptora Notch 2 koči usmjeravanje mijeloidne loze prema osteoklastnim progenitorima. Sekine i suradnici su istraživali mišji model artritisa izazvan prijenosom seruma miševa K/BxN, koji oponaša efektorsku fazu autoimunog artritisa (87). S obzirom na to da su prethodno povezali receptor Notch 2 i ligand DLL1 kao važne u poticanju osteoklastogeneze, miševe su liječili neutralizacijskim protutijelima na ligand DLL1. U obrađenih miševa došlo je do kliničkog poboljšanja artritisa, smanjenja broja TRAP<sup>+</sup> osteoklasta u zglobovima i u konačnici do smanjenja deformiteta izazvanih artritisom. Također su u modelu osteoporoze izazvane ovarijektomijom, odnosno deplecijom estrogena, u miševa obrađenima neutralizacijskim protutijelima na ligand DLL1 utvrdili povećanje trabekularne koštane mase.

### **6.5. Ciljanjem stanica koje izražavaju receptor CX3CR1 uspješno označavamo osteoklastne progenitore**

Uz modulaciju signalnog puta Notch neutralizacijskim protutijelima, u istraživanju smo koristili i transgenične mišje sojeve s modulacijom signalnog puta Notch ciljano u osteoklastnim progenitorima. Iako smo prvotno očekivali da će inhibicija signalnog puta Notch smanjiti osteoklastogenezu u artritisu, pokusima s neutralizacijskim protutijelima pokazali smo da inhibicija receptora Notch 1 i Notch 2 pojačava stvaranje osteoklasta *in vitro*, a *in vivo* dovodi do povećanog broja osteoklastnih progenitora i smanjenja koštane mase. Pošto opaženi učinak

može biti rezultat djelovanja protutijela na druge stanice, nadalje smo istražili izravan učinak utišavanja signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima na njihovu aktivnost.

Naša istraživačka skupina prethodno je potvrdila da je udio osteoklastnih progenitora povećan u artritisu i da oni pridonose patološkoj osteoklastogenezi (53, 54, 102). Osim osteoklastnih progenitora iz koštane srži važan izvor progenitora su i slezena i periferna krv (52, 53, 59, 60). U reumatoidnom artritisu i prikladnim mišjim modelima, ali i u drugim patološkim procesima poput koštanih prijeloma, dolazi do pojačanog obrtaja stanica osteoklastne loze, koje se u tim potaknutim uvjetima pojačano nadomještaju i progenitorskim stanicama iz ekstramedularnih tkiva. Jedan od funkcionalno važnih biljega takvih migratornih osteoklastnih progenitora je i kemokinski receptor CX3CR1 (52, 53, 113). Novak i suradnici su potvrdili da se osteoklasti potrebni za remodeliranje kalusa pri cijeljenju prijeloma uglavnom razvijaju iz CX3CR1<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora iz cirkulacije, a ne iz koštane srži (63). Našim prethodnim istraživanjima, kao i početnim pokusima u sklopu ovog rada, potvrdili smo da se mijeloidni progenitori koji izražavaju biljeg CX3CR1 mogu učinkovito usmjeriti u osteoklaste uz dodatak čimbenika RANKL i M-CSF (53). S obzirom na to da smo utvrdili da su gotovo svi osteoklastni progenitori u periartikularnoj koštanoj srži i slezeni CX3CR1<sup>+</sup>, za označavanje populacije osteoklastnih progenitora koristili smo taj receptor kao dovoljno specifičan biljeg. Za kondicionalnu modulaciju izražaja gena često se koristi sustav *Cre/loxP*, a s obzirom na istraživačko pitanja bilo nam je važno označiti osteoklastne progenitore koji su potaknuti artritisom, te smo odlučili koristiti mišveve CX3CR1CreERT2. Takva linija omogućava nam i vremensku regulaciju utišavanja signalnog puta Notch, s obzirom na to da se rekombinaza Cre aktivira tek nakon primjene tamoksifena (108).

Prije pokusa s utišavanjem signalnog puta Notch proveli smo set pokusa kojima smo testirali možemo li tamoksifenom aktivirati rekombinazu Cre i u kojoj mjeri je rekombinacija učinkovita. Uz pomoć križanog soja CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup> vizualizirali smo označene stanice koje izražavaju TdTomato i utvrdili smo protokol *in vivo* primjene tamoksifena za označavanje što većeg broja stanica. Tako smo pomoću fluorescentnog biljega precizno definirali CX3CR1<sup>+</sup> stanice u kojima ćemo utišati transkripcijski čimbenik Rbpjk, utvrdili njihovu tkivnu raspodjelu te potvrdili osteoklastogeni potencijal tih stanica. Potvrdili smo da stanice koje izražavaju TdTomato nalazimo u koštanoj srži, slezeni, perifernoj krvi i tkivu mišjih šapa. TdTomato<sup>+</sup> stanice obogaćene su osteoklastnim progenitorima u odnosu na TdTomato<sup>-</sup> stanice. Također pokazali smo da opaženo umnažanje osteoklastnih progenitora u artritisu također vidimo i u populaciji TdTomato<sup>+</sup> osteoklastnih progenitora. Postoji nekoliko

mišjih Cre-linija koje se koriste za gensku manipulaciju osteoklastnih progenitora, primjerice LysMCre, RANKCre i Csfr1Cre (111). Nijedna od navedenih linija nije potpuno specifična za osteoklastnu lozu, te uključuje i neke subpopulacije drugih mijeloidnih stanica. Prema prethodnim istraživanjima, linija CX3CR1CreERT2 je iz nekoliko razloga bila prikladna našem istraživanju, ponajprije zbog toga što uključuje i periferne migratorne osteoklastne progenitore koji su podložni upalnim signalima i udomljavanju u zahvaćenom tkivu te sadržava velik osteoklastogeni potencijal. No, različitim protokolima davanja tamoksifena utvrdili smo da su CX3CR1<sup>+</sup> osteoklastni progenitori razmjerno kratkoživući u perifernim tkivima, te smo zbog toga obradu tamoksifenom morali ponavljati u nekoliko navrata tijekom razvoja artritisa.

## **6.6. Utišavanje signalnog puta Notch u osteoklastnim progenitorima pojačava osteoklastogenezu**

S obzirom na to da smo tamoksifenom uspješno pokazali aktivaciju rekombinaze Cre korištenjem fluorescentnog biljega, nadalje smo proveli pokuse utišavanja signalnog puta Notch *in vitro* koristeći osteoklastne progenitore iz križanog soja CX3CR1CreERT2/RBP-J<sup>fl/fl</sup>. Inaktivacija transkripcijskog čimbenika Rbpjk dovela je do diferencijacije povećanog broja TRAP<sup>+</sup> osteoklasta, koji su također bili značajno veći u odnosu na kontrolne kulture. Poticanje diferencijacije preosteoklasta u kulturi dodatkom LPS-a dovelo je do pojačane osteoklastogeneze, a utišavanje signalnog puta Notch dodatno je potaknuo diferencijaciju osteoklasta. Tim modelom dodatka LPS-a *in vitro* smo oponašali upalne uvjete koji postoje u artritisu i drugim imunosno-posredovanim upalnim bolestima (123, 124). Za dodatnu provjeru učinka modulacije signalnog puta Notch koristili smo i model u kojemu smo pojačali aktivaciju preko receptora Notch 1 koristeći križani soj CX3CR1CreERT2/NICD1<sup>fl/+</sup>. Sukladno učinku utišavanja, pojačana aktivacija signalnog puta Notch dovela je do smanjenja broj osteoklasta *in vitro*. U upalnim uvjetima učinak aktivacije signalnog puta Notch na inhibiciju osteoklastogeneze više nije bio uočljiv, što vjerojatno upućuje na zaključak da u upalnim uvjetima drugi signalni putevi povezani s aktivacijom osteoklastnih progenitora nadvladavaju inhibicijski učinak signala Notch (89, 114).

Nadalje smo, u *in vivo* pokusima u transgeničnih miševa s artritisom, pokazali da utišavanje signalnog puta Notch povećava broj mijeloidnih stanica u koštanoj srži i slezeni, uz povećanje udjela osteoklastnih progenitora. Ti rezultati sukladni su rezultatima koje smo dobili primjenom neutralizacijskih protutijela na receptore Notch 1 i Notch 2. Također, zbog niske incidencije artritisa, nismo uočili značajne razlike u težini bolesti iako su miševi s utišanim signalnim putem Notch imali nešto veću incidenciju bolesti. Osteoklastni progenitori izolirani iz miševa

s utišanim signalnim putem Notch dali su više osteoklasta u kulturi, a uz to uočeno je i smanjenje inhibicijskog učinka liganda JAG1 na diferencijaciju osteoklasta. S druge strane, aktivacija signalnog puta Notch u miševa s artritisom rezultirala je blagim povećanjem udjela mijeloidnih stanica i osteoklastnih progenitora. Bai i suradnici pokazali su slične učinke koristeći LysMCre miševe s utišanim genima za receptore Notch 1, Notch 2 i Notch 3 u mijeloidnoj lozi, te utvrdili da utišavanje uzrokuje pojačanu osteoklastogenezu (86). Od sva tri receptora utvrdili su da utišavanje receptora Notch 1 ima najjači učinak na osteoklastogenezu. Zhao i suradnici su istraživali učinak utišavanja transkripcijskog čimbenika Rbpjk u mijeloidnoj lozi (LysMCre/RBP-J<sup>fl/fl</sup>) na razvoj osteoklasta (89). U *in vitro* uvjetima su u miševa LysMCre/RBP-J<sup>fl/fl</sup> potaknuli stvaranje osteoklasta pomoću citokina TNF- $\alpha$  te uočili pojačanu osteoklastogenezu. Također su pokazali da su miševi kojima nedostaje transkripcijski čimbenik Rbpjk osjetljivi na koštano razaranje potaknuto davanjem TNF- $\alpha$  *in vivo*. Isto su utvrdili u miševa kojima je potisnut izražaj receptora RANK i time pokazali da je indukcija osteoklastogeneze citokinom TNF- $\alpha$  u miševa kojima nedostaje transkripcijski čimbenik Rbpjk neovisna o čimbeniku RANKL. Nadalje u modelu artritisa CAIA, korištenjem miševa s pojačanom aktivacijom receptora Notch 1, pokazali su da pojačan izražaj transkripcijskog čimbenika Rbpjk, iako ne utječe na kliničku sliku artritisa i upalu, smanjuje koštano razaranje karakteristično za upalni artritis. Autori su također utvrdili da transkripcijski čimbenik Rbpjk ima ulogu negativnog regulatora osteoklastogeneze, posebice u upalnim stanjima, i direktno koči izražaj c-Fos te povećava izražaj IRF-8 koji koči izražaj NFATc1. S druge strane, Goel i suradnici upotrijebili su model LysMCre s utišavanjem signalnog puta Notch pomoću ekspresije dominantno negativnog čimbenika MAML (dnMAML, prema engl. *dominant negative MAML*) (92). Utišavanje signalnog puta Notch u mijeloidnoj lozi smanjilo je resorptivne funkcije osteoklasta, ali uz održan broj osteoklasta usporediv s kontrolnom skupinom, što govori da je signalni put Notch potreban za terminalno sazrijevanje osteoklasta.

Utvrdili smo da, osim učinka na razvoj osteoklasta, utišavanje signalnog puta Notch dovodi do pojačanog koštanog razaranja u artritisu. Jedna od glavnih značajki upalnih artritisa je pojačano razaranje kosti aktivnim osteoklastima uz smanjenje osteoblastne aktivnosti i koštane izgradnje (2, 125). Osteoblasti, osteociti i osteoklasti na složen način reguliraju koštanu homeostazu te održavaju fiziološku koštanu masu i integritet koštanog tkiva, proizvodeći razne čimbenike kojima utječu jedni na druge. Stoga smo u miševa s utišanim signalnim putem Notch u CX3CR1<sup>+</sup> osteoklastnim progenitorima analizirali diferencijacijski potencijal osteoblastnih progenitora koštane srži, te nismo uočili značajne promjene u osteoblastogenezi u odnosu na kontrolne miševe. U istraživanju Goel i suradnika osteoklasti s utišanim signalnim putem Notch

zadržali su sposobnost poticanja osteoblasta, ali veća aktivnost osteoblasta u fiziološkim uvjetima nije imala utjecaja na arhitekturu kosti (92). S druge strane u modelu frakture utvrđena je povećana mineralizacija i stvaranje većih kalusa, bez utjecaja na broj osteoklasta, što govori u prilog smanjenoj resorptivnoj funkciji osteoklasta s utišanim signalnim putem Notch.

Pretraživanjem literature nismo utvrdili druga slična istraživanja koja su analizirala učinak utišanog puta Notch u osteoklastnim progenitorima na osteoblaste, no ima nekoliko istraživanja koja su modulirala signalni put Notch u osteoblastnim progenitorima. Pojačana aktivnost receptora Notch 1 u stromalnim stanicama u istraživanju Yamade i suradnika rezultirala je povećanom proizvodnjom čimbenika RANKL i OPG, ali smanjenom proizvodnjom M-CSF-a što govori u prilog smanjenoj sposobnosti stromalnih stanica da podrže osteoklastogenezu (85). Bai i suradnici su utišali izražaj receptora Notch 1 u osteoblastima što je smanjilo je izražaj čimbenika OPG, a pojačalo izražaj čimbenika RANKL, neposredno pojačavajući stvaranje osteoklasta (86). Također Novak i suradnici pojačali su aktivnost receptora Notch 1 u osteohondroprogenitorima, ali nisu pokazali utjecaj na broj osteoklasta *in vivo* (126).

#### **6.7. Pretpostavljeni model djelovanja modulacije signalnog puta Notch na osteoklastne progenitore u artritisu**

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da signalni put Notch ima negativnu ulogu u regulaciji razvoja i aktivnosti osteoklasta u ranijim stadijima sazrijevanja te da aktivacija signalnog puta Notch koči diferencijaciju ranih progenitora. U upali signalni put Notch ima važnu ulogu u regulaciji diferencijacije osteoklasta, ali niz drugih čimbenika, proupalnih citokina i osteoklastogenih medijatora reguliraju konačni ishod koštane razgradnje. Rezultati sličnih istraživanja dijelom su kontradiktorni i zbog različitih upalnih modela koji su korišteni, te različitih modela moduliranja signalnog puta Notch.

Navedenih nekoliko radova koji su koristili različite mišje Cre-linije za ciljanje osteoklastnih progenitora i različite načine blokiranja Notch signala, zajedno s našim istraživanjem, upućuju na zaključak da kanonski signalni put Notch negativno regulira razvoj i aktivnost osteoklastnih progenitora. Iako su neka istraživanja pokazala da inhibicijom signalnog puta Notch dolazi do poboljšanja kliničke slike artritisa, ovim smo radom potvrdili neželjeni učinak takve inhibicije na pojačanu aktivnost osteoklasta i posljedičnu koštanu razgradnju, što treba imati na umu s obzirom na kliničke terapijske opcije blokiranja signala Notch.

## 7. Zaključci

1. Stanice fenotipa  $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$  u koštanoj srži i  $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+CD115^+$  u slezeni čine populaciju osteoklastnih progenitora, koji se uz dodatak osteoklastogenih čimbenika RANKL i M-CSF diferenciraju u zrele osteoklaste.
2. Osteoklastni progenitori koštane srži i slezene izražavaju kemokinski receptor CX3CR1, a sortirani CX3CR1<sup>+</sup> osteoklastni progenitori imaju velik osteoklastogeni potencijal.
3. U mišjem modelu reumatoidnog artritisa povećan je udio osteoklastnih progenitora te taj udio pozitivno korelira s kliničkim razvojem artritisa.
4. Osteoklastni progenitori izražavaju receptore i ligande signalnog puta Notch, posebice receptore Notch 1 i 2, a u miševa s artritism povećava se udio osteoklastnih progenitora koji izražavaju receptore Notch 2 i 3.
5. Ligandi signalnog puta Notch, JAG1 i DLL1 inhibiraju diferencijaciju osteoklastnih progenitora miševa s artritism u osteoklastogenim kulturama.
6. Inhibicija receptora Notch 1 i Notch 2 neutralizacijskim protutijelima pojačava diferencijaciju osteoklastnih progenitora *in vitro*.
7. Obrada miševa s artritism neutralizacijskim protutijelima na receptore Notch 1 i Notch 2 *in vivo* povećava udio mijeloidnih stanica i osteoklastnih progenitora u koštanoj srži i slezeni.
8. U mišjem soju CX3CR1CreERT2/Ai9<sup>fl/+</sup> populacija označenih stanica CX3CR1<sup>+</sup> obogaćena je osteoklastnim progenitorima, koji se uz dodatak osteoklastogenih čimbenika RANKL i M-CSF diferenciraju u zrele osteoklaste.
9. Utišavanje transkripcijskog čimbenika Rbpjk (mišji soj Cre<sup>+</sup>/RBP-J) u osteoklastnim progenitorima *in vitro* dovodi do pojačane, dok aktivacija receptora Notch 1 (mišji soj Cre<sup>+</sup>/NICD1) dovodi do smanjene diferencijacije osteoklasta.

10. Utišavanje transkripcijskog čimbenika Rbpjk *in vivo* (mišji soj Cre+/RBP-J) u osteoklastnim progenitorima u miševa s artritisom povećava udio mijeloidnih stanica u koštanoj srži i slezeni, te osteoklastnih progenitora u koštanoj srži.
11. Osteoklastni progenitori izolirani iz artritičnih miševa s utišanim transkripcijskim čimbenikom Rbpjk *in vivo* (mišji soj Cre+/RBP-J) pojačano se diferenciraju u osteoklaste *in vitro*.
12. Utišavanje transkripcijskog čimbenika Rbpjk u osteoklastnim progenitorima *in vivo* (mišji soj Cre+/RBP-J) ne utječe na diferencijaciju osteoblasta *in vitro*.
13. Utišavanje transkripcijskog čimbenika Rbpjk (mišji soj Cre+/RBP-J) u osteoklastnim progenitorima u miševa s artritisom dovodi do pojačane osteoklastogeneze *in vivo* i pojačane koštane razgradnje, smanjujući udio mineralizirane kosti.



## 8. Sažetak

Lokalni i sustavni gubitak kosti u reumatoidnom artritisu posljedica je pojačane aktivnosti osteoklasta. Cilj ovog rada bio je istražiti učinke modulacije signalnog puta Notch na diferencijaciju osteoklastnih progenitora (OCP) i razgradnju kosti u mišjem modelu artritisa potaknutog kolagenom. OCP mišje koštane srži ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$ ) i slezene ( $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+CD115^+$ ) podrijetla su mijeloidne loze, izražavaju kemokinski receptor CX3CR1 i njihov je udio povećan u artritisu. OCP izražavaju sva četiri receptora signalnog puta Notch, a u artritisu povećan je udio OCP koji izražavaju receptore Notch 2 i 3. Poticanje OCP ligandima signalnog puta Notch JAG1 i DLL1 dovodi do inhibicije osteoklastogeneze. Obrada neutralizacijskim protutijelima na receptore Notch 1 i 2 pojačala je osteoklastogenezu *in vitro*, a obrada miševa s artritisom *in vivo* dovela je do povećanja udjela OCP. Koristeći transgenični mišji soj s utišanim signalnim putem Notch u OCP (CX3CR1CreERT2/RBP-J) uočili smo pojačanu osteoklastogenezu, a u mišjem soju s aktiviranom signalizacijom putem receptora Notch 1 u OCP (CX3CR1CreERT2/NICD1) uočili smo smanjenu osteoklastogenezu. U artritičnim miševa s utišanim signalnim putem Notch u OCP potvrdili smo pojačanu diferencijaciju osteoklastnih progenitora i pojačanu koštanu razgradnju koja dovodi do smanjenog volumena mineralizirane kosti. Naši rezultati potvrđuju inhibicijsku ulogu signalnog puta Notch u diferencijaciji osteoklastnih progenitora u artritisu.

## 9. Summary

Notch signaling pathway of osteoclast progenitors in rheumatoid arthritis mouse model

Maša Filipović, 2023

Periarticular and systemic bone loss in rheumatoid arthritis is mediated by increased osteoclast activity. We aimed to determine the effects of Notch signaling modulation on osteoclast progenitor (OCP) differentiation and arthritis-induced bone resorption in murine collagen-induced arthritis. Murine bone marrow and splenic OCPs, identified as  $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^{-/lo}CD115^+$  and  $CD45^+Ly6G^-CD3^-B220^-NK1.1^-CD11b^+CD115^+$  cells, respectively, derived from the myeloid lineage are specifically increased in arthritis and express the chemokine receptor CX3CR1. OCPs express all four Notch receptors and are susceptible to regulation through Notch signaling. In arthritis, we observed an increase in the frequency of OCPs expressing Notch 2 and 3. Stimulation with Notch ligand JAG1 and DLL1 results in inhibition of osteoclast differentiation, and treatment with neutralizing antibodies targeting Notch 1 and 2 results in increased osteoclastogenesis *in vitro* and increased frequency of OCPs in mice treated *in vivo*. We used transgenic mice with Notch signaling inhibition (CX3CR1CreERT2/RBP-J) or Notch 1 overexpression (CX3CR1CreERT2/NICD1) in OCPs and observed stimulated osteoclastogenesis with Notch deletion and reduced osteoclastogenesis with Notch 1 signal activation. Arthritic mice with inhibition of Notch signaling in OCPs had increased osteoclast differentiation and reduced talar bone volume. Our results confirm an inhibitory role of Notch signaling in osteoclast differentiation during arthritis.

## 10. Popis literature

1. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, i sur. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18001; 10.1038/nrdp.2018.1.
2. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: Mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(11):656-64; 10.1038/nrrheum.2012.153.
3. Figus FA, Piga M, Azzolin I, McConnell R, Iagnocco A. Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities. *Autoimmun Rev*. 2021;20(4):102776; 10.1016/j.autrev.2021.102776.
4. Scherer HU, Häupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2020;110:102400; 10.1016/j.jaut.2019.102400.
5. Holoshitz J. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22(3):293-8; 10.1097/BOR.0b013e328336ba63.
6. Tong Y, Zheng L, Qing P, Zhao H, Li Y, Su L, i sur. Oral microbiota perturbations are linked to high risk for rheumatoid arthritis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;9; 10.3389/fcimb.2019.00475.
7. Maeda Y, Takeda K. Role of gut microbiota in rheumatoid arthritis. *J Clin Med*. 2017;6(6); 10.3390/jcm6060060.
8. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205-19; 10.1056/NEJMra1004965.
9. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: A review. *Jama*. 2018;320(13):1360-72; 10.1001/jama.2018.13103.
10. 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; 10.1002/art.27584.
11. Auréal M, Machuca-Gayet I, Coury F. Rheumatoid arthritis in the view of osteoimmunology. *Biomolecules*. 2020;11(1); 10.3390/biom11010048.
12. Schett G. Osteoimmunology in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):210; 10.1186/ar2571.
13. Steffen U, Schett G, Bozec A. How autoantibodies regulate osteoclast induced bone loss in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2019;10:1483; 10.3389/fimmu.2019.01483.
14. Bugatti S, Manzo A, Caporali R, Montecucco C. Inflammatory lesions in the bone marrow of rheumatoid arthritis patients: A morphological perspective. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):229; 10.1186/ar4115.

15. Nieuwenhuis WP, van Steenbergen HW, Stomp W, Stijnen T, Huizinga TW, Bloem JL, i sur. The course of bone marrow edema in early undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis: A longitudinal magnetic resonance imaging study at bone level. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(5):1080-8; 10.1002/art.39550.
16. Zhang H, Xu H, Chen S, Mao X. The application value of MRI in the diagnosis of subclinical inflammation in patients with rheumatoid arthritis in remission. *J Orthop Surg Res.* 2018;13(1):164; 10.1186/s13018-018-0866-2.
17. Llorente I, García-Castañeda N, Valero C, González-Álvaro I, Castañeda S. Osteoporosis in rheumatoid arthritis: Dangerous liaisons. *Front Med (Lausanne).* 2020;7:601618; 10.3389/fmed.2020.601618.
18. Aguila HL, Rowe DW. Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis. *Immunological Reviews.* 2005;208(1):7-18; <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00333.x>.
19. Kim J-M, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim J-H. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. *Cells.* 2020;9(9):2073;
20. Takayanagi H. Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Reviews Immunology.* 2007;7(4):292-304; 10.1038/nri2062.
21. Nakamura I, Pilkington MF, Lakkakorpi PT, Lipfert L, Sims SM, Dixon SJ, i sur. Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone. *Journal of Cell Science.* 1999;112(22):3985-93; 10.1242/jcs.112.22.3985.
22. Väänänen HK, Liu Y-k, Lehenkari P, Uemara T. How do osteoclasts resorb bone? *Materials Science and Engineering: C.* 1998;6(4):205-9; [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(98\)00052-6](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(98)00052-6).
23. Miyamoto T, Ohneda O, Arai F, Iwamoto K, Okada S, Takagi K, i sur. Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood.* 2001;98(8):2544-54; 10.1182/blood.v98.8.2544.
24. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, i sur. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *The Journal of Clinical Investigation.* 1993;91(1):257-63; 10.1172/JCI116179.
25. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, i sur. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89(2):309-19; [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80209-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80209-3).

26. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S-i, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, i sur. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;234(1):137-42; <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6603>.
27. Grabert K, Sehgal A, Irvine KM, Wollscheid-Lengeling E, Ozdemir DD, Stables J, i sur. A transgenic line that reports CSF1R protein expression provides a definitive marker for the mouse mononuclear phagocyte system. *J Immunol*. 2020;205(11):3154-66; 10.4049/jimmunol.2000835.
28. Fuller K, Owens JM, Jagger CJ, Wilson A, Moss R, Chambers TJ. Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *Journal of Experimental Medicine*. 1993;178(5):1733-44; 10.1084/jem.178.5.1733.
29. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007;40(2):251-64; 10.1016/j.bone.2006.09.023.
30. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, i sur. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 2002;3(6):889-901; 10.1016/s1534-5807(02)00369-6.
31. Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, i sur. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J Exp Med*. 2005;202(9):1261-9; 10.1084/jem.20051150.
32. Miyamoto T. The dendritic cell-specific transmembrane protein DC-STAMP is essential for osteoclast fusion and osteoclast bone-resorbing activity. *Mod Rheumatol*. 2006;16(6):341-2; 10.1007/s10165-006-0524-0.
33. Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008;41(3):218-23; 10.1080/08916930701694667.
34. Nemeth K, Schoppet M, Al-Fakhri N, Helas S, Jessberger R, Hofbauer LC, i sur. The role of osteoclast-associated receptor in osteoimmunology. *J Immunol*. 2011;186(1):13-8; 10.4049/jimmunol.1002483.
35. Pang M, Rodríguez-Gonzalez M, Hernandez M, Recinos CC, Seldeen KL, Troen BR. AP-1 and MITF interact with NFATc1 to stimulate cathepsin K promoter activity in osteoclast precursors. *J Cell Biochem*. 2019;120(8):12382-92; 10.1002/jcb.28504.
36. Zhao B, Ivashkiv LB. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(4):234; 10.1186/ar3379.

37. Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, i sur. Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat Med.* 2009;15(9):1066-71; 10.1038/nm.2007.
38. Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, i sur. The BLIMP1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis. *J Exp Med.* 2010;207(4):751-62; 10.1084/jem.20091957.
39. Nishikawa K, Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kato S, Kodama T, i sur. BLIMP1-mediated repression of negative regulators is required for osteoclast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(7):3117-22; 10.1073/pnas.0912779107.
40. Tanaka S. RANKL-independent osteoclastogenesis: A long-standing controversy. *J Bone Miner Res.* 2017;32(3):431-3; 10.1002/jbmr.3092.
41. Kim JH, Jin HM, Kim K, Song I, Youn BU, Matsuo K, i sur. The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1. *J Immunol.* 2009;183(3):1862-70; 10.4049/jimmunol.0803007.
42. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol.* 2002;169(6):3353-62; 10.4049/jimmunol.169.6.3353.
43. Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappa B signaling pathways. *J Biol Chem.* 2008;283(17):11535-40; 10.1074/jbc.M607999200.
44. Adamopoulos IE, Bowman EP. Immune regulation of bone loss by Th17 cells. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):225; 10.1186/ar2502.
45. Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, i sur. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol.* 2003;170(5):2655-62; 10.4049/jimmunol.170.5.2655.
46. Hafström I, Ajeganova S, Forslind K, Svensson B. Anti-citrullinated protein antibodies are associated with osteopenia but not with pain at diagnosis of rheumatoid arthritis: Data from the barfot cohort. *Arthritis Res Ther.* 2019;21(1):45; 10.1186/s13075-019-1833-y.
47. Laurent L, Clavel C, Lemaire O, Anquetil F, Cornillet M, Zabraniecki L, i sur. Fcγ receptor profile of monocytes and macrophages from rheumatoid arthritis patients and their response to immune complexes formed with autoantibodies to citrullinated proteins. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(6):1052-9; 10.1136/ard.2010.142091.

48. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, i sur. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Endocrinology*. 2000;141(11):3956-64; 10.1210/endo.141.11.7739.
49. Yahara Y, Nguyen T, Ishikawa K, Kamei K, Alman BA. The origins and roles of osteoclasts in bone development, homeostasis and repair. *Development*. 2022;149(8); 10.1242/dev.199908.
50. Jacome-Galarza CE, Percin GI, Muller JT, Mass E, Lazarov T, Eitler J, i sur. Developmental origin, functional maintenance and genetic rescue of osteoclasts. *Nature*. 2019;568(7753):541-5; 10.1038/s41586-019-1105-7.
51. Yahara Y, Barrientos T, Tang YJ, Puviindran V, Nadesan P, Zhang H, i sur. Erythromyeloid progenitors give rise to a population of osteoclasts that contribute to bone homeostasis and repair. *Nat Cell Biol*. 2020;22(1):49-59; 10.1038/s41556-019-0437-8.
52. Jacome-Galarza CE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Identification, characterization, and isolation of a common progenitor for osteoclasts, macrophages, and dendritic cells from murine bone marrow and periphery. *J Bone Miner Res*. 2013;28(5):1203-13; 10.1002/jbmr.1822.
53. Flegar D, Filipović M, Šućur A, Markotić A, Lukač N, Šisl D, i sur. Preventive CCL2/CCR2 axis blockade suppresses osteoclast activity in a mouse model of rheumatoid arthritis by reducing homing of CCR2hi osteoclast progenitors to the affected bone. *Frontiers in Immunology*. 2021;12; 10.3389/fimmu.2021.767231.
54. Sućur A, Katavić V, Kelava T, Jajić Z, Kovačić N, Grčević D. Induction of osteoclast progenitors in inflammatory conditions: Key to bone destruction in arthritis. *Int Orthop*. 2014;38(9):1893-903; 10.1007/s00264-014-2386-y.
55. Jacquin C, Gran DE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Identification of multiple osteoclast precursor populations in murine bone marrow. *J Bone Miner Res*. 2006;21(1):67-77; 10.1359/jbmr.051007.
56. Jacome-Galarza CE, Lee S-K, Lorenzo JA, Aguila HL. Parathyroid hormone regulates the distribution and osteoclastogenic potential of hematopoietic progenitors in the bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2011;26(6):1207-16; <https://doi.org/10.1002/jbmr.324>.
57. Xiao Y, Song JY, de Vries TJ, Fatmawati C, Parreira DB, Langenbach GE, i sur. Osteoclast precursors in murine bone marrow express CD27 and are impeded in osteoclast development by CD70 on activated immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(30):12385-90; 10.1073/pnas.1216082110.

58. Xiao Y, Zijl S, Wang L, de Groot DC, van Tol MJ, Lankester AC, i sur. Identification of the common origins of osteoclasts, macrophages, and dendritic cells in human hematopoiesis. *Stem Cell Reports*. 2015;4(6):984-94; 10.1016/j.stemcr.2015.04.012.
59. Koeniger T, Bell L, Mifka A, Enders M, Hautmann V, Mekala SR, i sur. Bone marrow-derived myeloid progenitors in the leptomeninges of adult mice. *Stem Cells*. 2020;39(2):227-39; 10.1002/stem.3311.
60. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, i sur. Origin of osteoclasts: Mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(18):7260-4; 10.1073/pnas.87.18.7260.
61. McDonald MM, Khoo WH, Ng PY, Xiao Y, Zamerli J, Thatcher P, i sur. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption. *Cell*. 2021;184(5):1330-47.e13; 10.1016/j.cell.2021.02.002.
62. Madel MB, Ibáñez L, Wakkach A, de Vries TJ, Teti A, Apparailly F, i sur. Immune function and diversity of osteoclasts in normal and pathological conditions. *Front Immunol*. 2019;10:1408; 10.3389/fimmu.2019.01408.
63. Novak S, Roeder E, Kalinowski J, Jastrzebski S, Aguila HL, Lee SK, i sur. Osteoclasts derive predominantly from bone marrow-resident CX(3)CR1(+) precursor cells in homeostasis, whereas circulating CX(3)CR1(+) cells contribute to osteoclast development during fracture repair. *J Immunol*. 2020;204(4):868-78; 10.4049/jimmunol.1900665.
64. Ibáñez L, Abou-Ezzi G, Ciucci T, Amiot V, Belaïd N, Obino D, i sur. Inflammatory osteoclasts prime TNF $\alpha$ -producing CD4<sup>+</sup> t cells and express CX3CR1. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2016;31(10):1899-908; <https://doi.org/10.1002/jbmr.2868>.
65. Morgan TH. The theory of the gene. *The American Naturalist*. 1917;51(609):513-44; 10.1086/279629.
66. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: Unfolding the activation mechanism. *Cell*. 2009;137(2):216-33; 10.1016/j.cell.2009.03.045.
67. Siebel C, Lendahl U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiol Rev*. 2017;97(4):1235-94; 10.1152/physrev.00005.2017.
68. Zhou B, Lin W, Long Y, Yang Y, Zhang H, Wu K, i sur. Notch signaling pathway: Architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):95; 10.1038/s41392-022-00934-y.



69. Šućur A, Filipović M, Flegar D, Kelava T, Šisl D, Lukač N, i sur. Notch receptors and ligands in inflammatory arthritis - a systematic review. *Immunol Lett.* 2020;223:106-14; 10.1016/j.imlet.2020.04.010.
70. Pillidge Z, Bray SJ. Swi/snf chromatin remodeling controls Notch-responsive enhancer accessibility. *EMBO Rep.* 2019;20(5); 10.15252/embr.201846944.
71. Zanotti S, Canalis E. Notch and the skeleton. *Mol Cell Biol.* 2010;30(4):886-96; 10.1128/mcb.01285-09.
72. Luo Z, Shang X, Zhang H, Wang G, Massey PA, Barton SR, i sur. Notch signaling in osteogenesis, osteoclastogenesis, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 2019;189(8):1495-500; 10.1016/j.ajpath.2019.05.005.
73. Stier S, Cheng T, Dombkowski D, Carlesso N, Scadden DT. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood.* 2002;99(7):2369-78; 10.1182/blood.v99.7.2369.
74. Kim YW, Koo BK, Jeong HW, Yoon MJ, Song R, Shin J, i sur. Defective Notch activation in microenvironment leads to myeloproliferative disease. *Blood.* 2008;112(12):4628-38; 10.1182/blood-2008-03-148999.
75. Tanigaki K, Han H, Yamamoto N, Tashiro K, Ikegawa M, Kuroda K, i sur. Notch-Rbp-j signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol.* 2002;3(5):443-50; 10.1038/ni793.
76. Koch U, Fiorini E, Benedito R, Besseyrias V, Schuster-Gossler K, Pierres M, i sur. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med.* 2008;205(11):2515-23; 10.1084/jem.20080829.
77. Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):427-37; 10.1038/nri3445.
78. Vanderbeck A, Maillard I. Notch signaling at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of Leukocyte Biology.* 2021;109(3):535-48; <https://doi.org/10.1002/JLB.1RI0520-138R>.
79. Keewan E, Naser SA. The role of Notch signaling in macrophages during inflammation and infection: Implication in rheumatoid arthritis? *Cells.* 2020;9(1); 10.3390/cells9010111.
80. Palaga T, Buranaruk C, Rengpipat S, Fauq AH, Golde TE, Kaufmann SH, i sur. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur J Immunol.* 2008;38(1):174-83; 10.1002/eji.200636999.

81. Foldi J, Shang Y, Zhao B, Ivashkiv LB, Hu X. Rbp-j is required for M2 macrophage polarization in response to chitin and mediates expression of a subset of M2 genes. *Protein Cell*. 2016;7(3):201-9; 10.1007/s13238-016-0248-7.
82. Cheng P, Gabrilovich D. Notch signaling in differentiation and function of dendritic cells. *Immunol Res*. 2008;41(1):1-14; 10.1007/s12026-007-8011-z.
83. Wang L, Yu S, Chan ER, Chen KY, Liu C, Che D, i sur. Notch-regulated dendritic cells restrain inflammation-associated colorectal carcinogenesis. *Cancer Immunol Res*. 2021;9(3):348-61; 10.1158/2326-6066.Cir-20-0428.
84. Kirkling ME, Cytlak U, Lau CM, Lewis KL, Resteu A, Khodadadi-Jamayran A, i sur. Notch signaling facilitates in vitro generation of cross-presenting classical dendritic cells. *Cell Rep*. 2018;23(12):3658-72.e6; 10.1016/j.celrep.2018.05.068.
85. Yamada T, Yamazaki H, Yamane T, Yoshino M, Okuyama H, Tsuneto M, i sur. Regulation of osteoclast development by Notch signaling directed to osteoclast precursors and through stromal cells. *Blood*. 2003;101(6):2227-34; 10.1182/blood-2002-06-1740.
86. Bai S, Kopan R, Zou W, Hilton MJ, Ong CT, Long F, i sur. Notch1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells. *J Biol Chem*. 2008;283(10):6509-18; 10.1074/jbc.M707000200.
87. Sekine C, Koyanagi A, Koyama N, Hozumi K, Chiba S, Yagita H. Differential regulation of osteoclastogenesis by Notch2/Delta-like 1 and Notch1/Jagged1 axes. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(2):R45; 10.1186/ar3758.
88. Ashley JW, Ahn J, Hankenson KD. Notch signaling promotes osteoclast maturation and resorptive activity. *J Cell Biochem*. 2015;116(11):2598-609; 10.1002/jcb.25205.
89. Zhao B, Grimes SN, Li S, Hu X, Ivashkiv LB. TNF-induced osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption are inhibited by transcription factor Rbp-j. *J Exp Med*. 2012;209(2):319-34; 10.1084/jem.20111566.
90. Fukushima H, Nakao A, Okamoto F, Shin M, Kajiya H, Sakano S, i sur. The association of Notch2 and NF-kappa B accelerates RANKL-induced osteoclastogenesis. *Mol Cell Biol*. 2008;28(20):6402-12; 10.1128/mcb.00299-08.
91. Canalis E, Sanjay A, Yu J, Zanolini S. An antibody to Notch2 reverses the osteopenic phenotype of Hajdu-Cheney mutant male mice. *Endocrinology*. 2017;158(4):730-42; 10.1210/en.2016-1787.
92. Goel PN, Moharrer Y, Hebb JH, Ego AJ, Kaur G, Hankenson KD, i sur. Suppression of Notch signaling in osteoclasts improves bone regeneration and healing. *J Orthop Res*. 2019;37(10):2089-103; 10.1002/jor.24384.

93. 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; 10.1016/s0092-8674(00)81989-3.
94. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris 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; 10.1002/j.1460-2075.1991.tb04978.x.
95. 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; 10.1038/nature02119.
96. Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, i sur. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med*. 1998;187(9):1463-75; 10.1084/jem.187.9.1463.
97. Caplazi P, Baca M, Barck K, Carano RA, DeVoss J, Lee WP, i sur. Mouse models of rheumatoid arthritis. *Vet Pathol*. 2015;52(5):819-26; 10.1177/0300985815588612.
98. Nandakumar KS, Holmdahl R. Collagen antibody induced arthritis. *Methods Mol Med*. 2007;136:215-23; 10.1007/978-1-59745-402-5\_16.
99. Monach P, Hattori K, Huang H, Hyatt E, Morse J, Nguyen L, i sur. The K/BxN mouse model of inflammatory arthritis: Theory and practice. *Methods Mol Med*. 2007;136:269-82; 10.1007/978-1-59745-402-5\_20.
100. Gauldie SD, McQueen DS, Clarke CJ, Chessell IP. A robust model of adjuvant-induced chronic unilateral arthritis in two mouse strains. *J Neurosci Methods*. 2004;139(2):281-91; 10.1016/j.jneumeth.2004.05.003.
101. Patten C, Bush K, Rioja I, Morgan R, Wooley P, Trill J, i sur. Characterization of pristane-induced arthritis, a murine model of chronic disease: Response to antirheumatic agents, expression of joint cytokines, and immunopathology. *Arthritis Rheum*. 2004;50(10):3334-45; 10.1002/art.20507.
102. Ikić Matijašević M, Flegar D, Kovačić N, Katavić V, Kelava T, Šućur A, i sur. Increased chemotaxis and activity of circulatory myeloid progenitor cells may contribute to enhanced osteoclastogenesis and bone loss in the C57BL/6 mouse model of collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2016;186(3):321-35; 10.1111/cei.12862.
103. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1269-75; 10.1038/nprot.2007.173.

104. Pan M, Kang I, Craft J, Yin Z. Resistance to development of collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is due to a defect in secondary, but not in primary, immune response. *J Clin Immunol.* 2004;24(5):481-91; 10.1023/b:Joci.0000040919.16739.44.
105. Kai H, Shibuya K, Wang Y, Kameta H, Kameyama T, Tahara-Hanaoka S, i sur. Critical role of M. Tuberculosis for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57BL/6 mice. *Immunology.* 2006;118(2):233-9; 10.1111/j.1365-2567.2006.02361.x.
106. Inglis JJ, Simelyte E, McCann FE, Criado G, Williams RO. Protocol for the induction of arthritis in C57BL/6 mice. *Nat Protoc.* 2008;3(4):612-8; 10.1038/nprot.2008.19.
107. Inglis JJ, Criado G, Medghalchi M, Andrews M, Sandison A, Feldmann M, i sur. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(5):R113; 10.1186/ar2319.
108. Navabpour S, Kwapis JL, Jarome TJ. A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020;108:732-48; 10.1016/j.neubiorev.2019.12.013.
109. Sauer B. Cre/lox: One more step in the taming of the genome. *Endocrine.* 2002;19(3):221-8; 10.1385/endo:19:3:221.
110. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage p1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol.* 1981;150(4):467-86; 10.1016/0022-2836(81)90375-2.
111. Dallas SL, Xie Y, Shiflett LA, Ueki Y. Mouse Cre models for the study of bone diseases. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(4):466-77; 10.1007/s11914-018-0455-7.
112. Couasnay G, Madel MB, Lim J, Lee B, Elefteriou F. Sites of Cre-recombinase activity in mouse lines targeting skeletal cells. *J Bone Miner Res.* 2021;36(9):1661-79; 10.1002/jbmr.4415.
113. Madel M-B, Ibáñez L, Ciucci T, Halper J, Rouleau M, Boutin A, i sur. Dissecting the phenotypic and functional heterogeneity of mouse inflammatory osteoclasts by the expression of CX3CR1. *eLife.* 2020;9:e54493; 10.7554/eLife.54493.
114. Filipović M FD, Šućur A, Šisl D, Kavazović I, Antica M et al. Inhibition of Notch signaling stimulates osteoclastogenesis from the common trilineage progenitor under inflammatory conditions. *Front Immunol.* 2022.13:902947. doi: 10.3389/fimmu.2022.902947
115. Perilli E, Cantley M, Marino V, Crotti TN, Smith MD, Haynes DR, i sur. Quantifying not only bone loss, but also soft tissue swelling, in a murine inflammatory arthritis model using micro-computed tomography. *Scand J Immunol.* 2015;81(2):142-50; 10.1111/sji.12259.

116. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468-86; 10.1002/jbmr.141.
117. McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kamensky L, Cimini BA, Karhohs KW, i sur. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLOS Biology.* 2018;16(7):e2005970; 10.1371/journal.pbio.2005970.
118. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, i sur. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-82; 10.1038/nmeth.2019.
119. Nefedova Y, Sullivan DM, Bolick SC, Dalton WS, Gabrilovich DI. Inhibition of Notch signaling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy. *Blood.* 2008;111(4):2220-9; 10.1182/blood-2007-07-102632.
120. Zou W, Bar-Shavit Z. Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. *J Bone Miner Res.* 2002;17(7):1211-8; 10.1359/jbmr.2002.17.7.1211.
121. Zweidler-McKay PA, Lum JJ, Thompson CB, Pear WS. A critical role for the Bcl-2 pathway in Notch-mediated B cell apoptosis, where growth arrest is independent of the E2A, IL-3 and p21WAF1/p27KIP1 pathways. *Blood.* 2005;106(11):237-; 10.1182/blood.V106.11.237.237.
122. Konishi J, Yi F, Chen X, Vo H, Carbone DP, Dang TP. Notch3 cooperates with the EGFR pathway to modulate apoptosis through the induction of Bim. *Oncogene.* 2010;29(4):589-96; 10.1038/onc.2009.366.
123. Yoshino S, Sasatomi E, Ohsawa M. Bacterial lipopolysaccharide acts as an adjuvant to induce autoimmune arthritis in mice. *Immunology.* 2000;99(4):607-14; 10.1046/j.1365-2567.2000.00015.x.
124. Yoshino S, Ohsawa M. The role of lipopolysaccharide injected systemically in the reactivation of collagen-induced arthritis in mice. *Br J Pharmacol.* 2000;129(7):1309-14; 10.1038/sj.bjp.0703166.
125. Alivernini S, Firestein GS, McInnes IB. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity.* 2022;55(12):2255-70; 10.1016/j.immuni.2022.11.009.
126. Novak S, Roeder E, Sinder BP, Adams DJ, Siebel CW, Grcevic D, i sur. Modulation of Notch1 signaling regulates bone fracture healing. *J Orthop Res.* 2020;38(11):2350-61; 10.1002/jor.24650.

## 11. Životopis

Maša Filipović rođena je 09.10.1993. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i klasičnu gimnaziju. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2012. godine i diplomirala 2018. godine s odličnim uspjehom. Pripravnički staž odradila je na Klinici za dječje bolesti u Zagrebu te položila stručni ispit 2019. godine. Odmah nakon pripravničkog staža zaposlena je kao asistentica na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Notch signalni put u osteoklastnim progenitorima potaknutim reumatoidnim artritisom“ voditeljice prof. dr. sc. Danke Grčević na Zavodu za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu i iste godine upisala poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“. U dosadašnjem radu redovito je izlagala rezultate istraživanja na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima te je objavila devet međunarodno indeksiranih znanstvenih radova, od kojih je prvi autor na dva rada u časopisu prve kvartile (oba u *Frontiers in Immunology* IF=8,786). Za boravke na međunarodnim skupovima dodijeljene su joj dvije potpore *European Federation of Immunological Societies* (2022.), potpora *Bone Research Society* (2022.) te dvije Akademske mobilnosti Sveučilišta u Zagrebu (2020. i 2022.). Za usmenu prezentaciju na Godišnjem sastanku Hrvatskog imunološkog društva 2020. nagrađena je 2. nagradom u kategoriji *Bright Sparks Award*. Članica je Hrvatskog imunološkog društva i Hrvatskog društva fiziologa te *Bone Research Society*.