

# Mehanizmi nastanka koštanog fenotipa u generaliziranom limfoproliferativnom poremećaju u miša

---

Lukić, Ivan Krešimir

Doctoral thesis / Disertacija

2005

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:591607>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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





### **Središnja medicinska knjižnica**

Lukić, Ivan Krešimir (2005) *Mehanizmi nastanka koštanog fenotipa u generaliziranom limfoproliferativnom poremećaju u miša [ Mechanism of development of bone phenotype in murine generalised lymphoproliferative disorder ]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/182>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

Sveučilište u Zagrebu  
Medicinski fakultet

**Ivan Krešimir Lukić**

**Mehanizmi nastanka koštanog fenotipa u  
generaliziranom limfoproliferativnom  
poremećaju u miša**

Doktorska disertacija

Zagreb, 2005.

Pokuse u sklopu ovog istraživanja sam obavio pod vodstvom prof. dr. sci. Ane Marušić, dr. med., u Laboratoriju za molekularnu imunologiju (Zgrada temeljnih medicinskih znanosti, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu). Moj rad je omogućen sredstvima sljedećih znanstvenoistraživačkih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske: 0108148 (aM), 0108342 (dG) te 0108125 (vK); kao i projektom zaklade Wellcome Trust (Ujedinjeno Kraljevstvo) CRIGS 073828/Z/03/Z (aM). RANKL je bio ljubazan poklon tvrtke Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA, SAD).

Osjećam potrebu na ovom mjestu navesti imena ljudi bez čije pomoći ne bih mogao. Prije svega, to je moj učitelj, gospođa Ana Marušić. Osim gospođe Marušić, za vijeke su me zadužili (abecedno): gospodin Tibor Andreanszky, gospodin Peter Croucher, gospođa Žaklina Ćavar, gospođa Danka Grčević, gospodična Sanja Ivčević, gospodin Vedran Katavić, gospođa Nataša Kovačić, gospodična Evy de Leenheer, gospođa Ružica Nikšić-Mrzljak, gospodična Daniela Salopek, gospođa Katerina Zrinski-Petrović, gospodin Bojan Polić te gospođa Vladimira Vučenik. I, konačno, moram zahvaliti Aniti zbog svega čega se odrekla te na strpljenju kojim je zasjenila i Sfingu.



# SADRŽAJ

Popis uporabljenih kratica.....	1
1. Uvod .....	3
1.1. Koštano tkivo .....	3
1.1.1. Koštana međustanična tvar .....	3
1.1.2. Osteoblasti .....	4
1.1.3. Osteoklasti.....	7
1.2. Koštano preoblikovanje.....	8
1.3. Apoptoza.....	13
1.4. Sustav molekula ligand Fas – receptor Fas.....	17
1.4.1. Biološki učinci liganda Fas koji se temelje na apoptozi.....	18
1.4.2. Biološki učinci liganda Fas koji se ne temelje na apoptozi .....	21
1.4.3. Posljedice nedostatka liganda Fas i receptora Fas .....	22
1.4.4. Ligand Fas u koštanom sustavu .....	25
2. Cilj i svrha rada .....	27
3. Hipoteza.....	28
4. Postupci istraživanja .....	29
4.1. Pokusne životinje .....	29
4.2. Ustroj pokusa.....	29
4.3. Operacijski postupak .....	31
4.4. Protočnometrijska analiza .....	31
4.5. Analiza genskog izražaja .....	33
4.6. Analiza bjelančevinskog izražaja .....	36
4.7. Stanična kultura.....	38
4.8. Reakcija miješanih limfocita .....	39
4.9. Statistička analiza .....	40
5. Rezultati .....	41
5.1. Provjera aloreaktivnosti između mišjih sojeva.....	41
5.2. Učinak parabioze na imunofenotip.....	41
5.3. Učinak parabioze na osteoklastogenični potencijal koštane srži.....	53
5.4. Učinak parabioze na osteoblastogenični potencijal koštane srži.....	54
5.5. Učinak parabioze na izražaj gena za osteoprotegerin .....	60
5.6. Učinak parabioze na izražaj bjelančevine osteoprotegerin.....	62
6. Rasprava .....	66
6.1. Miševi divljeg tipa nisu aloreaktivni prema miševima soja <i>gld</i> .....	66
6.2. Parabioza dovodi do ublažavanja imunofenotipa miševa soja <i>gld</i> .....	66
6.3. Osteoblastogenični potencijal koštane srži miševa divljeg tipa se tijekom parabioze povećava, dok u miševa soja <i>gld</i> ostaje nepromijenjen ..	70
6.4. Osteoklastogenični potencijal koštane srži miševa divljeg tipa se tijekom parabioze smanjuje, dok u miševa soja <i>gld</i> ostaje nepromijenjen ..	72
6.5. Osteoprotegerin kao posrednik promjena u koštanoj srži.....	72
6.6. Ograničenja pokusnog modela i rezultata istraživanja.....	75
6.7. Završna razmišljanja i poopćenje rezultata .....	77
7. Zaključci .....	80
8. Sažetak .....	82
9. Summary.....	83
10. Literatura .....	84
11. Životopis .....	105

## POPIS UPORABLJENIH KRATICA

AICD	stanična smrt izazvana pobudom (prema engl. <i>activation induced cell death</i> )
ALP	alkalna fosfataza (prema engl. <i>alkaline phosphatase</i> )
ALPS	autoimunosni limfoproliferativni sindrom
APAF-1	čimbenik aktivacije apoptotske proteaze 1 (prema engl. <i>apoptotic protease-activating factor-1</i> )
APC	alofikocijanin (prema engl. <i>allophycocyanine</i> )
BMP	koštana oblikotvorna bjelančevina (prema engl. <i>bone morphogenetic protein</i> )
BSA	goveđi serumski albumin (prema engl. <i>bovine serum albumin</i> )
C <sub>t</sub>	prag broja ciklusa (prema engl. <i>cycle threshold</i> )
DISC	smrtonosni signalni sklop (prema engl. <i>death-inducing signaling complex</i> )
DR	smrtonosni receptor (prema engl. <i>death receptor</i> )
ELISA	imunoenzimski postupak (prema engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FADD	smrtonosna domena povezana s receptorom Fas (prema engl. <i>Fas-associated death domain</i> )
Fas	antigen stanične površine povezan s fibroblastima (prema engl. <i>fibroblast-associated cell surface</i> )
FCS	goveđi fetalni serum (prema engl. <i>fetal calf serum</i> )
FITC	fluorescein-izotijocijanat (prema engl. <i>fluorescein-isothiocyanate</i> )
gld	opći limfoproliferativni poremećaj (prema engl. <i>generalised lymphoproliferative disorder</i> )
IFN	interferon
Igf	čimbenik rasta sličan inzulinu (prema engl. <i>insulin like growth factor</i> )
IL	interleukin
lpr	limfoproliferacija
LRP5	bjelančevina „broj 5” povezana s receptorom za lipoproteine niske gustoće (prema engl. <i>low-density lipoprotein receptor-related protein 5</i> )
M-CSF	čimbenik poticanja makrofagnih kolonija (prema engl. <i>macrophage-colony stimulating factor</i> )
MHC	glavni sklop tkivne podudarnosti (prema engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
MIP	makrofagna upalna bjelančevina (prema engl. <i>macrophage inflammatory protein</i> )
NK	prirodni ubojca (prema engl. <i>natural killer</i> )
OCL	stanica nalik osteoklastu (prema engl. <i>osteoclast-like cell</i> )
OPG	osteoprotegerin
OSCAR	receptor povezan s osteoklastom (prema engl. <i>osteoclast associated receptor</i> )
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (prema engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PE	fikoeritrin (prema engl. <i>phycoerithrin</i> )

PerCP	bjelančevinski sklop peridinin-klorofil (prema engl. <i>peridinin-chlorophyll-protein complex</i> )
PIR-A	parni receptor „A” nalik na imunoglobulin (prema engl. <i>paired immunoglobulin-like receptor A</i> )
PTH	paratiroidni hormon
qPCR	kvantitativno umnožavanje lančanom reakcijom polimerazom (prema engl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
RANK	receptor za pobudu jezgrenog čimbenika $\kappa$ B (prema engl. <i>receptor activator of nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> )
RANKL	ligand receptora za pobudu jezgrenog čimbenika $\kappa$ B (prema engl. <i>receptor activator of nuclear factor <math>\kappa</math>B ligand</i> )
rh	rekombinantni ljudski (prema engl. <i>recombinant human</i> )
rm	rekombinantni mišji
Runx2	transkripcijski čimbenik povezan s bjelančevinom “ <i>runt</i> ” 2 (prema engl. <i>runt-related transcription factor 2</i> )
SD	standardna devijacija
SIRP $\beta$ 1	bjelančevina $\beta$ 1 koja nadzire signal (prema engl. <i>signal-regulatory protein <math>\beta</math>1</i> )
TNF	čimbenik tumorske nekroze (prema engl. <i>tumor necrosis factor</i> )
TRAIL	ligand povezan s TNF-om koji uzrokuje apoptozu (prema engl. <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> )
TRAP	kisela fosfataza otporna na tartarat (prema engl. <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i> )
TREM2	okidački receptor izražen na mijeloidnim stanicama „broj 2” (prema engl. <i>trigerring receptor expressed on myeloid cells 2</i> )
VEGI	zaprječavač rasta stanica žilnog endotela (prema engl. <i>vascular endothelial cell growth inhibitor</i> )

## **1. UVOD**

Iako kosti na prvi pogled ne izgledaju dinamično, koštano tkivo odraslog sisavca stalno se mijenja, pri čemu se “stara” kost uklanja i nadomješta novostvorenom kosti<sup>1</sup>. Takav usklađeni nestanak, pa nastanak kosti nazivamo koštanim preoblikovanjem. Preoblikovanje je složen niz tkivnih događaja koji uključuje djelovanje različitih stanica, a reguliraju ga raznovrsni biokemijski i biomehanički čimbenici. Prije nego što opišem zbivanja uključena u preoblikovanje, kratko ću se osvrnuti na građu koštanog tkiva.

### **1.1. Koštano tkivo**

Koštano tkivo ima dvije temeljne sastavnice: koštane stanice i međustaničnu koštanu tvar. Postoje dvije vrste koštanih stanica: osteoblasti i osteoklasti. Osteoblasti su stanice zadužene za stvaranje međustanične tvari, dok ju osteoklasti razgrađuju. U međustaničnoj tvari, pak, razlikujemo organski (bjelančevine) i anorganski dio (minerali).

#### **1.1.1. Koštana međustanična tvar**

Organski dio međustanične tvari najvećim dijelom čine bjelančevinska vlakna kolagena tipa I, dok je udio ostalih bjelančevina mnogo manji i ne prelazi 10%. Najveći dio anorganske faze (približno 90%) tvore kristali hidroksiapatita –  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , koji su uklopljeni u mrežu kolagenskih vlakana. Ostale koštane bjelančevine (proteoglikani, sijaloproteini i glikoproteini) reguliraju umrežavanje kolagenskih vlakana i kristala hidroksiapatita, a važni su i za povezivanje koštanih stanica s međustaničnom tvari<sup>2</sup>.

### 1.1.2. Osteoblasti

Glavne zadaće osteoblasta su stvaranje i odlaganje koštane međustanične tvari te regulacija djelovanja osteoklasta<sup>3,4</sup>. Morfološki, osteoblasti su kubične stanice okruglaste stanične jezgre, smještene na koštanoj površini u jednom sloju. Budući da im je glavna zadaća stvaranje bjelančevina međustanične tvari, osteoblasti imaju izražena GOLGIjeva tijela i hrapavu endoplazmatsku mrežicu<sup>5</sup>. Važna biokemijska odlika im je bogati izražaj enzima alkalne fosfataze (ALP; prema engl. *alkaline phosphatase*)<sup>4</sup>.

Osteoblasti su stanice mezenhinskog podrijetla<sup>6</sup>, a u kosti odraslog sisavca se razvijaju iz posebnih stanica strome koštane srži koje nazivamo mezenhimskim matičnim stanicama (engl. *mesenchymal stem cells*)<sup>7</sup>. Osim osteoblasta, iz mezenhimskih matičnih stanica mogu nastati i adipoblasti, hondroblasti, fibroblasti te potporne hematopoetske stanice, ali i mioblasti i neuroblasti<sup>8-11</sup>. Zanimljivi su rezultati Horowitzeve skupine<sup>12</sup> prema kojima granica između mezenhimske i krvotvorne matične stanice nije oštra te ih valja smatrati „sestrama”. Naime, i jedna i druga matična stanica su „kćeri” matične stanice koštane srži (engl. *marrow stem cell*).

Proliferaciju i diferencijaciju stanica osteoblastne loze nadziru i vode brojni transkripcijski čimbenici, čimbenici rasta i hormoni<sup>13</sup>. Prvi otkriveni i najbolje proučeni transkripcijski čimbenik specifičan za osteoblastnu lozu je *Runx2* (engl. *runt-related transcription factor 2*), starog naziva: *Cbfa-1* (engl. *core binding factor A-1*)<sup>3</sup>. Tijekom embrionalnog razvoja, izražaj gena *Runx2* prethodi diferencijaciji osteoblasta te je ograničen na mezenhimske stanice koje će postati hondroblasti ili osteoblasti<sup>14,15</sup>. Izražaj gena *Runx2* tijekom daljnjeg razvoja ostaje ograničen na osteoblaste, a smanjuje se u hipertrofičnim hondroцитima<sup>16</sup>. *Runx2* izražen je i u odontoblastima, koji su zubne inačice osteoblasta<sup>17</sup>. Osim što nadzire diferencijaciju stanica osteoblastne loze, *Runx2* je ključan i za djelovanje zrelih osteoblasta. Naime, vezna mjesta za *Runx2* pronađena su u većini gena uključenih u stvaranje koštane izvanstanične tvari<sup>14</sup>. Naposljetku, *Runx2* je nužan i za izražaj gena za osteokalcin<sup>5</sup>. Osteokalcin, poznat i kao koštana bjelančevina *Gla* (engl. *bone Gla protein*), je drugi gen izražaj kojeg je izražaj specifičan za osteoblaste<sup>18</sup>. Bjelančevina osteokalcin

pripada skupini bjelančevina koštane međustanične tvari, a zadaća joj je zaprječavanje mineralizacije i kočenje djelovanja samih osteoblasta<sup>19</sup>.

Iako članovi svih velikih obitelji čimbenika rasta utječu na diferencijaciju osteoblasta, posebno mjesto zauzimaju članovi obitelji koštanih oblikotvornih bjelančevina (BMP; prema engl. *bone morphogenetic protein*)<sup>13</sup> koji su i otkriveni prema svojoj sposobnosti stvaranja nove kosti na izvankoštanim mjestima<sup>20</sup>. Bjelančevine obitelji BMP usmjeravaju diferencijaciju mezenhimskih matičnih stanica prema osteoplastnoj lozi te su ključne za razvoj kostura tijekom embrionalnog razvoja. Od članova obitelji, koštanotvorno djelovanje imaju BMP-2, -4, -6 i -7<sup>21</sup>. Osim njih, u diferencijaciji osteoblasta, ali i hondroblasta, neizostavni su čimbenik rasta fibroblasta 18 (engl. *fibroblast growth factor 18*) te čimbenik rasta *Ihh* (engl. *indian hedgehog*)<sup>22</sup>.

Na diferencijaciju osteoblasta djeluju i mnogi hormoni, kako sustavni, tako i tkivni<sup>14</sup>, pri čemu se obično naglašava uloga paratiroidnog hormona (PTH) te njegovog tkivnoga homologa – peptida srodnog s PTH (engl. *parathyroid hormone-related peptide*)<sup>23</sup>. U posljednjih je nekoliko godina opisan još jedan čimbenik koji potiče diferencijaciju stanica osteoplastne loze – bjelančevina „broj 5” srodna s receptorom za lipoproteine niske gustoće (LRP5; prema engl. *low-density lipoprotein receptor-related protein 5*)<sup>24,25</sup>. Sukladno očekivanju, miševi s nefunkcionalnim genom za LRP5 imaju manje osteoblasta te osteopeniju<sup>26</sup>. Bjelančevina LRP5 djeluje kao koreceptor uključen u signaliziranje čimbenika rasta iz obitelji Wnt<sup>27</sup>. Klinička važnost bjelančevine LRP5 očituje se u opažanju da stanice multiplog mijeloma stvaraju topljivu molekulu *dickkopf1* (DKK1) koja vezivanjem na LRP5 djeluje kao inhibitor diferencijacije osteoblasta te tako sudjeluje u razvoju mijelomske koštane bolesti<sup>28</sup>.

Sudbina zrelog osteoblasta je trojaka: može postati obložna stanica ili osteocit, a može i odumrijeti apoptozom<sup>29</sup>. Obložne stanice (engl. *lining cells*) su izdužene plosnate stanice koje prekrivaju koštanu površinu koja trenutno nije u preoblikovanju. Njihova fiziološka uloga nije sasvim jasna i tradicionalno ih se smatra postmitotičkim stanicama<sup>4</sup>. No, prema rezultatima novijih istraživanja čini se da bi se ipak mogli pobuditi i prijeći u osteoblaste<sup>30-32</sup>. Osteociti su osteoblasti koji su ostali ukopani u koštanu međustaničnu tvar i zapravo su najbrojnija stanična populacija u samoj kosti<sup>29</sup>. Nakon što su jednom zarobljeni,

gube sposobnost odlaganja koštane međustanične tvari, no aktivnost im ne prestaje sasvim: mogu stvarati osteokalcin te prenositi minerale unutar koštanog tkiva<sup>33</sup>. Za osteocite su znakoviti brojni izduženi stanični nastavci koji leže u koštanim kanalićima. Preko tih nastavaka osteociti mogu komunicirati međusobno, ali i s osteoblastima i osteoklastima na koštanoj površini, te ih smatramo važnima za odgovor kosti na mehaničko opterećenje<sup>34</sup>. Zbog njihova izgleda te sposobnosti odgovora na mehaničke podražaje, nazvani su koštanim živčanim stanicama<sup>35</sup>.

Na kraju napominjem da osteoblasti nisu samo stanice odgovorne za stvaranje kosti, nego da imaju i neke druge uloge. Prije svega, osteoblasti potpomažu hematopoezu izgrađujući okoliš koji pogoduje krvotvornim matičnim stanicama. Za to je odgovorna posebna osteoblastna populacija, vretenaste stanice, koje izražavaju adhezijsku molekulu N-kadherin, te s pomoću molekula obitelji BMP reguliraju broj krvotvornih matičnih stanica<sup>36</sup>. Klinički je važno da se broj krvotvornih matičnih stanica u koštanoj srži može povećati *in vivo*, i to uporabom hormona PTH koji potiče osteoblaste, a preko njih i krvotvorne matične stanice<sup>37</sup>. Naposljetku, osteoblasti na svojoj površini izražavaju i molekulu angiopoietin-1 koja održava krvotvorne matične stanice u stanju mirovanja<sup>38</sup>. Imajući rečeno u vidu, ne čudi da uvjetovano odstranjivanje osteoblasta dovodi do dramatičnog osiromašenja staničnog sadržaja koštane srži<sup>39</sup>.

Osteoblasti bi, čini se, mogli biti uključeni i u imunosni odgovor. Nakon susreta s bakterijama osteoblasti izlučuju niz upalnih citokina, čimbenika poticanja kolonija i kemokina<sup>40-43</sup> koji zajedno mogu djelovati zaštitno, privlačeći makrofage, neutrofile i limfocite T<sup>44</sup>. Također je zanimljivo primijetiti da osteoblasti na staničnoj površini izražavaju molekulu B7-H3, tipičnu za predočne stanice, koje s pomoću nje mogu potisnuti djelovanje limfocita T<sup>45</sup>. Iako se zasad čini da je bjelančevina B7-H3 u kosti uključena samo u diferencijaciju osteoblasta, a ne u imunosni odgovor<sup>46</sup>, valja pričekati rezultate daljnjih istraživanja.

### 1.1.3. Osteoklasti

Osteoklasti su stanice s više jezgara, nastale spajanjem prethodničkih stanica koje pripadaju monocitno/makrofagnoj lozi<sup>47</sup>. Obično ih se smatra glavnim, ako ne i jednim stanicama koje mogu resorbirati kost, ali je nedavno pokazano da kost mogu razgraditi i neke stanice mezenhinskog podrijetla<sup>48</sup>. Također, rezultati novih istraživanja pokazuju da postoji tijesan odnos između razvoja osteoklasta i razvoja limfocita B te da te dvije stanične loze imaju zajedničkog, bipotentnog prethodnika<sup>49-52</sup>.

Morfološki su osteoklasti vrlo osebujne stanice. Prilično su veliki, ponekad i toliko da mogu biti vidljivi i golim okom te sadrže velik broj jezgara (čak do stotinu). Stanično tijelo je polarizirano te je stanična membrana uz stranu koja priliježe na kost obilno nabrana (engl. *ruffled border*). Priljublivanjem stanične membrane za kost stvara se dobro zatvoreno područje koje možemo smatrati „vanjskom vakuolom”<sup>53</sup>. Područje vanjske vakule zakiseljava se prijenosom vodikovih iona s pomoću prijenosnog sklopa ATP6i<sup>54</sup>. Sniženje pH pogoduje otapanju koštanih minerala<sup>55</sup>. Osim iona H<sup>+</sup> osteoklast izlučuje i enzime koji razgrađuju bjelančevine koštane međustanične tvari, glavni predstavnik kojih je katepsin K<sup>56</sup>, te enzime koji odvapnjaju kost, kao što je kisela fosfataza otporna na tartarat (TRAP; prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*). Iako enzim TRAP smatramo jednim od biljega zrelog osteoklasta<sup>57,58</sup>, izražavaju ga i neke druge stanice, poput makrofaga i stanica vlasaste leukemije<sup>59</sup>. Iznenađujuće, posljedica potpunog nedostatka enzima TRAP je samo blaga osteopetroza<sup>60</sup>. Pored navedenih enzima, osteoklast u područje vanjske vakuole izlučuje i razne lizosomske enzime te cisteinske proteaze<sup>33</sup>.

Diferencija osteoklasta odvija se na ili u neposrednoj blizini koštane površine, u bliskom dodiru prethodnika osteoklasta sa stanicama osteoblastne loze koje su izvor ključnih osteoklastnih čimbenika rasta. Zanimljivo je primijetiti da mononuklearne prethodničke stanice na koštanu površinu zapravo dolaze iz krvi<sup>33</sup>, a mogu se sresti i u slezeni<sup>61</sup> te u peritonealnoj šupljini<sup>62</sup>. Susljednim djelovanjem čimbenika poticanja makrofagnih kolonija (M-CSF; prema engl. *macrophage-colony stimulating factor*) te liganda receptora za pobudu jezgrenog čimbenika κB (RANKL; prema engl. *receptor activator of nuclear factor κB ligand*) dolazi do aktiviranja gena znakovitih za osteoklastnu lozu te

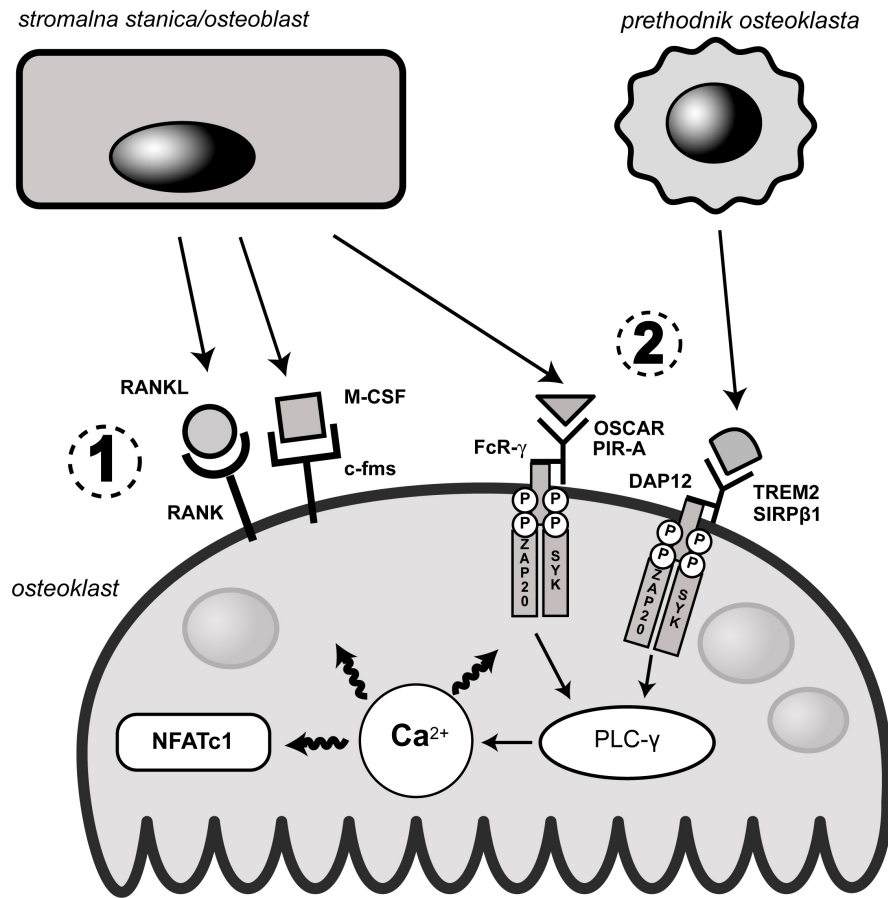


poprimanja fenotipa zrelog osteoklasta<sup>53</sup>. Osim molekula M-CSF i RANKL, za diferencijaciju osteoklasta nužno je priliaganje prethodničkih stanica na prikladnu površinu<sup>63</sup>.

Osteoklasti nisu samo svojim podrijetlom povezani s imunosnim sustavom<sup>64</sup>, nego imaju i veoma sličan način pobuđivanja, kao što je nedavno pokazano<sup>65</sup> (slika 1). Naime, limfociti T za svoje pobuđivanje trebaju dva signala: prvi su antigen i molekule glavnog sklopa tkivne podudarnosti (MHC; prema engl. *major histocompatibility complex*), a drugi su kostimulacijske molekule<sup>45</sup>. Prvi signal u osteoklasta je RANKL. Nakon što se RANKL veže za svoj receptor RANK (prema engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B*) u osteoklastu se aktivira nekoliko signalnih putova, od kojih neki završavaju na transkripcijskom čimbeniku NFATc1 (engl. *nuclear factor of activated T cells*) za čiju je aktivaciju, a time i diferencijaciju osteoklasta, potreban kalcij<sup>65</sup>. Koga je sa suradnicima pokazao<sup>66</sup> da je za povećanje koncentracije kalcija u osteoklastu potrebna aktivacija kostimulacijskih putova (tj. drugi signal) preko sljedećih molekula: receptor FcR $\gamma$  i njegovi koreceptori OSCAR (engl. *osteoclast associated receptor*) i PIR-A (engl. *paired immunoglobulin-like receptor A*); odnosno receptor DAP12 (engl. *DNAX-activation protein 12*) i njegovi koreceptori TREM2 (engl. *trigerring receptor expressed on myeloid cells 2*) i SIRP $\beta$ 1 (engl. *signal-regulatory protein  $\beta$ 1*). Ligandi koreceptora nisu poznati, ali se zna da stanice osteoblastne loze izlučuju ligande za OSCAR i PIR-A, dok prethodničke osteoklastne stanice izlučuju ligande za TREM2 i SIRP $\beta$ 1<sup>66,67</sup>.

## **1.2. Koštano preoblikovanje**

Kako bi moglo ispuniti svoje zadaće, koštano tkivo se neprestano preoblikuje i to na jedan do dva milijuna mjesta u kosturu prosječna odrasla čovjeka; drugim riječima, u svakom se trenutku preoblikuje oko jedna petina površine trabekularne kosti<sup>68</sup>. Pri tome osteoklastima treba približno tri tjedna da razgrade kost, dok će osteoblasti za izgradnju istog volumena kosti „potrošiti” približno četiri mjeseca<sup>69</sup>.



**Slika 1.** Pobuđivanje osteoklasta s pomoću dva signala. Prvi signal je RANKL (engl. *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand*), a izlučuju ga stanice osteoblastne stanične loze (zaokruženi broj „1“ na lijevoj strani slike). Da bi RANKL bio učinkovit nužne su permisivne koncentracije čimbenika M-CSF (engl. *macrophage-colony stimulating factor*), kojeg također izlučuju stanice osteoblastne loze. Drugi signal (zaokruženi broj „2“ na desnoj strani slike) osteoklastu dolazi preko sljedećih molekula: receptor FcR $\gamma$  i njegovi koreceptori OSCAR (engl. *osteoclast associated receptor*) i PIR-A (engl. *paired immunoglobulin-like receptor A*); odnosno receptor DAP12 (engl. *DNAX-activation protein 12*) i njegovi koreceptori TREM2 (engl. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) i SIRP $\beta$ 1 (engl. *signal-regulatory protein  $\beta$ 1*). Stanice osteoblastne loze izlučuju ligand za OSCAR i PIR-A, dok prethodničke osteoklastne stanice izlučuju ligand za TREM2 i SIRP $\beta$ 1. Aktivacija receptora FcR $\gamma$  i DAP12 preko unutarstaničnih prilagođavačkih molekula ZAP20 i syk dovode do aktivacije enzima fosfolipaza C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ). Nizom signalnih događaja povećava se unutarstanična koncentracija kalcija te dolazi do aktivacije transkripcijskog čimbenika NFATc1 (engl. *nuclear factor of activated T cells 1*). NFATc1 je odgovoran za aktivaciju niza gena ključnih za djelovanje zrelog osteoklasta. Kratice: c-fms, receptor za M-CSF; RANK, receptor za RANKL; P, fosfatne skupine.

Koštano preoblikovanje odvija se u mikroskopskim tvorbama sličnim tunelu, nazvanim „odjeljcima koštanog preoblikovanja” (engl. *bone remodelling compartment*)<sup>31</sup>. Na početku ciklusa preoblikovanja, obložne stanice, koje prekrivaju površinu metabolički neaktivne kosti, bivaju odvojene od same koštane površine te od osteocita s kojima su inače u dodiru. Ispod svoda kojeg oblikuju obložne stanice, osteoklasti najprije razgrađuju kost, a za njima slijede osteoblasti i stvaraju neovapnjelu koštanu međustaničnu tvar, osteoid, koji postupno ovapnjuje<sup>32</sup>.

Za održanje normalne mikroskopske koštane građe, odnosno koštanoga zdravlja, nužno je da razgradnja i stvaranje kosti tijekom preoblikovanja budu pomno usklađeni. Molekulska podloga te ravnoteže rasvijetljena je tijekom proteklih desetak godina<sup>70</sup>. Pokusi tijekom kojih su zajedno uzgajane stanice osteoblastne loze s krvotvornim stanicama pokazali su da diferencijacija osteoklasta nije moguća bez dodira osteoklastnih prethodničkih stanica sa stanicama osteoblastne loze: stromalnih stanica koštane srži ili osteoblasta<sup>71</sup>. Naime, stanice osteoblastne loze izražavaju M-CSF, koji se preko svog receptora *c-fms* vezuje na već usmjerene prethodnike osteoklasta te potiče njihovo preživljenje i umnažanje<sup>64,72</sup>. Sljedeći signal koji osiguravaju stanice osteoblastne loze jest RANKL. RANKL se vezuje na svoj receptor, RANK, koji se nalazi na površini preosteoklasta te potiče njegovu diferencijaciju i pobuđivanje<sup>73</sup>. Osim RANKL-a, stanice osteoblastne loze izlučuju i lažni, topljivi receptor za RANK – osteoprotegerin (OPG), koji je funkcionalni antagonist RANKL-a<sup>74</sup>. Možemo reći da broj i aktivnost osteoklasta u kosti ovisi upravo o omjeru lokalno dostupnog RANKL-a i OPG-a<sup>70</sup>. Konačno, pokazano je da brojni čimbenici koji potiču koštanu resorpciju, kao što su PTH, 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>, interleukin (IL)-1, IL-6, IL-11, onkostatin M i čimbenik zaprječavanja leukemije (LIF; prema engl. *leukaemia inhibitory factor*), ne djeluju na prethodničke stanice osteoklasta izravno, nego posredno, potičući stvaranje RANKL-a u stromalnim stanicama/osteoblastima<sup>75</sup>.

S druge strane, tijekom resorpcije kosti iz koštane se međustanične tvari oslobađa niz bjelančevina koje su u njoj „pohranjene”, a koje potiču djelovanje i diferencijaciju osteoblasta, kao što su BMP-2, -4 i -7, transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (engl. *transforming growth factor- $\beta$* ), te čimbenik rasta sličan inzulinu (Igf; prema engl. *insuline like growth factor*)-1 i Igf-2<sup>5,29,68,76-78</sup>. Lokalno

povećanje koncentracije kalcija oslobođenog demineralizacijom koštane međustanične tvari, koči djelovanje osteoklasta<sup>68,79</sup>. Štoviše, RANKL potiče stvaranje interferona (IFN)- $\beta$  u preosteoklastima, a koji onda koči signalne putove receptora RANK u osteoklastima<sup>80</sup>. Opisanim načinima se koštana razgradnja povezuje s koštanom izgradnjom u ciklus koštane pregradnje.

Unatoč neprijepornoj važnosti sustava RANKL/RANK/OPG za koštani metabolizam, postoje i drugi molekularni sustavi uključeni u regulaciju osteoklastogeneze. Prethodničke stanice osteoklasta izražavaju receptore iz skupine *Notch*, a aktivacija tih receptora zaprječuje osteoklastogenezu<sup>81</sup>. Stromalne stanice također izražavaju receptore skupine *Notch*, a vezivanjem njihovih liganda smanjuje se izražaj M-CSF-a na stromalnim stanicama, a time i njihova sposobnost podržavanja osteoklastogeneze<sup>81</sup>. Vezivanjem lipopolisaharida za osteoklastni receptor TLR4 (engl. *Toll-like receptor 4*) dolazi do pobuđivanja osteoklasta neovisno o RANKL-u<sup>13,82</sup>. Osim lipopolisaharida, i drugi lokalni čimbenici mogu „zaobići” sustav RANKL/RANK, tj. dovesti do diferencijacije ili pobuđivanja osteoklasta bez potrebe za aktivacijom receptora RANK. Najčešće se spominju citokini IL-1, IL-6, i čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF; prema engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* )<sup>83-88</sup>. Od kemokina su zanimljivi makrofagna upalna bjelančevina (MIP; prema engl. *macrophage inflammatory protein*)-1 $\alpha$  i MIP-1 $\gamma$ . Koliko za sada znamo, MIP-1 $\gamma$  je najvažniji kemokin uključen u koštanu resorpciju. Potiče preživljavanje i diferencijaciju osteoklasta, dijelom i autokrinim putem<sup>89,90</sup>. MIP-1 $\alpha$  također potiče osteoklastogenezu a budući ga izlučuju mijelomske stanice, važan je u nastanku mijelomske koštane bolesti<sup>91-93</sup>.

Naposlijetku, ističem i da je početna, jednostavna slika o sustavu RANKL/RANK/OPG kao temeljnom regulatoru koštane resorpcije postala složenijom. Iako je monomer OPG biološki aktivan, za punu aktivnost potrebna je njegova dimerizacija<sup>74</sup>. Slično, aktivacija receptora RANK je najjača kad se na njega veže trimerizirani RANKL<sup>94</sup>. Pokazalo se da i tri izoforme RANKL-a<sup>95</sup> nisu biološki potpuno jednake<sup>96</sup>. Izoforme RANKL1 (transmembranski oblik u punoj duljini) i RANKL2 (transmembranski oblik s kraćom unutarstaničnom domenom) odgovorne su za diferencijaciju i pobuđivanje osteoklasta dok izoforma RANKL3 (topljivi oblik) ima mnogo manju ulogu. Štoviše, multimerizacija izoforme RANKL3 s dimerom RANKL1/RANKL2 dovodi do

manjeg učinka na diferencijaciju osteoklasta od samog dimera RANKL<sub>1</sub>/RANKL<sub>2</sub><sup>70</sup>. Uz nedostatke količine M-CSF-a, ili nepotpunu aktivaciju unutarstaničnog signalnog puta kinaze PI3K (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*) RANKL može potaknuti i apoptozu osteoklasta<sup>97</sup>. Nadalje, OPG nije samo „lažni receptor” nego ima i vlastite učinke na osteoklaste. I, začuđujuće, pojačava izražaj proteolitičkih enzima u osteoklastima<sup>98</sup>. Ne samo to, nego OPG svoje učinke izražava dok je u kompleksu s RANKL-om i RANK-om<sup>86</sup>. Iako je glavni ligand OPG-a RANKL, OPG se može vezati i na ligand srodan s TNF-om, koji uzrokuje apoptozu (TRAIL; prema engl. *TNF-related apoptosis inducing ligand*)<sup>99</sup>. Drugim riječima, TRAIL vezujući OPG može poslužiti kao njegov svojevrsni „antagonist”<sup>75</sup>. OPG se može vezati i na neke proteoglikane stanične površine, poglavito sindekan-1. Nakon vezivanja OPG-a na sindekan, stanice internaliziraju i razgrađuju cijeli takav bjelančevinski sklop<sup>100</sup>. Konačno, RANKL se ne vezuje samo na OPG i RANK, nego ga mogu vezati i članovi skupine izlučenih bjelančevina srodnih s bjelančevinom *frizzled* (engl. *secreted frizzled-related proteins*) koji onda tako djeluju kao lažni receptori RANKL-a<sup>101</sup>. Količina kosti koja će biti stvorena ili razgrađena u pojedinom ciklusu koštanog preoblikovanja ovisi ne samo o djelovanju koštanih stanica, nego i o njihovom broju. Broj koštanih stanica je odraz nastajanja zrelih stanica te apoptotskog odumiranja stanica: na kraju svog „životnog” puta, dvije trećine osteoblasta i svi osteoklasti podliježu apoptotskoj smrti<sup>53,102,103</sup>.

Važnost detaljnog reguliranja apoptoze u koštanom sustavu može se dobro oslikati na primjeru postmenopauzalne osteoporoze, u kojoj je bitan patofiziološki činitelj upravo poremećaj apoptoze koštanih stanica<sup>104,105</sup>. Gubitkom estrogena nestaje i njegov pro-apoptotički učinak na osteoklaste<sup>53</sup>. Na taj način se životni vijek osteoklasta produžava te se njihov broj povećava dva do tri puta<sup>29</sup> pa se posljedično povećava i njihov učinak<sup>106</sup>. S druge strane, raste učestalost apoptoze osteoblasta i osteocita<sup>107-109</sup>. Upravo zbog važnog mjesta apoptoze u koštanom zdravlju, valja dobro razumjeti mehanizme koji ju nadziru.

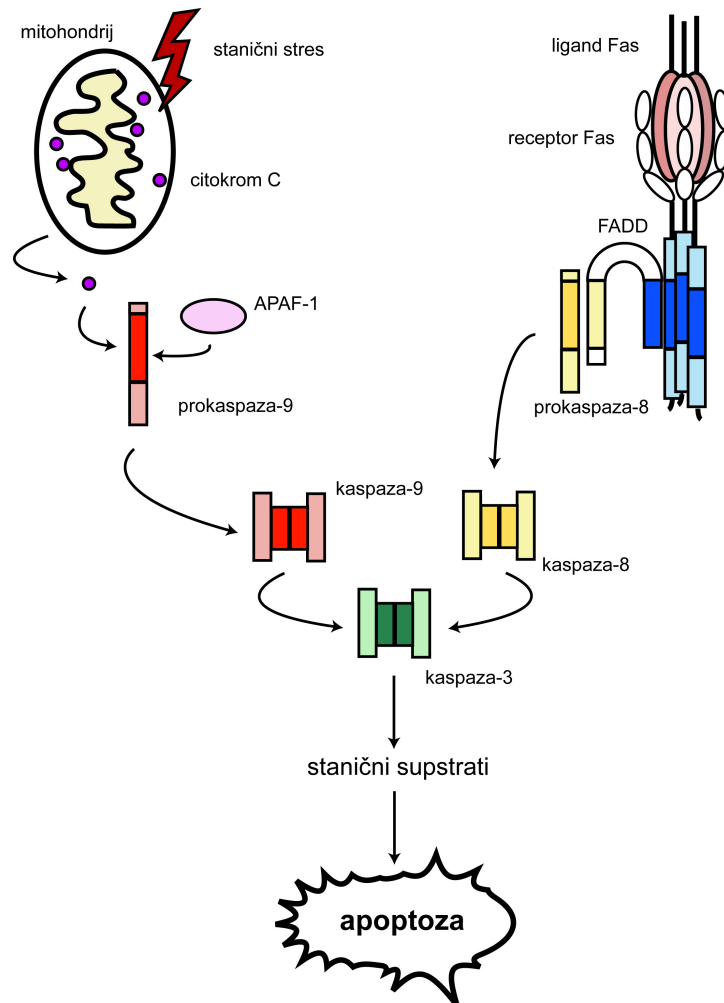
### 1.3. Apoptoza

Apoptoza je naziv za ciljanu i „programiranu” staničnu smrt, odnosno jedan od pet načina kojima stanica može odumrijeti<sup>110,111</sup>. Sama riječ je starogrčka kovanica kojom se opisuje otpadanje latica s cvijeta ili lišća s grana, a odnosi se na nestajanje pojedinačnih stanica iz okolnoga, zdravog tkiva<sup>105</sup>. Svrha apoptoze je odstranjenje „neželjenih” stanica, a koristi se u tri slučaja: 1) u razvoju i homeostazi, 2) kao obrambeni mehanizam te 3) u starenju<sup>112</sup>. Glavna morfološka i biokemijska obilježja apoptoze jesu odvajanje dijelova stanične membrane, zgušnjavanje kromatina te aktivacija niza endonukleolitičnih procesa, koji dovode do cijepanja kromosomske DNA na odsječke približne duljine 200 baznih parova<sup>113,114</sup>. Bitno je napomenuti da je apoptoza aktivni oblik stanične smrti, što otvara mogućnost farmakološkoga djelovanja.

Molekularna podloga apoptotske stanične smrti je aktivacija niza proteolitičkih enzima, kaspaza. Biokemijski su to cisteinske proteaze sa specifičnošću za aspartatske aminokiselinske ostatke, a trenutno ih je u sisavaca opisano četrnaest<sup>115,116</sup>. Prema ulozi, razlikujemo tri skupine kaspaza: početne (engl. *initiator caspase*), izvršne (engl. *executioner caspase*) te regulacijske, koje nisu izravno uključene u apoptozu. Početne kaspaze (kaspaza-2, -8, -9, -10) imaju zadaću pocijepati i tako aktivirati izvršne kaspaze. U stanicama se nalaze u monomolekularnom obliku, a aktivirati se ne mogu enzimskim cijepanjem već dimerizacijom<sup>117</sup>. Izvršne kaspaze (kaspaza-3, -6, -7) se u stanici nalaze u pro-obliku, kao neaktivni dimeri i „čekaju” aktivaciju nakon čega cijepaju mnoge ključne stanične bjelančevine, poput citoskeletnih bjelančevina (e.g. aktin) ili lamina (bjelančevine koje grade mrežu s unutarne strane jezgrine ovojnice), te DNaza potaknutih kaspazama (engl. *caspase-activated DNase*)<sup>118</sup>. Regulacijske kaspaze (primjerice, kaspaza-1) sudjeluju u obradi citokina prije njihova izlučivanja te tako reguliraju imunski odgovor. I ostale kaspaze mogu imati regulacijsku ulogu, poput kaspaze-8, koja je važna u prijenosu signala od antigenskog receptora<sup>119</sup>.

Prema mehanizmu kojim dolazi do aktivacije početnih kaspaza, razlikujemo dva načina otpočinjanja apoptotske stanične smrti: unutarnji i vanjski<sup>120</sup> (slika 2). Unutarnji ili mitohondrijski put započinje otpuštanjem pro-apoptičnih čimbenika iz mitohondrija, dok vanjski put počinje vezivanjem liganada na

skupinu receptora nazvanih „smrtonosni receptori” (engl. *death receptors*). Valja dometnuti kako postoje pokusi koji ukazuju na to da bi do aktivacije kaspaza moglo doći i na načine koji ne uključuju ni smrtonosne receptore niti mitohondrije, ali se o tim apoptotskim putovima još uvijek malo zna. Primjerice, kaspaze mogu biti potaknute nakupinama bjelančevina koje su bogate glutamatom<sup>121</sup> ili pak oštećenjima endoplazmatske mrežice<sup>122,123</sup>.



**Slika 2.** Shematski prikaz vanjskog i unutarnjeg apoptotičkog puta. Unutarnji apoptotički put započinje staničnim stresom koji dovodi do gubitka cjelovitosti mitohondrijske membrane te otpuštanja citokroma c u citoplazmu. Citokrom c i Apaf-1 (engl. *apoptotic protease-activating factor 1*) potom dovode do prelaska prokaspaze 9 u aktivnu kaspazu 9. Kaspaza 9, pak, aktivira kaspazu 3. Vanjski put započinje aktivacijom jednog od smrtonosnih receptora (ovdje: receptor Fas). S pomoću prilagođavačke molekule FADD (engl. *Fas-associated death domain*), prokaspaza 8 biva povezana uz receptor Fas, što dovodi do aktivacije kaspaze 8. Kaspaza 8 također aktivira kaspazu 3, koja nakon toga može početi cijepati ciljne bjelančevine ili pak aktivirati druge enzime. Pokrenuti slijed događaja završava apoptotskom smrću stanice.

Početni korak unutarnjeg apoptotskog puta je permeabilizacija vanjske mitohondrijske membrane, što omogućava izlazak nekoliko pro-apoptotičkih čimbenika u citoplazmu, uključujući holocitokrom c, čimbenik izazivanja apoptoze (engl. *apoptosis inducing factor*), te čimbenike EndoG i Omi/HtrA2<sup>115</sup>. Dok holocitokrom c aktivira kaspaze<sup>124</sup>, ostali navedeni čimbenici dovode do stanične smrti neovisno o kaspazama<sup>125</sup>. Obzirom da je put holocitokroma c najbolje istražen, kratko ću ga opisati.

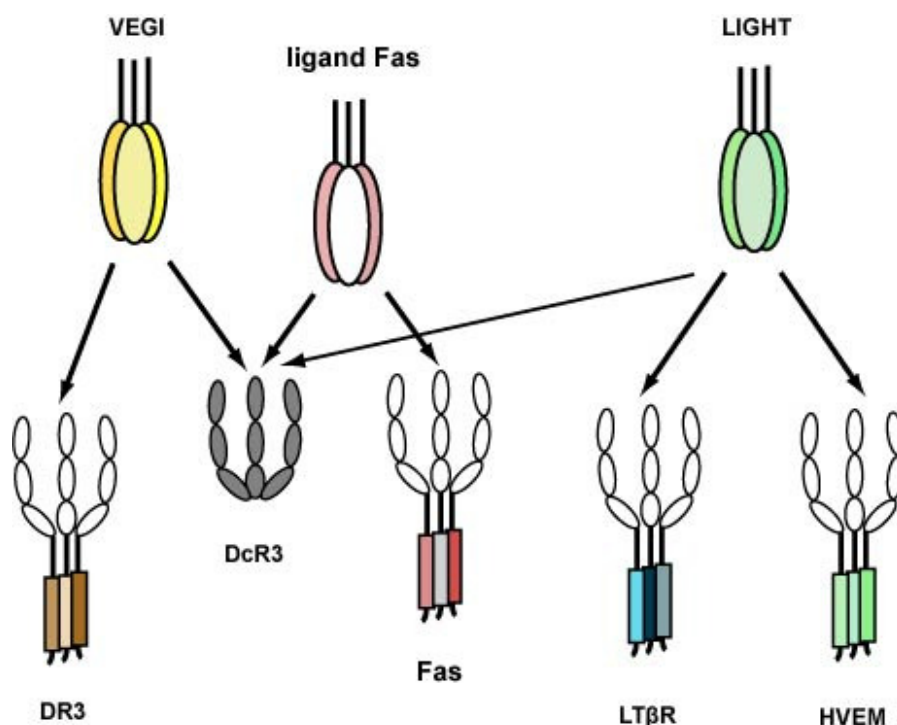
Izašavši iz mitohondrija u citoplazmu, holocitokrom c se vezuje na čimbenik aktivacije apoptotske proteaze 1 (APAF-1; engl. *apoptotic protease-activating factor-1*)<sup>126</sup>. APAF-1, koji u stanici postoji kao monomer, potom se multimerizira stvarajući tzv. apoptosom. Na apoptosom se tada može vezati kaspaza-9, koja se tijekom vezivanja ujedno i aktivira te počinje cijepati izvršne kaspaze<sup>127</sup>. Kako točno, međutim, dolazi do gubitka cjelovitosti mitohondrijske membrane nije sasvim jasno<sup>120,128</sup>. Dapače, novija razmišljanja ukazuju na to da su kaspaze aktivirane već „uzvodno” od mitohondrija te da cijeli mitohondrijski put služi „samo” pojačanju smrtonosnog signala<sup>118</sup>.

Vanjski apoptotski put započinje aktivacijom jednog od smrtonosnih receptora. Smrtonosni receptori su članovi obitelji receptora TNF, a trenutno ih je opisano šest: molekula stanične površine povezana s fibroblastima (Fas; prema engl. *fibroblast-associated cell surface*), receptor za TNF- $\alpha$  1 (TNFR1), smrtonosni receptor 3 (DR3; prema engl. *death receptor 3*), DR4, DR5 i DR6<sup>129</sup>. Ligandi tih receptora su članovi obitelji TNF, i to: ligand Fas (veže se na Fas), TNF- $\alpha$  (veže se na TNFR1), limfotoksin- $\alpha$  (veže se na TNFR1), TRAIL (veže se na DR4 i DR5), slabi izazivač apoptoze nalik na TNF- $\alpha$  (TWEAK; engl. *TNF-like weak inducer of apoptosis*) (veže se na DR3), LIGHT (engl. *homologous to lymphotoxin, inducible expression, competes with herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D for HSV entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes*) (veže se na DR3), zaprječavač rasta stanica žilnog endotela (VEGI; prema engl. *vascular endothelial cell growth inhibitor*) (veže se na DR3), dok ligand receptora DR6 još uvijek nije poznat<sup>130,131</sup> (slika 3).

Zajedničko obilježje smrtonosnih receptora je postojanje posebne, smrtonosne domene (prema engl. *death domain*) u njihovom unutarstaničnom dijelu<sup>132</sup>. Vezivanje liganda za receptor dovodi do trimerizacije receptora i “nagomilavanja” njihovih smrtonosnih domena na koje se tada vezuju



prilagođavačke molekule (engl. *adapter molecule*). Na takve prilagođavačke molekule se potom, izravno ili neizravno (s pomoću dodatnih prilagođavačkih molekula), vezuju početne kaspaze. Pri tome cijeli molekularni sklop više ne mora biti usidren u staničnu membranu, već se od nje može i odvojiti te krenuti u citoplazmu<sup>133,134</sup>. Početne kaspaze aktiviraju same sebe dimerizacijom koja omogućava stvaranje aktivnog enzimskog mjesta i cijepanje izvršnih kaspaza<sup>135</sup>. Kako je za moj rad bio važan apoptotski put ligand Fas – receptor Fas, o njemu ću reći nešto više.



**Slika 3.** Sustav ligand Fas – receptor Fas i s njima povezani ligandi i receptori iz obitelji čimbenika tumorske nekroze- $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* ). Ligand Fas (engl. *fibroblast-associated cell surface*) vezuje se na svoj receptor, Fas, ali i na lažni receptor DcR3 (engl. *decoy receptor 3*). Osim liganda Fas, DcR3 se veže i na VEGI (engl. *vascular endothelial cell growth inhibitor*) te LIGHT (engl. *homologous to lymphotoxin, inducible expression, competes with herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D for HSV entry mediator, a receptor expressed on T lymphocytes*). “Pravi” receptor za VEGI je DR3 (engl. *death receptor 3*), dok se LIGHT veže na dva receptora, i to HVEM (engl. *herpes virus entry mediator*) i LT $\beta$ R (limfotoksin- $\beta$  receptor). Na shemi nisu prikazani limfotoksin- $\alpha$ , koji se veže na HVEM te na receptore čimbenika tumorske nekroze (TNF; prema engl. *tumor necrosis factor*), TNFR1 i TNFR2; limfotoksin- $\beta$  koji se veže na LT $\beta$ R; te BTLA (engl. *B- and T-lymphocyte attenuator*) koji se veže na HVEM. Izvanstanične bjelančevinske domene prikazane su kao elipse, a unutarstanične domene kao pravokutnici.

#### 1.4. Sustav molekula ligand Fas – receptor Fas

Ligand Fas (CD 178, CD95L, APO1L) je transmembranska bjelančevina tipa II, molekulske mase 45 kDa, građena od 281 aminokiseline, član obitelji TNF<sup>132,136</sup>. Izvorno je opisan na stanicama mijeloidne/limfoidne loze, osobito na pobuđenim limfocitima T i prirodno ubilačkim stanicama (stanice NK; prema engl. *natural killer*)<sup>137</sup>. Osim toga, ligand Fas je izražen na cijelom nizu tkiva<sup>138</sup> te, što je zanimljivo, na nekim tumorima<sup>139-141</sup> i na imunosno odijeljenim mjestima poput oka i sjemenika<sup>142,143</sup>.

Ligand Fas ostvaruje učinke vezivanjem na svoj receptor, molekulu Fas (CD95, APO1)<sup>144</sup>, koja je član obitelji receptora TNF<sup>129</sup>. Fas je transmembranska bjelančevina tipa I, molekulske mase 48 kDa, koju izgrađuje 335 aminokiselina<sup>145</sup>. Izražavaju ju brojna zdrava<sup>138,146</sup>, ali i tumorska tkiva<sup>147</sup>. U svom izvanstaničnom dijelu molekula Fas ima tri domene bogate cisteinom<sup>145</sup>, što je zajedničko obilježje svih receptora iz obitelji TNF<sup>148</sup>. U stanici se nalazi smrtonosna domena, neizostavna za biološku ulogu receptora Fas<sup>149</sup>.

Ligand Fas s pomoću svoje izvanstanične domene oblikuje trimer na staničnoj površini<sup>150,151</sup>. Iako ligand Fas postoji i u topljivom obliku<sup>152</sup>, biološka aktivnost topljivog oblika je nekoliko puta manja od membranskoga<sup>152-154</sup>. Čak bismo mogli reći da je topljiv ligand Fas svojevrsni „antagonist” staničnog oblika budući da zapravo zauzima vezna mjesta na receptoru Fas, onemogućujući tako vezivanje aktivnog, membranskog oblika<sup>155</sup>.

Receptor Fas se na staničnoj površini može naći u obliku monomera, ali kao takav ne pokreće slijed događaja stanične smrti<sup>156,157</sup>. K tome, opisana je i inačica receptora Fas koja služi kao lažni receptor (engl. *decoy receptor*)<sup>158</sup>. Prvi korak u aktivaciji signalnog puta ligand Fas – Fas jest trimerizacija receptora Fas, koja se odvija neovisno o ligandu<sup>159,160</sup>, a u područjima lipidnih splavi stanične membrane (engl. *lipid rafts*)<sup>133,161</sup>. Nakon vezivanja liganda Fas dolazi do oligomerizacije trimeričkih sklopova ligand Fas – Fas<sup>162</sup>. Približavanjem unutarstaničnih dijelova receptora Fas, omogućen je početak prijenosa apoptotskog signala. Na smrtonosnu domenu molekule Fas može se vezati smrtonosna domena male prilagođivačke bjelančevine – smrtonosna domena pridružena Fas-u (FADD; prema engl. *Fas-associated death domain*)<sup>135</sup>. FADD ima drugu domenu, izvršnu smrtonosnu domenu (engl. *death effector domain*)

s pomoću koje može povezati pro-kaspazu-8 ili pro-kaspazu-10<sup>146</sup>. Ovakav molekularni sklop, koji uključuje ligand, receptor, prilagođavačku bjelančevinu i pro-kaspaze nazivamo "smrtonosnim signalnim sklopom" (DISC; prema engl. *death-inducing signaling complex*)<sup>163,164</sup>. U okviru DISC-a dolazi do aktivacije pro-kaspaza<sup>163,164</sup>, ali i do daljnjeg združivanja receptora<sup>162</sup>. Stvaranjem aktivnih početnih kaspaza, stanica počinje umirati.

S obzirom na daljnji slijed biokemijskih zbivanja, razlikujemo dva tipa stanica<sup>165,166</sup>. U stanicama tipa I, aktivacija kaspaze-8 ili kaspaze-10 u DISC-u dovodi do brze pobude izvršnih kaspaza i stanične smrti. S druge strane, stanice tipa II stvaraju vrlo malo aktivne kaspaze-8 u DISC-u, te se apoptoza „oslanja” na mitohondrijski put. Kaspaza-8 pri tome aktivira pro-apoptotski čimbenik Bid koji se potom premiješta u mitohondrij i ondje izaziva otpuštanje mitohondrijskih čimbenika koji će pojačati apoptotski signal<sup>167,168</sup>.

Iako vezivanje liganda Fas za receptor Fas u većini slučajeva dovodi do pobude kaspaza i posljedične stanične smrti, takav ishod nije nužan. Aktivacija kaspaza ne samo što ne mora dovesti do apoptoze, nego može potaknuti staničnu aktivnost pa čak i proliferaciju<sup>169-171</sup>. Osim toga, receptor Fas može pokrenuti signalni put jezgrenog čimbenika  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B; prema engl. *nuclear factor  $\kappa$ B*)<sup>172,173</sup>, a čak možda i put cJun N-terminalne kinaze (engl. *cJun N-terminal kinase*)<sup>156</sup>.

Naposlijetku, slično nekim drugim članovima nadobitelji TNF, ligand Fas može djelovati i kao receptor<sup>174,175</sup>. Citoplazmatski rep molekule liganda Fas može na sebe vezati molekulu *fyn*, signalnu proteinsku kinazu, čime otpočinje prijenos signala<sup>176</sup>. Primjerice, ligand Fas izražen na limfocitima CD8<sup>+</sup> bi mogao imati kostimulacijsku ulogu te sudjelovati u njihovu sazrijevanju u prsnoj žlijezdi<sup>177,178</sup>.

#### **1.4.1. Biološki učinci liganda Fas koji se temelje na apoptozi**

Ligand Fas prvi je put opisan na temelju opažanja da pobuđeni limfociti T CD4<sup>+</sup> mogu usmrtiti stanice mehanizmom koji se ne temelji ni na perforinu niti na granzimima<sup>179</sup>. Stoga ne začuđuje da se o ligandu Fas razmišljalo načelno samo kao o citotoksičnoj molekuli čiji je izražaj ograničen na tek nekoliko tipova

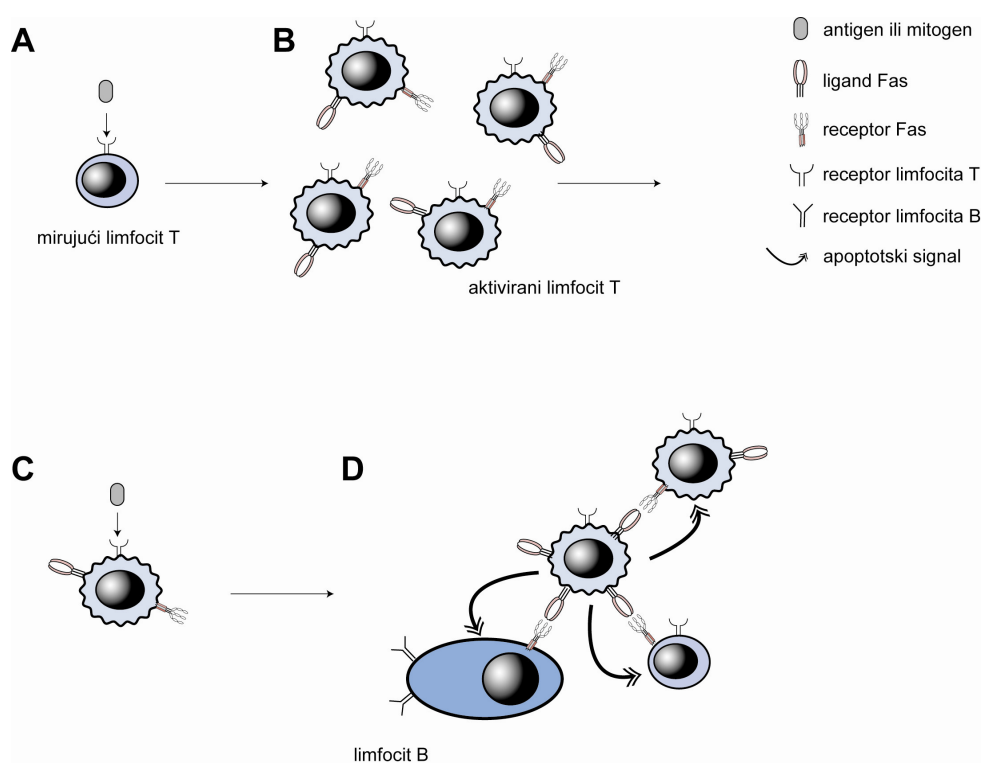
stanica<sup>180</sup>. No, noviji rezultati pokazuju da je ligand Fas zapravo prilično rasprostranjen i to u različitim fiziološkim i patološkim uvjetima te da je uključen u različita zbivanja, primjerice, u imunosno odjeljivanje<sup>181</sup>, izbjegavanje tumora imunosnoj obrani<sup>182</sup>, upalu<sup>183</sup>, obnovu tkivnih stanica<sup>184</sup>, stvaranje imunitetancije<sup>185</sup> i hematopoezu<sup>186</sup>.

Istraživanja provedena na miševima ukazuju da je sustav ligand Fas – Fas izuzetno važan za homeostazu imunosnog sustava i to kao jedan od mehanizama kojima se ostvaruje imunitetancija<sup>187</sup>. Iako postoje naznake da je ligand Fas uključen u stvaranje središnje tolerancije<sup>187-190</sup>, važnost sustava liganda Fas – Fas u probiru limfocita T u prsnoj žlijezdi prilično je ograničena<sup>191,192</sup>.

S druge strane, ligand Fas zauzima važno mjesto u razvoju periferne tolerancije. Limfociti T nakon pobude na svojoj površini izražavaju molekule ligand Fas i Fas, ali ih se u prvo vrijeme ne može usmrtiti aktivacijom receptora Fas. Ponavljanim podraživanjem antigenom, međutim, razvija se osjetljivost na apoptozu posredovanu ligandom Fas. Takav mehanizam uklanjanja pobuđenih limfocita, koji sprječava njihovo nakupljanje i moguća neželjena djelovanja, nazivamo „stanična smrt izazvana pobudom” (AICD; prema engl. *activation-induced cell death*)<sup>193-196</sup>. Pri tome ne bivaju usmrćene samo susjedne stanice (tzv. fratricid) nego i same stanice koje izražavaju ligand Fas (tzv. suicid) (slika 4). O staničnoj smrti izazvanoj pobudom se obično govori kao o ključnom homeostatskom mehanizmu koji ograničava odgovor limfocita T na antigen<sup>197</sup>, iako valja naglasiti da je AICD zapravo fenomen opisan *in vitro* te da mu fiziološko značenje još uvijek nije sasvim jasno<sup>198</sup>. Pored opisanoga, razmjerno jednostavnog mehanizma, pri kojemu pobuđene stanice usmrćuju same sebe, ligand Fas može regulirati imunosni odgovor i na drugi način. Naime, limfociti T CD4<sup>+</sup> mogu s pomoću liganda Fas potisnuti razvoj limfocita CD8<sup>+</sup> <sup>199</sup>.

Sustav ligand Fas – Fas posreduje homeostazi i drugih stanica imunosnog sustava, poput dendritičkih stanica, stanica NK, makrofaga, neutrofila, a osobito limfocita B<sup>185,192,200-203</sup>. Primjerice, limfociti T s pomoću liganda Fas mogu odstraniti autoreaktivne limfocite B<sup>201</sup>, iako u tome sudjeluje i molekula CD40L<sup>204</sup>. Osim održavanja tolerancije na autoantigene, modeli presađivanja su pokazali da je izražaj liganda Fas na limfocitima B davaoca bitan čimbenik u stvaranju tolerancije izazvane transfuzijom prema tkivima davaoca<sup>205</sup>. Limfociti T  $\gamma\delta$  se, pak, služe ligandom Fas kako bi usmrtili pobuđene makrofage<sup>206</sup>. I

dendritičke stanice mogu biti odstranjene aktivacijom sustava ligand Fas – Fas, pri čemu RANKL može djelovati kao antagonist liganda Fas<sup>207</sup>.



**Slika 4.** Uloga sustava liganda Fas – receptor Fas u mehanizmu stanične smrti izazvane pobudom (engl. *activation-induced cell death*). Mirujući limfociti T na staničnoj površini ne izražavaju ni receptor Fas niti ligand Fas (A). Nakon dodira s antigenom ili mitogenom, limfociti T postaju pobuđeni te na staničnoj površini počinju izražavati receptor Fas i ligand Fas, no nisu osjetljivi na apoptozu aktivacijom receptora Fas (B). Nakon ponovnog dodira s antigenom (C), međutim, receptor Fas na njihovoj površini postaje djelatan. Pri tome pobuđeni limfociti T mogu usmrititi sami sebe (tzv. suicid), druge pobuđene limfocite T (tzv. fratricid), ali i mirujuće limfocite T i limfocite B koji se nađu u blizini (D).

Nadalje, ligand Fas je uključen i u nastanak imunolosne odjeljenosti. Tkiva koja se ne mogu obnavljati mogu ograničiti imunolosni odgovor stvaranjem fizičkih zapreka, ograničenjem limfne drenaže te stvaranjem imunolosupresivnih molekula<sup>181</sup>. Ligand Fas, kao jedna od takvih molekula, može usmrititi limfocitnu stanicu koja se pojavi u tkivu. Primjer je obilati izražaj liganda Fas u oku, sjemeniku, jajniku i posteljici<sup>143,208-210</sup>. Opisani način nastanka imunolosne odijeljenosti možemo nazvati „konstitutivnim”. Za razliku od njega, postoji i „inducibilna” imunolosna odijeljenost kojom se tkiva, primjerice jetra ili tanko

crijevo, s pomoću liganda Fas mogu braniti od štetnih učinaka pobuđenih limfocita T<sup>181,211</sup>.

Pored uloge u održavanju homeostaze imunskog sustava, ligand Fas je jedan od glavnih izvršnih čimbenika citotoksičnih limfocita<sup>212-214</sup>. Slično kao i citotoksična molekula granzim B, ligand Fas može biti pohranjen u stanici u obliku mikrovezikula te po potrebi izražen na staničnoj površini<sup>215,216</sup>. Čini se, međutim, da ligand Fas nije presudan u imunskom odgovoru na većinu bolesti uzrokovanih mikroorganizmima<sup>217</sup>, osim virusnih hepatitisa<sup>218-220</sup>. Umjesto toga, ligand Fas je posrednik citotoksičnog razaranja tkiva u stanjima poput reakcije presatka protiv primaoca (engl. *graft-versus-host disease*)<sup>221</sup> i pokusnih autoimunskih bolesti<sup>222,223</sup>.

#### **1.4.2. Biološki učinci liganda Fas koji se ne temelje na apoptozi**

Ligand Fas i receptor Fas imaju i druge zadaće u imunskom sustavu, koje se ne temelje na izazivanju apoptoze. Vezivanje liganda Fas na receptor Fas može na izlučivanje različitih kemokina potaknuti posebnu populaciju limfocita NK-T, čije prepoznavanje nije ograničeno molekulom CD1d. Ti kemokini potom djeluju kemotaktično na granulocite, makrofage i stanice NK<sup>224</sup>. Nadalje, ligand Fas djeluje i na dendritične stanice. Vezivanjem na nezrele dendritične stanice potiče njihovo sazrijevanje, odnosno izražaj molekula glavnog sklopa tkivne podudarnosti skupine II, izražaj kostimulacijskih molekula te proupalnih citokina<sup>225</sup>. Ligand Fas u makrofagima može potaknuti signalne putove receptora IL-1R1 ili receptora nalik receptoru *Toll 4* (engl. *Toll-like receptor 4*) te time djeluje proupalno<sup>226</sup>. Na koncu, oštećena pobuda limfocita T u miševa bez molekule FADD ili u miševa s dominantno-negativnim oblikom molekule FADD ukazuju na sudjelovanje receptora Fas u proliferaciji limfocita T<sup>227-229</sup>. Postoje i radovi koji izvještavaju o kostimulacijskoj ulozi molekule ligand Fas<sup>156</sup>, koreceptorskoj ulozi liganda Fas<sup>206</sup> te o poticanju proliferacije limfocita T s pomoću liganda Fas<sup>230</sup>. Budući da je ligand Fas uključen u obradu i izlučivanje IL-1 $\beta$ <sup>231</sup>, IL-6<sup>232</sup> te IL-8<sup>233</sup>, možemo ga ubrojiti i među proupalne molekule.

Čini se da ligand Fas može djelovati poticajno na nediferencirane hematopoetske stanice<sup>197</sup>. Na primjer, krvotvorne matične stanice pri aktivnom

dijeljenju povećavaju izražaj receptora Fas na staničnoj membrani, ali nisu osjetljive na djelovanje liganda Fas<sup>234,235</sup>. Štoviše, ligand Fas potiče preživljenje ljudskih krvotvornih prethodničkih stanica CD34<sup>+</sup><sup>236</sup> te povećava njihovu sposobnost stvaranja staničnih kolonija<sup>237</sup>. No, valja upozoriti i na radove koji govore o sustavu ligand Fas – Fas kao ograničavatelju broja prethodničkih stanica u koštanoj srži<sup>238</sup>.

Osim u homeostazi imunosnog/hematopoetskog sustava, molekule ligand Fas i Fas važne su i za homeostazu jetre. Naime, sustav ligand Fas – Fas posreduje odstranjivanje “ostarjelih” hepatocita<sup>192</sup>. U drugim tkivima ligand Fas, posredno ili neposredno, može ograničiti prokrvljenost. U mišjem oku izravno sprječava prekomjerno urastanje krvnih žila u mrežnicu<sup>239</sup>. Endotelne stanice krvnih žila tijekom upale izražavaju ligand Fas koji izaziva apoptozu leukocita. Ograničavanjem broja leukocita ograničava se i broj čimbenika koji potiču angiogenezu, a koje izlučuju leukociti pa možemo reći da ligand Fas posredno ima i protuangiogenično djelovanje<sup>240</sup>. Naposljetku, ligand Fas i receptor Fas uključeni su i u homeostazu živčanog sustava. Dok su motorički neuroni podložni apoptozi izazvanoj ligandom Fas, aktivacija receptora Fas potiče regeneraciju osjetnih neurona<sup>241</sup>.

### **1.4.3. Posljedice nedostatka liganda Fas i receptora Fas**

U upoznavanju biološkog značenja liganda Fas i receptora Fas veliku su ulogu odigrala dva mišja soja: *gld* (prema engl. *generalised lymphoproliferative disorder*; opći limfoproliferativni poremećaj) i *lpr* (prema engl. *lymphoproliferation*)<sup>180</sup>. Oba soja su spontani mutanti koji imaju autosomno recesivne mutacije gena ligand Fas (*gld*), odnosno gena Fas (*lpr*)<sup>242,243</sup>. Zajedničko obilježje sojeva *gld* i *lpr* je limfadenopatija i splenomegalija te sustavni autoimunosni poremećaj, koji uključuje hipergamaglobulinemiju, stvaranje autoprotutijela i odlaganje imunokompleksa u glomerulima<sup>244</sup>. Starenjem životinja dolazi i do stvaranja novotvorina podrijetlom od limfocita B<sup>245</sup>. Sve navedeno dovodi do skraćenja životnog vijeka miševa na polovicu<sup>244,245</sup>.

Limfadenopatija i splenomegalija u životinja bez funkcionalnih bjelančevina ligand Fas ili Fas posljedica su poliklonskog nakupljanja limfocita T i B. Među limfocitima T povećan je udio stanica koje nalikuju memorijskim limfocitima T<sup>246,247</sup>, dok je među limfocitima B povećan udio kronično pobuđenih stanica<sup>248</sup>. Osim toga, za nedostatak djelovanja sustava ligand Fas – Fas znakovito je nakupljanje osebujnih limfocita T koji nemaju izražene koreceptorske molekule, ali zato imaju izražen biljeg limfocita B (B220). Zbog takvog fenotipa (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>) takve limfocite T nazivamo „dvostruko negativnima” (DN; prema engl. *double negative*)<sup>249</sup>. Dvostruko negativni limfociti T su anergični i dobroćudni<sup>250</sup>, većina ne proliferira nakon podraživanja mitogenima<sup>251-253</sup>, ali izražavaju neke biljege koji ukazuju na njihovu kroničnu aktivaciju, poput LFA-1, CD44, CD62-L, CD69 i liganda Fas<sup>247,254-256</sup>.

Autoimunosti poremećaj i limfoproliferacija u miševa soja *gld* načelno su izravna posljedica nedostatka funkcionalnog liganda Fas. Kako mehanizam AICD služi ograničavanju broja limfocita, nedostatak liganda Fas može za posljedicu imati njihovo nakupljanje, odnosno limfoproliferaciju<sup>191</sup>. Osim što pobuđeni limfociti T usmrćuju jedni druge fratricidom i suicidom, s pomoću liganda Fas mogu usmrtiti i mirujuće limfocite T koji se zateknu u njihovoj blizini (engl. *bystander cells*) ili anergične autoreaktivne limfocite B<sup>191</sup>. Naime, limfocit B, čiji je receptor specifičan za antigene vlastitog organizma, u pravilu susreće te antigene bez istodobnog predočenja kostimulacijskih molekula. Posljedica takvog načina aktivacije receptora limfocita B je stanična anergija<sup>257</sup>. U životinja bez funkcionalnog liganda Fas nije moguće odstraniti anergične limfocite B pa se oni nakupljaju.

S druge strane, neke osobitosti bolesti od koje pate životinje *gld* ne mogu se jednostavno objasniti nedostatkom funkcionalnog liganda Fas na limfocitima. Limfociti miševa bez liganda Fas ili receptora Fas na svojoj površini pojačano izražavaju kostimulacijsku molekulu B7-1 (CD80) i to čak i u uvjetima bez prisutnosti patogena (engl. *specific pathogen-free environment*). Osim molekule B7-1, pojačano je izražen i njen receptor, molekula CD28<sup>258</sup>. Izražaj obje molekule mogao bi imati ulogu u razvoju limfoproliferacije i/ili autoimunosti u miševa *gld* ili *lpr*. U miševa soja *gld* poremećen je i mehanizam homeostatske proliferacije, a čini se da je to zbog pojačanog stvaranja IL-7<sup>259</sup>. Nadalje, za razvoj fenotipa miševa *gld* i *lpr* važan je i nedostatak molekula



ligand Fas, odnosno Fas, i izvan imunskog sustava<sup>260</sup>. Konačno, mutacije gena za ligand Fas ili Fas čine životinju sklonom razvoju autoimunskog poremećaja, ali su razvoj i težina bolesti uvjetovani i drugim genima<sup>261,262</sup>.

Nastanak dvostruko negativnih limfocita T također nije potpuno jasan. Iako ih se u limfnim čvorovima i slezeni miševa soja *gld* ili *lpr* može naći u velikom broju, dvostruko negativni limfociti ondje ne proliferiraju<sup>254</sup>. Prema jednom mišljenju, dvostruko negativni limfociti T su stanice koje su izbjegle uklanjanje u prsnoj žlijezdi, otišle u jetru, ondje proliferirale te nakon toga naselile sekundarne limfne organe<sup>263</sup>. No, u svjetlu relativno male važnosti sustava ligand Fas – Fas u stvaranju središnje tolerancije<sup>191,192</sup>, takvo se tumačenje ne čini vjerojatnim.

Dvostruko negativni limfociti T bi u miševa bez liganda Fas, odnosno receptora Fas, najvećim dijelom mogli nastati iz pobuđenih limfocita T CD8<sup>+</sup>, čemu u prilog govore sljedeći dokazi: križanje mišjeg soja *lpr* s miševima bez molekula MHC-I sprječava stvaranje dvostruko negativnih limfocita T<sup>264</sup>, a primjena protutijela usmjerenih na biljeg CD8 sprječava nakupljanje dvostruko negativnih limfocita<sup>265</sup>. Osim toga, vjerojatno je da su dvostruko negativni limfociti T potomci limfocita T koji su bili pobuđeni. Na to ukazuje izražaj molekule B220 (CD45R), izražaj koje u pravilu prethodi apoptozi pobuđenog limfocita<sup>266</sup>. Ukoliko mehanizam AICD nije djelatan, kao u miševa soja *gld*, nepotrebni limfociti T neće biti odstranjeni<sup>192</sup>, već će preživjeti, postupno smanjujući izražaj koreceptorskih molekula<sup>266</sup>. Zanimljivo je opažanje Schneckove skupine da dvostruko negativni limfociti T imaju i homeostatsku ulogu jer mogu potisnuti poliklonsku pobudu limfocita T mehanizmom koji uključuje zaprječavanje stvaranja IL-2<sup>267</sup>. Osim u uvjetima nedostatka molekula ligand Fas ili Fas, dvostruko negativni limfociti T se u povećanom broju mogu naći u još nekim autoimunskim poremećajima<sup>268-270</sup>. Čini se da tada nastaju iz onih limfocita T koji su pobuđeni samo preko antigenskog receptora a da pritom nisu bile uključene koreceptorske molekule<sup>271,272</sup>.

Ako se prisjetimo široke uključenosti sustava ligand Fas – receptor Fas u tkivna zbivanja, posljedice nepostojanja jedne od tih molekula su zapravo prilično ograničene. Iako miševi sojeva *gld* i *lpr* imaju poremećenu homeostazu imunskog sustava, nije im povećana osjetljivost na infekcije<sup>273</sup>. Granulopoeza im je minimalno promijenjena<sup>274,275</sup>, ali imaju pojačanu izvankoštanu

hematopoezu<sup>276</sup>. Sudeći prema razvoju hipokampusa, razvoj središnjeg živčanog sustava nije poremećen<sup>277</sup>.

#### 1.4.4. Ligand Fas u koštanom sustavu

Ako imamo u vidu tkivni izražaj liganada i receptora obitelji TNF u različitim tkivima<sup>148</sup>, ne čudi izražaj liganda Fas i receptora Fas na koštanim stanicama. Dok osteoblasti izražavaju i ligand Fas i receptor Fas<sup>102,278-281</sup>, osteoklasti izražavaju samo receptor Fas<sup>282-284</sup>. Aktivacija receptora Fas s pomoću liganda Fas ili agonističkih protutijela dovodi do apoptoze i jedne i druge vrste koštanih stanica<sup>102,278,282-286</sup>.

Ne samo što koštane stanice izražavaju molekule sustava ligand Fas – receptor Fas, nego je taj sustav uključen i u patogenezu nekih bolesti lokomotornog sustava. Apoptoza osteocita izazvana glukokortikoidima posredovana je i pojačanim izražajem molekule Fas na staničnoj površini<sup>287</sup>. Slično tome je i apoptoza osteoklasta izazvana bisfosfonatima posredovana pojačanim izražajem gena za Fas<sup>283</sup>. Koštana se resorpcija u upalnim bolestima, poput reumatoidnog artritisa, dijelom temelji i na apoptozi osteoblasta izazvanoj ligandom Fas kojeg stvaraju upalne stanice<sup>104,288,289</sup>. Receptor Fas bi mogao biti uključen i u razvoj postmenopauzalne osteoporoze, ali su istraživanja o tome zasad oskudna<sup>290</sup>. Naposljetku, razina izražaja receptora Fas obrnuto je povezana s metastatskim potencijalom osteosarkomskih stanica<sup>291</sup>.

Unatoč vrijednosti istraživanja koja su pokazala izražaj liganda Fas u tkivima, za rasvjetljivanje uloge molekula ligand Fas i Fas u koštanoj biologiji presudni su pokusi *in vivo*. Teshimina skupina je, potičući stvaranje nove kosti s pomoću ukupnih BMP iz goveđe kosti, pokazala obilnije ektopično okoštavanje u miševa soja *gld* i *lpr*, nego u miševa divljeg tipa<sup>292</sup>. Nasuprot tome, naši rezultati s poticanjem okoštavanja s pomoću rekombinantnog ljudskog (rh; prema engl. *recombinant human*) BMP-2 govore da je ligand Fas uključen samo u ranu fazu stvaranja nove kosti<sup>293</sup>. Miševi soja *gld* stvorili su više hrskavičnog i mezenhinskog tkiva šesti dan nakon potkožne ugradnje rhBMP-2 u usporedbi sa životinjama divljeg tipa. Dvanaest dana nakon ugradnje rhMBP-2, miševi soja *gld* imali su pojačano izražene gena za IL-1 $\alpha$  i TNF- $\alpha$ , ali između životinja

divljeg tipa i miševa soja *gld* nije bilo razlike u volumenu novostvorenog tkiva. Naša je istraživačka skupina k tome opisala i novu posljedicu nedostatka molekule liganda Fas u sklopu općeg limfoproliferativnog poremećaja – povećanje mineralne gustoće kostura te povećanje količine trabekularne kosti<sup>294</sup>. Dodatno, miševi soja *gld* nisu gubili koštano tkivo nakon ovarijektomije, a u modelu koštane regeneracije nakon ablacije koštane srži stvarali su više nove kosti od miševa soja C57BL/6. Osim toga smo u sklopu općeg limfoproliferativnog poremećaja pronašli i pojačani izražaj gena za OPG u dijafizama dugih kostiju, te pojačani izražaj bjelančevine OPG u dijafizama dugih kostiju te staničnim kulturama koštane srži<sup>294</sup>. Na temelju tih opažanja pretpostavili smo da autoimunski poremećaj miševa soja *gld* dovodi do povećanja izražaja receptora OPG, a samim time i do promjene koštanog fenotipa.

## 2. CILJ I SVRHA RADA

Cilj ovoga rada bio je utvrditi jesu li promjene koštanog fenotipa miševa soja *gld* zapravo posljedica imunosnog poremećaja. Iako se ublažavanje ili izliječenje limfoproliferativne bolesti *gld* može postići prijenosom stanica divljeg tipa<sup>295-301</sup>, utjecaj na koštani fenotip u takvih miševa soja *gld* nije istražen. Kako bih istražio povezanost imunosnog i koštanog fenotipa, poslužio sam se modelom parabioze<sup>302</sup>, spojivši miša divljeg tipa s mišem soja *gld*. Miševi koji su parabiotiski spojeni razvijaju združeni krvni optjecaj koji omogućuje izmjenu stanica i topljivih čimbenika između životinja. Pretpostavili smo, dakle, da će iz miša divljeg tipa u miša soja *gld* prijeći imunosne stanice s funkcionalnom molekulom ligand Fas te da će doći do prijelaza i u drugom smjeru – iz miša soja *gld* će u miša divljeg tipa prijeći imunosne stanice s nefunkcionalnim ligandom Fas. U miša soja *gld* bi tada trebalo doći do ublažavanja limfoproliferacije i autoimunskog poremećaja te, ako koštani fenotip stvarno ovisi o imunofenotipu, do normalizacije koštanog fenotipa.

Kako bismo pratili dinamiku zbivanja u imunosnom i košanom sustavu odlučili smo parabiotiski spojene životinje žrtvovati u četiri vremenske točke nakon operacije. Dodatno nas je zanimala stalnost promjena postignutih parabiozom pa smo odlučili i rastaviti parabiotiski par te žrtvovati životinje nakon što su određeno vrijeme bile odvojene.

Promjene u imunosnom sustavu odabrali smo pratiti određivanjem udjela dvostruko negativnih limfocita T u primarnim i sekundarnim limfnim organima. Nadalje, za praćenje koštanog fenotipa tijekom parabioze odabrali smo osteoklastogenični i osteoblastogenični potencijal koštane srži. Budući su naša prethodna istraživanja ukazala na pojačani genski izražaj receptora OPG u miševa soja *gld*<sup>294</sup>, željeli smo provjeriti hoće li tijekom parabioze doći i do promjene izražaja gena i bjelančevine OPG.

### **3. HIPOTEZA**

Tijekom parabioze će vjerojatno doći do smanjenja udjela dvostruko negativnih limfocita T u tkivima miševa soja *gld*; to smanjenje biti će praćeno smanjenim osteoblastogeničnim, a povećanim osteoklastogeničnim potencijalom koštane srži te smanjenim izražajem gena OPG i bjelančevine OPG u kosti i koštanoj srži. Nakon rastavljanja životinja će se vrijednosti svih praćenih varijabli vratiti vrijednostima kontrolnih miševa soja *gld*.

## 4. POSTUPCI ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Pokusne životinje

U istraživanju sam koristio miševe visokosrođenog soja C57BL/6J (B6) (haplotip MHC: H-2<sup>b</sup>), te miševe homozigotne za spontanu mutaciju gena za ligand Fas (*gld*)<sup>242</sup> temeljnog soja B6<sup>303</sup>. Sve su životinje u vrijeme operacije bile stare 10-12 tjedana. Takvim odabirom bilo mi je moguće izbjeći razlike u značajkama kostiju te razlike u koštanom metabolizmu mišjih sojeva<sup>304,305</sup>. Osim dva navedena soja, kao izvor alogeničnih stanica za reakciju pomiješanih limfocita (engl. *mixed lymphocytes reaction*) rabio sam miševe soja CBA (haplotip MHC: H-2<sup>k</sup>). Svi su miševi bili uzgojeni u štali Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

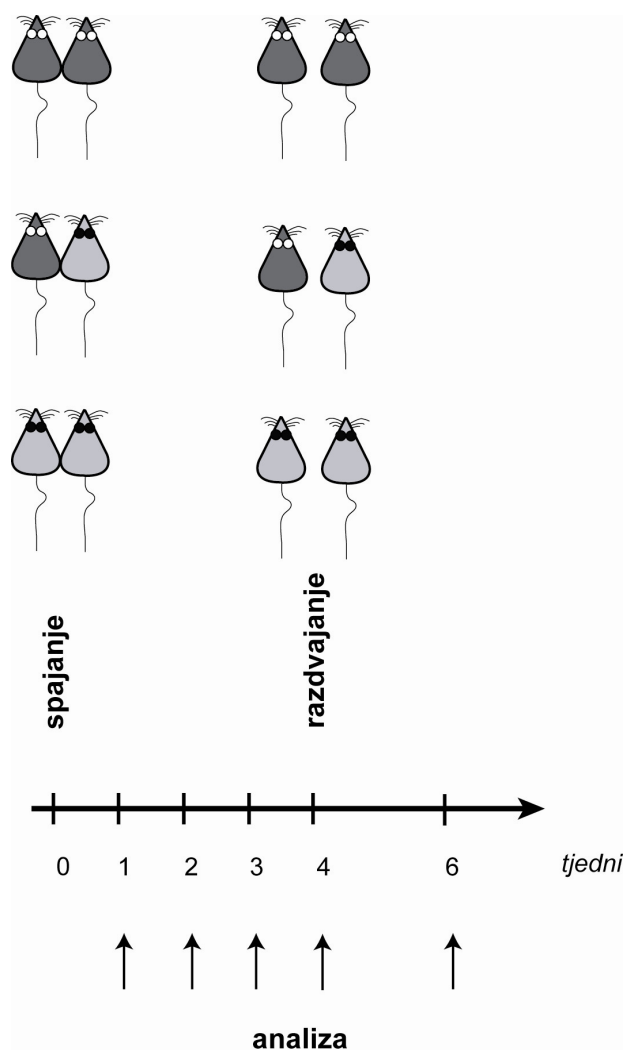
Za vrijeme istraživanja, miševi su živjeli u propisanim uvjetima, 4-5 životinja po kavezu uz 10 sati svjetla i 14 sati tame dnevno, te standardnu prehranu (4RR25; Mucedola, Settimo Milanese, Italija) i vodu po želji. Parabiotski spojen mišji par bio je tijekom pokusa sam u kavezu. Članovi para su također ostali zajedno u kavezu i nakon razdvajanja.

U radu s pokusnim životinjama pridržavao sam se naputaka o njezi i uporabi laboratorijskih životinja Nacionalnih instituta za zdravlje Sjedinjenih američkih država (Bethesda, MD).

### 4.2. Ustroj pokusa

Životinje sam nasumično podijelio u tri skupine: dvije kontrolne te jednu pokusnu. Prvu kontrolnu skupinu činili su parovi parabiotski spojenih miševa soja B6 (označeni kao B6/B6), a drugu parovi parabiotski spojenih miševa soja *gld* (oznaka: *gld/gld*). U pokusnoj skupini nalazili su se parabiotski parovi u kojima je jedan miš bio soja B6 (oznaka: B6/*gld*), a drugi miš soja *gld* (oznaka: *gld*/B6). Na tako oblikovanim skupinama obavljena su dva niza pokusa (slika 5). U svakoj vremenskoj točki je po skupini bilo 5-6 parabiotskih mišjih parova.

Osim parabiotiski spojenih životinja, u pokuse sam uključio i “neoperirane” miševe sojeva B6 i *gld* kao temeljne (engl. *base-line*) kontrolne životinje.



**Slika 5.** Shematski prikaz ustroja pokusa. Miševi soja C57BL/6 (tamno sivo) i soja *gld* (svijetlo sivo) kirurški su spojeni u parabiozu. Životinje su žrtvovane nakon jedan, dva, tri ili četiri tjedna zajedničkog života. Osim toga, dio miševa je nakon četiri tjedna razdvojen te žrtvovan nakon dodatna dva tjedna, koja su proveli odvojeni. U svakoj od pet vremenskih točaka su za daljnju analizu prikupljeni krv, limfni organi i kosti.

Svrha prvog niza pokusa bila je utvrditi dolazi li nakon parabioze do promjene koštanog fenotipa miševa soja *gld* nakon što ih spojimo s miševima soja B6. Životinje su cervikalnom dislokacijom žrtvovane u četiri vremenske točke nakon kirurškog spajanja: sedmi, četrnaesti, dvadeset i prvi te dvadeset i osmi dan. Za analizu su korištena sljedeća tkiva: koštana srž, krv, limfni čvorovi, slezena, prsna žlijezda, te bedrene i goljениčne kosti.

Drugim nizom pokusa želio sam utvrditi postojanost promjene koštanog fenotipa miševa soja *gld*. U tu svrhu sam životinje parabiotiski spojio, razdvojio ih dvadeset i osmi dan nakon operacije te žrtvovao četrnaest dana nakon razdvajanja. Za analizu sam koristio koštanu srž, krv, limfne čvorove, slezenu, prsnu žlijezdu, te bedrene i goljениčne kosti.

### **4.3. Operacijski postupak**

Životinje sam anestezirao 2.5%-tnim tribromoetanolom, u skladu s uputama proizvođača (SIGMA-Aldrich Corp., St. Louis, MO). Kirurške postupke sam obavio prema načelima aseptičnog rada<sup>306</sup>.

Najprije sam uspavanom mišu ošišao krzno na lateralnoj strani trupa, a potom napravio uzdužni kožni rez, od koljena do lakta. Poslije otvaranja kože sam, pazeći da ne povrijedim veće krvne žile, uzdužno zarezao lateralnu trbušnu stijenkku, neposredno ispod rebrenog luka, u duljini 5–7 mm. Trbušna šupljina drugog miša u istom paru bila je otvorena na suprotnoj strani tijela. Otvore na trbušnoj stijenci dviju životinja spojio sam pojedinačnim šavovima, resorptivnim koncem debljine 4-0. Kako bih osigurao što čvršći spoj životinja u paru, spojio sam im laktove i koljena priležećih strana i to pojedinačnim šavom koji prolazi uz zglob, uporabom aresorptivnog konca debljine 2-0. Kožu dviju životinja spojio sam produžnim šavom, aresorptivnim koncem debljine 4-0. Nakon operacije, miševe sam oko trupa previo ljepljivom ovojnom trakom. Oporavak i zdravlje parabiotiski spojenih životinja nadzirani su svaki dan. Razdvajanje spojenih životinja obavljeno je obrnutim postupkom, uz ispiranje rana kirurškim dezinficijensom (Plivasept; PLIVA, Zagreb, Hrvatska). Smrtnost u provedenim pokusima nije prelazila 20%.

### **4.4. Protočnometrijska analiza**

Suspenzije stanica koštane srži pripremio sam ispiranjem medularne šupljine bedrene i goljениčne kosti 0.1 M fiziološkom otopinom puferiranom fosfatnim puferom (PBS; prema engl. *phosphate buffered saline*), s pomoću igle provrta



23G. Suspenzije stanica pazušnih i preponskih limfnih čvorova, slezene i prsne žlijezde pripremio sam gnječenjem organa u 0.1 M PBS, s pomoću dvaju predmetnih stakalaca hrapavih rubova. Svaki uzorak za potrebe protočne citometrije oblikovao sam združivanjem tkiva svih životinja iz pojedine skupine. Jednostaničnu suspenziju koštane srži i limfnih organa dobio sam uzastopnim protiskivanjem kroz iglu provrta 23G, te završnim propuštanjem suspenzije kroz najlonsku mrežicu promjera okna 70  $\mu\text{m}$  (Fisher Scientific, Pittsburgh (PA), SAD). Perifernu krv sam, nakon enukleiranja orbite anestezirane životinje, prikupio u epruvete s antikoagulansom (BD Vacutainer Tube; BD Biosciences, San Jose (CA), SAD). U svim sam uzorcima razorio eritrocite uporabom otopine za njihovo liziranje (150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; pH=7.4), inkubirajući stanične suspenzije na sobnoj temperaturi, tijekom 10 min. Nakon toga sam otopinu za liziranje eritrocita razrijedio 0.1 M PBS-om te sam potom stanice oprao 0.1 M PBS-om koji je sadržavao 0.1%  $\text{NaN}_3$ . Koncentracije stanica u suspenziji sam odredio brojanjem stanica u 0.05%-tnom tripanskom modrilu, s pomoću Bürker-Türkove komorice, uz isključivanje mrtvih stanica.

Za protočnocitometrijsku analizu sam uzeo po  $1 \times 10^6$  stanica svakog uzorka. Stanice sam resuspendirao u 100  $\mu\text{L}$  0.1 M PBS s 0.1%  $\text{NaN}_3$ . Potom sam dodao odgovarajuća protutijela, u prikladnom razrijeđenju. Razrijeđenja sam odredio u prethodnim pokusima, inkubirajući tkiva s rastućim razjedenjima pojedinih protutijela. Za analizu sam koristio monoklonska protutijela specifična za mišje bjelančevine, konjugirana s fluorescentnim bojama alofikocijaninom (APC; prema engl. *allophycocyanine*), fikoeritriinom (PE; prema engl. *phycoerithrin*), fluorescein-izotijocijanatom (FITC; prema engl. *fluorescein-isothocyanate*) i bjelančevinskim sklopom peridinin-klorofil (PerCP; prema engl. *peridinin-chlorophyll-protein complex*). Za četverostruko obilježavanje stanica sam koristio sljedeća protutijela: anti-CD3 $\epsilon$ -FITC (klon 145-2C11; BD Biosciences), anti-CD45R-PerCP (klon RA3-6B2; BD Biosciences), anti-CD4- PE (klon H 129.19; BD Biosciences), te anti-CD8-APC (klon 53-6.7; BD Biosciences). Osim četverostruko obojanih uzorka, za ugađanje uređaja za protočnu citometriju sam priredio neobojane uzorke te jednostruka bojanja pojedinih tkiva navedenim protutijelima. Kako bih isključio mogućnost nespecifičnog vezivanja protutijela, tkivne uzorke sam inkubirao sa sljedećim izotipskim kontrolnim protutijelima: IgG<sub>1k</sub> armenskog hrčka-FITC (BD Pharmingen), IgG<sub>2a'k</sub> štakora-PerCP (BD

Pharmingena), IgG<sub>2a</sub>-κ štakora-PE (BD Pharmingen) i IgG<sub>2a</sub>-κ štakora-APC (BD Pharmingen). Inkubiranje stanica s protutijelima provedeno je tijekom 30 min, na ledu, u tami. Potom sam stanice dva puta isprao s pomoću 0.1 M PBS s 0.1% NaN<sub>3</sub>, a onda resuspendirao u 300 µL 0,1 M PBS s 0.1% NaN<sub>3</sub> i 1 µg/mL propidij-iodida (SIGMA-Aldrich Corp.) Analizu sam obavio na uređaju za protočnu citometriju FACSCalibur (Beckton Dickinson) i računalnog programa CellQuest (Beckton Dickinson). Od svakog sam uzorka prikupio po 50 000 citometrijskih događaja (engl. *acquisition events*). Iz analize sam isključio mrtve i fragmentirane stanice, a granice pojedinih kvadranta sam postavio na temelju signala izotipskih kontrolnih protutijela.

#### **4.5. Analiza genskog izražaja**

Aseptično sam izvadio goljenične, odnosno bedrene kosti te odstranio meka tkiva. Potom sam hranjivim medijem α-MEM (Gibco BRL, Grand Island (NY), SAD) isprao koštanu srž. Uzorke “prazne” kosti i koštane srži sam potom odvojeno obradio. Svaki sam uzorak za izolaciju RNA oblikovao združivanjem tri do četiri kosti, odnosno koštane srži, od kojih je svaka bila iz druge životinje. Na “prazne” kosti sam izravno dodao 1 mL otopine za izolaciju RNA (TRI-Reagent; Molecular Research Center, Cincinnati (OH), SAD). Koštanu srž sam nekoliko puta protisnuo kroz iglu provrta 23G, te centrifugirao tijekom 5 min na 500 g. Supernatant sam odlio, a talog resuspendirao u 1 mL TRI-Reagent-a. Sam postupak izolacije ukupne stanične RNA proveden je u skladu s nuputcima proizvođača, a prema načelima postupka Chomczynskog i Sacchijeve<sup>307</sup>. Nakon homogeniziranja kostiju uređajem za homogeniziranje tvrdih tkiva (IKA Ultra-turax T 25; Labortechnik, Staufen, Njemačka), odnosno resuspendiranja koštane srži u TRI-Reagentu, uzorke sam inkubirao na sobnoj temperaturi tijekom 10 min. Stanični lizat sam odvojio centrifugiranjem pri 12,000 g tijekom 30 min, te na njega dodao 0.2 mL kloroforma. Nakon inkubacije od 2 min na +4 °C, uzorke sam ponovo centrifugirao pri 12,000 g tijekom 15 min. Vodenu fazu prenio u novu epruvetu te sam dodavanjem 0.5 mL izopropanola precipitirao RNA. Uzorke sam potom inkubirao tijekom 60 min na -20 °C te sam precipitat oborio centrifugiranjem pri 12,000 g tijekom 15 min. Dobiveni

sam talog oprao 75%-tnim etanolom te centrifugirao pri 7,500 g tijekom 5 min. Talog sam otopio u destiliranoj vodi te sam kakvoću i čistoću pripravljene RNA provjerio UV-VIS spektrofotometrom (Applied Biosystems, Foster City (CA), SAD), omjerom apsorbanacije pri 260 nm i 280 nm.

Nakon izolacije ukupne stanične RNA, upotrijebio sam postupak obrnutog prepisivanja (engl. *reverse transcription*), u ukupnom reakcijskom volumenu od 25 µL po uzorku. Pet µg RNA je bilo inkubirano sa slučajnim začetnicima (5 µM) (Random Hexamers; Applied Biosystems) i inhibitorom ribonukleaza (0.8 U/µL) (RNase inhibitor; Applied Biosystems) tijekom 10 min na +70 °C. Nakon kratkog hlađenja na ledu, dodao sam pufer (50 mmol/L Tris-HCl (pH=8.3), 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), mješavinu deoksinukleotid trifosfata (1 mM svakog) (Gibco BRL), 1,4-ditio-treitol (10 µM) (DTT; Gibco BRL) i reverznu transkriptazu (4 U/µL) (MuLV Reverse Transcriptase; Applied Biosystems), te sam otopinu inkubirao tijekom 45 min pri +37 °C. Nakon prve inkubacije sam uzorcima ponovo dodao reverznu transkriptazu (100 U), te proveo konačnu inkubaciju tijekom 60 min pri +37 °C. Uzorke sam potom ohladio na ledu.

cDNA dobijenu obrnutim prepisivanjem sam iskoristio za kvantitativno umnožavanje lančanom reakcijom polimerazom (qPCR; prema engl. *quantitative polymerase chain reaction*) na uređaju ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City (CA), SAD).

Proizvodi umnožavanja bili su otkriveni mjerenjem vezivanja fluorescentne boje SYBR Green I za dvostruku uzvojnica DNA, s pomoću seta kemikalija SYBR Green PCR Master Mix, a u skladu s naputcima proizvođača (Applied Biosystems). Svaka je reakcija bila izvedena u triplikatu, u reakcijskom volumenu 25 µL koji je sadržavao: 0.25 µL cDNA; 0.25 U uracil N-glikozilaze (AmpErase; Applied Biosystems); 200 nM začetnika 5' i začetnika 3'; gotovi pripravak 1× SYBR Green PCR Master Mix, u kojem se nalaze fluorescentna boja SYBR Green I i 0.625 U DNA polimeraze (AmpliAq Gold DNA polymerase). Reakcije su bile postavljene u pločici s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate; Applied Biosystems). Začetnici za β-aktin su, prema objavljenom slijedu<sup>308</sup> (sense 5'TGC GTG ACA TCA AAG AGA AG3', antisense 5'CGG ATG TCA ACG TCA CAC TT3'), bili naručeni od tržišnog izvora (Applied Biosystems). Začetnici za OPG (sense 5'CAC AAG AGC AAA CCT TCC AG3', antisense 5'CTC TGT GGT

GAG GTT CGC GT3’; te sense 5’TGA CCT CTG TGA AAG CAG CG3’, antisense 5’CAT CAG GCC CTT CAA GGT GT3’) oblikovani su uporabom računalnog programa (Primer Express Software; Applied Biosystems) te naručeni od istog proizvođača (Applied Biosystems). U skladu s preliminarnim pokusima, uzorci su prvo bili inkubirani tijekom 2 min na +50 °C kako bi se aktivirao enzim uracil N-glikozilaza. Nakon toga je inkubiranjem tijekom 10 min na +95 °C uracil N-glikozilaza inaktivirana te aktiviran enzim DNA polimeraza. Potom su uzorci tijekom 40 ciklusa bili inkubirani 15 s na +95 °C pa 60 s na +60 °C. Nakon zadnjeg ciklusa umnožavanja proizvodi PCR reakcije su bili disocirani temperaturnim gradijentom i to zagrijavanjem s +60 °C do +95 °C brzinom od 0.03 °C/s. Pregledom tzv. disocijacijske krivulje provjerio sam je li tijekom umnažanja došlo i do stvaranja nespecifičnih proizvoda. Očitavanja fluorescencije proizvoda PCR reakcije prikazana su grafički, brojem ciklusa na apscisi te fluorescencijom ( $\Delta R_n$ ; razlika fluorescencije reakcije i “temeljne” fluorescencije) na ordinati. Arbitrarni prag sam odabrao na sredini linearnog dijela krivulje umnožavanja prikazane na grafu s brojem ciklusa umnožavanja na apscisi te logaritmom  $\Delta R_n$  na ordinati. Kritični prag broja ciklusa ( $C_t$ ; prema engl. *cycle threshold*) bio je definiran kao onaj ciklus na kojem  $\Delta R_n$  prelazi arbitrarni prag. Relativnu količinu cDNA u pojedinom uzorku sam izračunao uporabom standardne krivulje koju sam pripremio s pomoću 5 serijskih razrjeđenja uzorka za kalibraciju (engl. *calibrator sample*; u ovom slučaju: “prazna” kost, odnosno koštana srž miša soja B6). Standardnu krivulju sam prikazao u koordinatnom sustavu u kojem su logaritmi količine (prikazane u relativnim jedinicama serijskih razrjeđenja) cDNA bili pridruženi apscisi, a vrijednosti  $C_t$  pridružene ordinati. Relativna količina mRNA u uzorku je tada bila izražena normaliziranjem prema količini mRNA za  $\beta$ -aktin, kao “endogenoj” kontroli<sup>309</sup>.

Budući da postupkom s pomoću vezivanja boje SYBR Green I nisam uspio dobiti signal OPG-a u koštanoj srži (opisano u “Rezultatima”), želio sam taj rezultat provjeriti drugim postupkom. Za to sam se poslužio otkrivanjem proizvoda umnožavanja s pomoću specifične oligonukleotidne probe, koja je obilježena s dvije boje: izvjestiteljem (engl. *reporter dye*) i hvatačem (engl. *quencher dye*). Tijekom reakcije umnožavanja, produljenje začetnika dovodi do odvajanja oligonukleotidne probe s DNA te pojačanja fluorescencije izvjestitelja, tzv.

postupak TaqMan. To pojačanje fluorescence bilježi se kao specifični signal<sup>309</sup>. Set kemikalija koji sadrži par začetnika za mišji OPG i specifičnu probu dostupni su na tržištu (TaqMan Gene Expression Assay; Applied Biosystems). Od istog proizvođača sam naručio i set kemikalija za umnožavanje, koji sadrži DNA polimerazu i mješavinu deoksiribonukleotid trifosfata u prikladnom puferu (TaqMan Universal PCR Master Mix; Applied Biosystems). Svaka reakcija umnožavanja provedena je u triplicatu, u reakcijskom volumenu 25  $\mu$ L, u pločici s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate; Applied Biosystems), a u skladu s naputcima proizvođača. Uvjeti umnožavanja te raščlamba rezultata odgovaraju onima koje sam opisao u prethodnom odlomku, uz umnožavanje s korištenjem boje SYBR Green I, osim što nije provedena temperaturna disocijacija proizvoda umnožavanja.

#### **4.6. Analiza bjelančevinskog izražaja**

Goljenične, odnosno bedrene kosti sam aseptično izvadio te odstranio meka tkiva. Potom sam koštanu srž isprao puferom (20 mM imidazol (pH=7.38), 250 mM saharoza; alternativni sastav 300 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl (pH=7.60), 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corp.)) u koji sam dodao inhibitore proteaza (Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche Diagnostics Corp, Mannheim, Njemačka). Svaki uzorak za analizu bjelančevinskog izražaja oblikovao sam združivanjem tkiva, kao što je navedeno u opisu protočne citometrije.

Kosti sam homogenizirao u opisanom puferu, s pomoću uređaja za homogeniziranje tvrdih tkiva. Koštanu srž sam nekoliko puta protisnuo kroz iglu provrta 23G. Homogenat obje vrste uzoraka sam potom centrifugirao pri 1,500 *g* tijekom 15 min. Nadtalog sam premjestio u čistu epruvetu te centrifugirao pri 14,000 *g* tijekom 10 min. Nadtalog tog centrifugiranja sam koristio u daljnjem radu.

Koncentraciju ukupnih bjelančevina u uzorcima sam odredio uporabom postpuka s bicinkoničnom kiselinom<sup>214</sup>, a s pomoću kupovno dostupnih kemikalija, slijedeći naputke proizvođača (BCA Protein Assay; Pierce Biotechnology, Rockford (IL), SAD). Apsorbanciju sam očitao pri 540 nm na spektrofotometru za mikrotitarske pločice (Dynatech MR5000 Microplate

Reader; Dynatech Labs Ltd., Billingham, UK) te izračunao masenu koncentraciju bjelančevina u uzorku.

Količinu OPG-a u uzorcima sam odredio postupkom ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Na početku sam pločicu s 96 zdenaca (Immulon 2HB flat bottom microtiter plate; Thermo Life Sciences Ltd., Basingstoke, UK) obložio s kozjim protutijelom na mišji OPG (R&D Systems Europe, Abington, UK), 250 ng/mL, u 100  $\mu$ L 0.1 M PBS, preko noći, na sobnoj temperaturi. Tijekom ove, kao i svih sljedećih inkubacija pločica je bila prekrivena parafinskim filmom (ParafilmM; Pechiney Plastic Packaging, Inc., Neenah (WI), SAD). Pločicu sam nakon toga 3 puta oprao u puferu za pranje (0.05% Tween-20 (SIGMA-Aldrich Corp.) u 0.1 M PBS) te potom zapriječio nespecifično vezivanje bjelančevina inkubacijom zdenaca s 0.1% goveđeg serumskog albumina (BSA; prema engl. *bovine serum albumin*) (SIGMA-Aldrich Corp.) i 5% saharoze u 0.1 M PBS, tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi, uz miješanje. Pločicu sam opet oprao 3 puta u puferu za pranje. Standardne koncentracije mišjeg OPG-a sam priredio serijskim razrjeđivanjem rekombinantnog mišjeg OPG (rmOPG/Fc chimera; R&D Systems Europe), u rasponu 4 ng/mL do 31.25 pg/mL, u puferu za razrjeđivanje (0.1% BSA u 0.1M PBS). Za pozitivnu kontrolu mi je poslužio nadtalog besmrtne stanične linije mišjih kalvarijskih osteoblasta MC3T3-E1, sub-klon 14, pasaža 16. Po 100  $\mu$ L otopine serijski razrjeđenog mišjeg OPG-a, te uzorke iz pokusa serijski razrjeđene u rasponu 1:1 do 1:16 nanio sam u duplikatu i inkubirao na sobnoj temperaturi tijekom 2 sata, uz miješanje. Pločicu sam oprao tri puta po 5 min puferom za pranje i u zdence dodao biotinizirano kozje protutijelo na mišji OPG (R&D Systems Europe), u koncentraciji 100 ng/mL, u 100  $\mu$ L pufera za razrjeđivanje. Nakon dva sata inkubacije na sobnoj temperaturi, uz miješanje, zdence sam oprao puferom za pranje, tri puta po 5 min. U zdence sam potom dodao otopinu (1:200 u puferu za razrjeđivanje) streptavidina konjugiranog s peroksidazom hrena (Streptavidin-HRP; R&D Systems Europe) te inkubirao 20 min na sobnoj temperaturi uz miješanje. Pločicu sam opet oprao tri puta po 5 min puferom za pranje te dodao otopinu za razvijanje boje (Substrate reagent pack; R&D Systems Europe). Boju sam razvijao na sobnoj temperaturi, u mraku, uz povremeno provjeravanje boje u zdencima. Reakciju sam zaustavio dodavanjem 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> te odredio apsorbanciju pri 450 nm, uz popravku na

540 nm, na spektrofotometru za mikrotitarske pločice. Koncentracija OPG u uzorcima prikazana je relativno, u odnosu na 1 µg ukupnih bjelančevina.

#### 4.7. Stanična kultura

Jednostaničnu suspenziju koštane srži pripremio sam slično kao za potrebe protočne citometrije, osim što su kosti ispuhane s pomoću hranjivog medija  $\alpha$ -MEM. Stanice su potom dva puta oprane u mediju  $\alpha$ -MEM te resuspendirane u mediju  $\alpha$ -MEM s 10% fetalnog telećeg seruma (FCS; prema engl. *fetal calf serum*; HyClone, Logan (UT), SAD). Stanice sam izbrojao u 0.05%-tnom tripanskom modrilu s pomoću Bürker-Türkove komorice.

Za uzgoj kolonija fibro-osteoblastne stanične loze, stanice koštane srži sam zasijao u pločice sa 6 zdenca (Corning-Costar Corp., Cambridge (MA), SAD), u gustoći  $10 \times 10^6$  stanica po zdencu, u hranjivom mediju  $\alpha$ -MEM s 10% FCS te dodatkom 100 U/mL penicilina (Gibco BRL) i 100 U/mL streptomicina (Gibco BRL). Od svake sam pokusne skupine zasijao po tri zdenca. Stanične kulture su uzgajane na 37 °C u ovlaženom zraku s 5% CO<sub>2</sub>. Medij sam stanicama zamijenio treći dan kulture. Za poticanje sazrijevanja osteoblasta te stvaranja ovapnjenja, šesti dan kulture sam u medij dodao 50 µg/mL askorbinske kiseline (Sigma-Aldrich Corp.),  $10^{-8}$  M deksametazona (Sigma-Aldrich Corp.) te 8 mM  $\beta$ -glicerofosfata (Sigma-Aldrich Corp.). Medij sam od tada mijenjao svaki drugi dan. Četrnaesti dan sam kolonije stromalnih stanica usmjerene prema osteoblastnoj liniji dokazao histokemijskim bojanjem enzima alkalne fosfataze. Stanice sam najprije fiksirao s pomoću 2%-tnog paraformaldehida (Sigma-Aldrich Corp.) u 0.1 M PBS-u, tijekom 10 min na sobnoj temperaturi, a potom obojao kemikalijama za enzimsku histokemiju (Alkaline phosphatase, leukocyte kit; Sigma-Aldrich Corp.) tijekom 30 min na sobnoj temperaturi, u tami, a u skladu s nuputcima proizvođača. Stanične kolonije sam potom prebrojao s koristeći invertni svjetlosni mikroskop.

Za uzgoj osteoklastnih kolonija, stanice koštane srži sam zasijao u pločice s 48 zdenaca (Corning-Costar Corp.), u gustoći  $0.5 \times 10^6$  stanica po zdencu. Stanice sam uzgajao u hranjivom mediju  $\alpha$ -MEM s dodatkom 10% FCS, 100 U/mL penicilina i 100 U/mL streptomicina, na 37 °C u ovlaženom zraku s 5% CO<sub>2</sub>.

Kako bih potakao razvoj stanica osteoklastne loze, u medij sam, osim toga, dodao 15 ng/mL rekombinantnog mišjeg RANK-L (Amgen, Seattle (WA), SAD) i 15 ng/mL rekombinantnog mišjeg M-CSF (R&D Systems Europe). Od svake sam pokusne skupine zasijao po šest zdenaca. Medij sam stanicama zamijenio nakon tri i pol dana kulture. Sedmi dan sam stanice s osteoklastnim fenotipom dokazao histokemijskim bojanjem enzima kisele fosfataze otporne na tartarat. Najprije sam stanice fiksirao s pomoću 2.5%-tnog glutaraldehida otopljenog u puferu PBS, tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi, a potom ih obojao kemikalijama za enzimsku histokemiju (Leukocyte acid phosphatase kit; Sigma-Aldrich Corp.) tijekom 60 min, na +37 °C, a u skladu s naputcima proizvođača. Osteoklastima sam smatrao crvenkasto-ljubičasto obojane stanice s 4 ili više jezgara, a izbrojao sam ih koristeći invertni svjetlosni mikroskop.

#### **4.8. Reakcija pomiješanih limfocita**

Aloreaktivnost između mišjih sojeva B6 i *gld* provjerio sam reakcijom pomiješanih limfocita iz slezene. Kao pozitivnu kontrolu alogeničnog podražaja koristio sam životinje soja CBA. Najprije sam pripremio jednostanične suspenzije limfnih čvorova, na način koji je opisan u odjeljku 4.4., uz napomenu da sam za reakciju pomiješanih limfocita koristio hranjivi medij RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island (NY), SAD), s 10% FCS, 100 U/mL penicilina, 100 U/mL streptomicina te uz dodatak  $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -merkaptetanola. Stanice koje su služile za poticanje reakcije (engl. *stimulator cells*) najprije sam obradio mitomicinom C (SIGMA-Aldrich Corp., Milwaukee (MI), SAD), inkubirajući stanice u koncentraciji  $50 \times 10^6$  stanica/mL tijekom 20 min s 5  $\mu$ g/mL mitomicina, na 37 °C. Po završetku inkubacije, stanice su tri puta oprane medijem. Stanice za poticanje, kao i stanice koje će odgovoriti (engl. *responder cells*), sam potom zasijao u plastične pločice za kuturu stanica s 96 zdenaca, zaobljenog dna (Costar, Cambridge (MA), USA) i to po  $5 \times 10^5$  potičućih i odgovarajućih stanica po zdencu, u 200  $\mu$ L medija. Stanice su uzgajane na temperaturi 37 °C u ovlaženom zraku s 5% CO<sub>2</sub> tijekom 72 sata. Stupanj stanične proliferacije sam odredio kolorimetrijskim postupkom s pomoću spoja 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid (MTT)<sup>310</sup> (SIGMA-Aldrich



Corp.). Nakon trodnevnog kultiviranja u zdence sam dodao 20  $\mu$ L otopine MTT (5 mg/mL). Pošto sam dodao MTT, suspenzije sam inkubirao tijekom 4 sata na 37 °C, a zatim pločice centrifugirao te odlio nadtaloge. Kristali formazana su nakon toga otopljeni dodavanjem 200  $\mu$ L dimetil-sulfoksida (SIGMA-Aldrich Corp.) po zdencu, a intenzitet ljubičaste boje nastale otopine određen je spektrofotometrijski, spektrofotometrom za mikrotitarske pločice. Intenzitet boje očitao je na valnoj dužini od 570 nm, uz pozadinsko očitavanje na valnoj dužini od 630 nm.

#### **4.9. Statistička analiza**

Zbog velike biološke varijabilnosti svojstvene miševima soja *gld*<sup>245,251,311</sup> u priložima je prikazan reprezentativni pokus, a u ponovljenim pokusima su razlike između skupina bile uvijek u istom smjeru. Broj ponavljanja pojedinog pokusa naveden je uz odgovarajuće rezultate. Ishod protočnociometrijske analize prikazao sam udjelom dvostruko negativnih limfocita T u ukupnoj populaciji živih stanica te aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom za ponovljene pokuse. Rezultate reakcije miješanih limfocita, stanične kulture te postupaka qPCR i ELISA sam prikazao s pomoću aritmetičke sredine i standardne devijacije, za uzroke u multiplikatu. Kako bih olakšao uspoređivanje različitih vremenskih točaka, rezultate ispitivanja genskog i bjelančevinskog izražaja sam dodatno prikazao i relativno, u odnosu na skupinu miševa divljeg tipa koji su bili u parabiozi s miševima divljeg tipa. Kvalitativno sam tumačio rezultate reakcije pomiješanih limfocita te rezultate postupaka qPCR i ELISA za miševe koji su bili u parabiozi. Ostale sam rezultate tumačio kvantitativno, s pomoću sljedećih statističkih postupaka: analizu razlika između dvije skupine testirao sam Studentovim t-testom, a između četiri skupine analizom varijance te *post hoc* testom Student-Newman-Keuls. Pri testiranju je kao značajna priznata samo ona razlika na razini  $P < 0.05$ .

## 5. REZULTATI

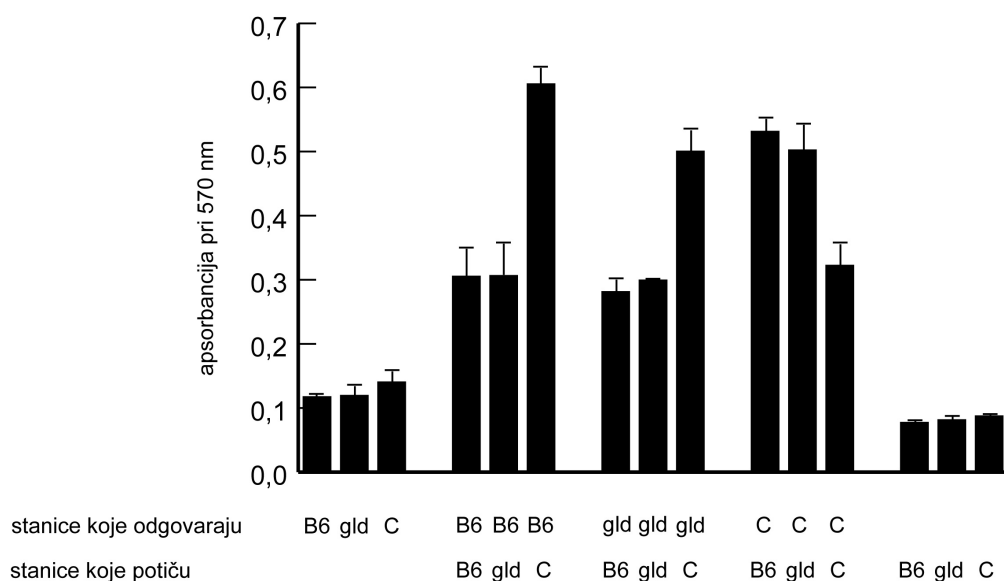
### 5.1. Provjera aloreaktivnosti između mišjih sojeva

Prije samog provođenja pokusa koji uključuju parabiozu bilo mi je važno provjeriti hoće li između životinja soja C57BL/6 i životinja soja *gld* doći do alogenične reakcije. Kako bih to utvrdio, poslužio sam se reakcijom pomiješanih limfocita pri kojoj limfociti jednog soja, zakočeni mitomicinom C, potiču proliferaciju limfocita drugog mišjeg soja. Kao pozitivnu kontrolu odabrao sam miševe soja CBA koji su alogenični s mišjim sojem C57BL/6<sup>312</sup>.

Proliferacija stanica slezene miševa soja C57BL/6 bila je približno jednaka nakon poticanja sa stanicama slezene miševa soja C57BL/6 kao i miševa soja *gld* (slika 6). Taj rezultat nije bio različit od rezultata postignutog kada smo stanice slezene miševa soja *gld* potaknuli s pomoću stanica slezene miševa soja C57BL/6 ili miševa soja *gld*. Nasuprot tome, splenociti sojeva C57BL/6 i *gld* burno su proliferirali nakon poticanja stanicama soja CBA. Na temelju ovih nalaza smo zaključili da nakon parabiotskog spajanja miševa soja C57BL/6 i miševa soja *gld* ne očekujemo pojavu aloreaktivnosti. Takav nalaz omogućio je početak pokusa s parabiozom.

### 5.2. Učinak parabioze na imunofenotip

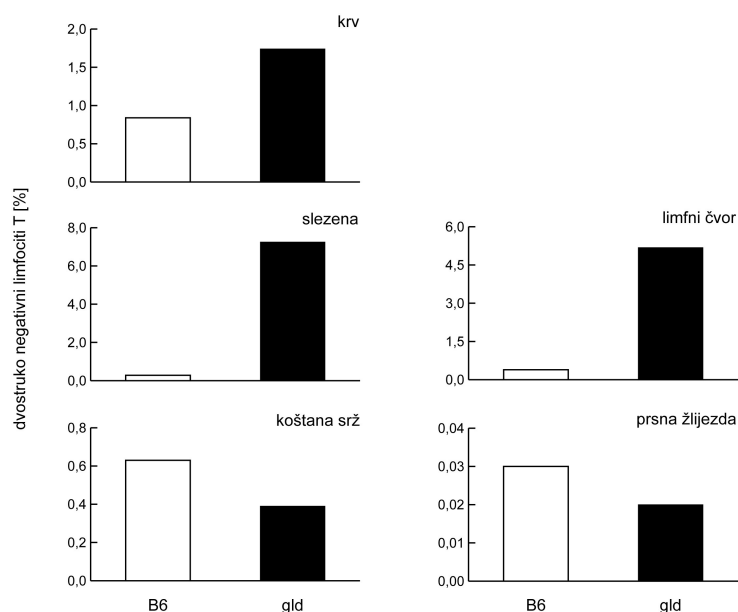
Prvim nizom pokusa željeli smo pokazati hoće li tijekom parabioze doći do promjene imunofenotipa životinja spojenih u par. Pri tomu smo kao pokazatelje promjena u imunom sustavu odabrali dvostruko negativne limfocite T (tj. CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>). Dvostruko negativni limfociti T postoje i u limfnim tkivima neoperiranih miševa soja C57BL/6, no njihov je udio u slezeni neoperiranih miševa soja *gld* bio 25 puta veći, a u limfnim čvorovima 13 puta veći nego u istim tkivima miševa soja C57BL/6 (slika 7). Iako bi se na prvi pogled moglo zaključiti da u koštanoj srži i timusu miševa soja C57BL/6 ima više dvostruko negativnih limfocita T, valja uočiti da je riječ o izuzetno malim apsolutnim brojevima koji su osjetljivi na varijacije.



**Slika 6.** Provjera aloreaktivnosti mišjih sojeva C57BL/6 i gld s pomoću reakcije miješanih limfocita. Alorektivnost limfocita miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) (haplotip: H-2<sup>b</sup>) i miševa soja gld provjerena je s pomoću jednostaničnih suspenzija slezene. Stanice koje potiču reakciju obrađene su mitomicinom (5 µg/mL) te su, zajedno sa stanicama koje odgovaraju uzgojene u koncentraciji 5×10<sup>5</sup> stanica/mL tijekom 72 h. Stanična proliferacija je procijenjena inkubiranjem stanica sa spojem MTT te otapanjem nastalih kristala MTT-a u dimetil sulfoksidu. Stupci prikazuju srednju vrijednosti (± standardna devijacija) apsorbancije izmjerene pri 570 nm, uz pozadinsko očitavanje na 630 nm, za uzorke u triplicatu. Kao pozitivna kontrola korišten je mišji soj CBA (C) (haplotip: H-2<sup>k</sup>). Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.

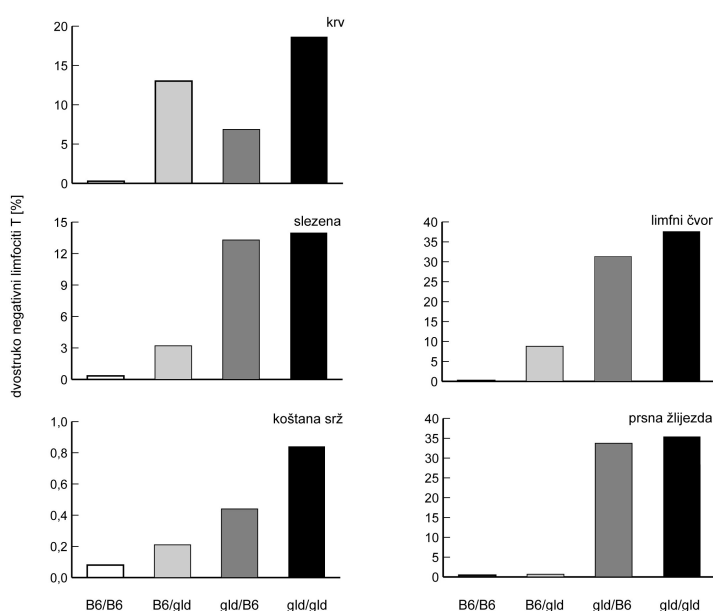
Već smo tjedan dana nakon parabioze opazili porast udjela dvostruko negativnih limfocita T u tkivima miševa soja C57BL/6 koji su bili spojeni s miševima soja gld (oznaka skupine: B6/gld), u odnosu na miševe soja C57BL/6 koji su bili spojeni s miševima soja C57BL/6 (oznaka skupine: B6/B6) (slika 8 i tablice 1-5). Primjerice, udio dvostruko negativnih limfocita T u slezeni miševa skupine B6/gld bio je dvanaest puta veći no u slezenama miševa skupine B6/B6: 3.86 ± 0.91% u B6/gld prema 0.33 ± 0.01 % u skupini B6/B6 (aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD) za pokus ponavljen dva puta). U limfnim čvorovima pak, razlika je bila još veća – udio dvostruko negativnih limfocita T u

čvorovima skupine B6/*gld* bio je čak 34 puta veći no u skupine B6/B6:  $8.49 \pm 0.45$  % u B6/*gld* prema  $0.26 \pm 0.06$  % u B6/B6. Promjene su bile uočljive u svim analiziranim tkivima osim prsne žlijezde, a rezultat protočnociometrijske analize prikazan je na slici 9. Slika je ishod dvostrukog ograđivanja, pri čemu su prvo odabrane žive stanice, a onda među njima stanice koje izražavaju biljege CD3 i B220, da bi na koncu bio prikazan izražaj biljega CD8 i CD4. Osim toga, u krvi, koštanoj srži i limfnim čvorovima životinja soja *gld* koje su bile u parabiozi s miševima soja C57BL/6 (oznaka skupine: *gld*/B6) udio dvostruko negativnih limfocita T bio je manji nego u istim organima životinja soja *gld* koje su bile spojene s miševima soja *gld* (oznaka skupine: *gld*/*gld*) (slika 8).

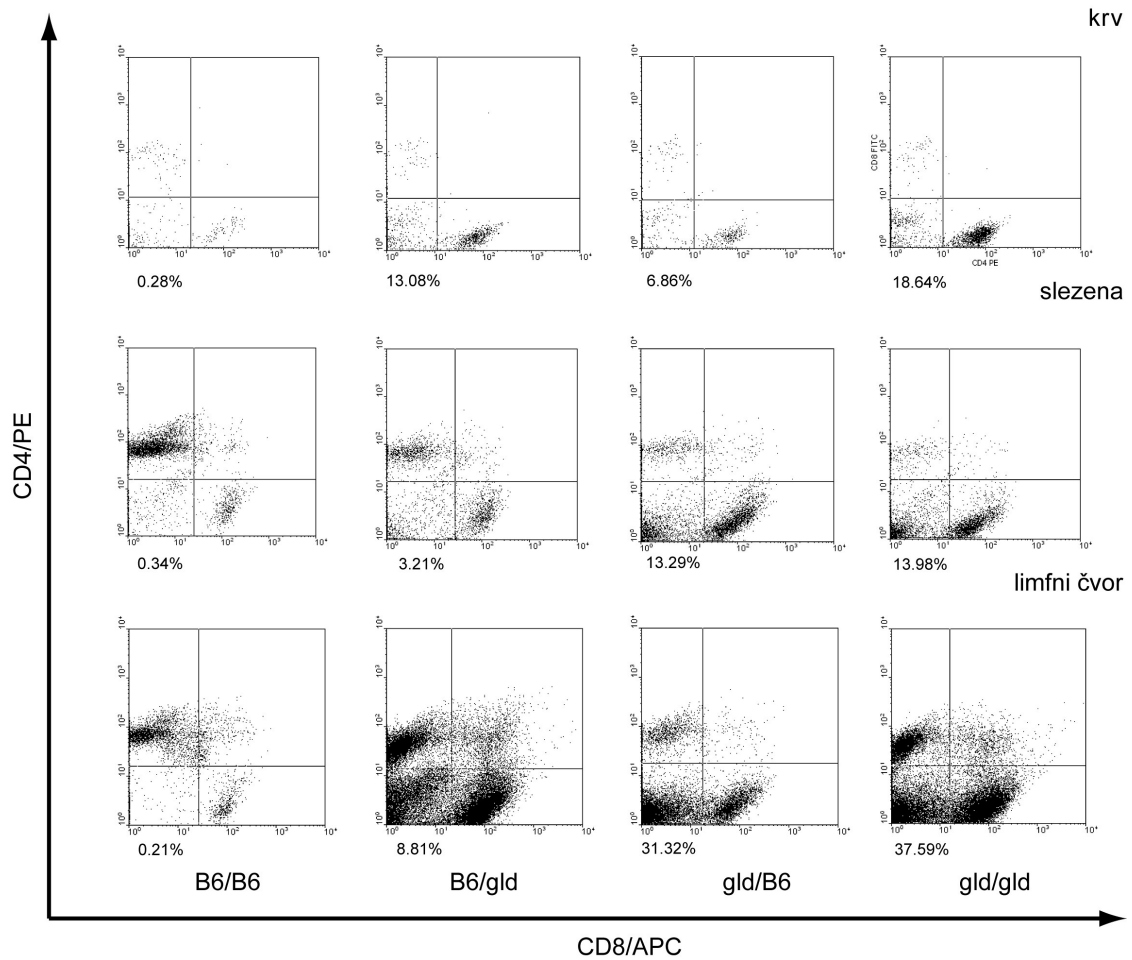


**Slika 7.** Udio dvostruko negativnih limfocita T ( $CD3^+CD4^-CD8^-B220^+$ ) u limfnim tkivima miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševima soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva pet životinja istog soja. Jednostanične tkivne suspenzije ( $1 \times 10^6$  stanica) su obilježene sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-B220, te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog uzorka je za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Stupci prikazuju udjele dvostruko negativnih limfocita T u tkivima.

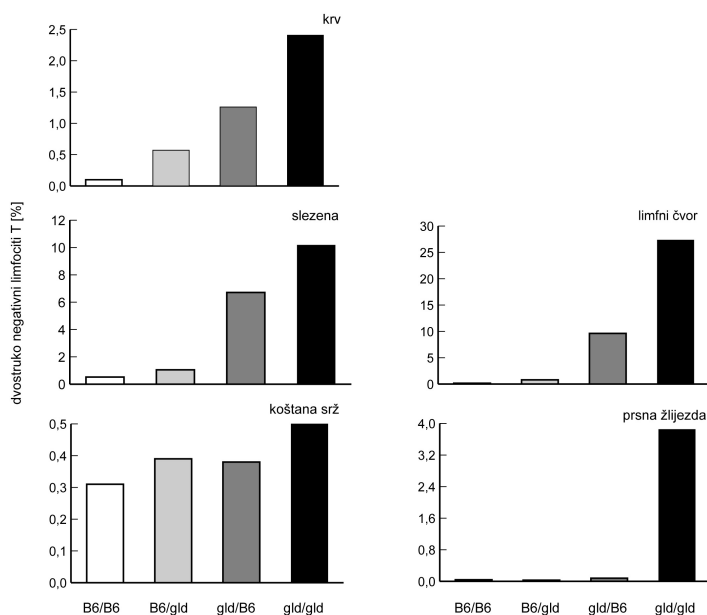
Približavanje imunofenotipa parabiotiski spojenih miševa sojeva C57BL/6 i *gld* nastavilo se i krajem drugog tjedna (slika 10 i tablice 1-5). Posebno je bilo uočljivo smanjenje udjela dvostruko negativnih limfocita T u tkivima miševa skupine *gld/B6*. Udio dvostruko negativnih limfocita T u slezeni miševa *gld/B6* bio je za petinu manji no u miševa skupine *gld/gld*:  $8.45 \pm 2.49$  % u *gld/B6*, te  $10.18 \pm 4.00$  % u *gld/gld* (aritmetička sredina  $\pm$  SD za pokus ponovljen dva puta). U limfnim čvorovima miševa skupine *gld/B6* bilo je 30% manje dvostruko negativnih limfocita T u usporedbi s čvorovima skupine *gld/gld*:  $19.69 \pm 14.24$  % u *gld/B6* prema  $27.35 \pm 10.00$  % u *gld/gld*.



**Slika 8.** Udio dvostruko negativnih limfocita T ( $CD3^+CD4^-CD8^-B220^+$ ) u limfnim tkivima miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld* tjedan dana nakon parabioze. B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/gld: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; gld/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; gld/gld: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije ( $1 \times 10^6$  stanica) obilježene su sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-B220, te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog je uzorka za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Stupci prikazuju udjele dvostruko negativnih limfocita T u tkivima. Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.

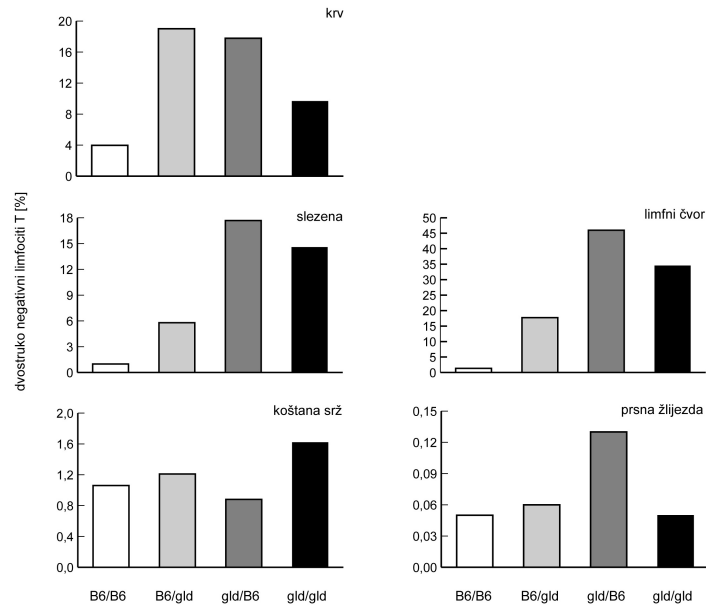


**Slika 9.** Protočnociometrijska analiza krvi, slezene i limfnih čvorova miševa divljeg tipa (*C57BL/6*; B6) i miševa soja *gld*, tjedan dana nakon parabioze. B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/*gld*: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld*/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; *gld*/*gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije ( $1 \times 10^6$  stanica) obilježene su sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-B220, te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog je uzorka za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Točkasti grafikoni raščlanjuju odnos izražaja fluorescencije biljega CD8-alofikocijanin (APC) i CD4-fikoeritrin (PE) u onoj populaciji živih stanica koje su izražavale i biljeg CD3 i biljeg B220. Broj uz ishodište koordinatnih osi označava udio stanica u donjem lijevom kvadrantu među svim živim stanicama. Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.



**Slika 10.** Udio dvostruko negativnih limfocita T ( $CD3^+CD4^-CD8^-B220^+$ ) u limfnim tkivima miševa divljeg tipa (*C57BL/6*; *B6*) i miševa soja *gld* dva tjedna nakon parabioze. *B6/B6*: miš soja *B6* koji je bio u parabiozi s mišem soja *B6*; *B6/gld*: miš soja *B6* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld/B6*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *B6*; *gld/gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije ( $1 \times 10^6$  stanica) obilježene su sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti- $CD3$ , anti- $CD4$ , anti- $CD8$  i anti- $B220$ , te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog uzorka je za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Stupci prikazuju udjele dvostruko negativnih limfocita T u tkivima. Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.

Treći tjedan nakon operacije (slika 11 i tablice 1-5) prosječni su udjeli dvostruko negativnih limfocita T u limfnim organima miševa skupine *B6/gld* bili slični onima u prvom tjednu:  $3.45 \pm 3.30$  % u slezeni, odnosno  $9.94 \pm 11.02$  % (aritmetička sredina  $\pm$  SD za pokus ponovljen dva puta) u limfnim čvorovima. Drugim riječima, u slezeni miševa skupine *B6/gld* bilo je 7 puta, a u limfnim čvorovima 14 puta više dvostruko negativnih limfocita T nego u istim organima miševa skupine *B6/B6*. Zanimljivo, u skupini *gld/B6* udio dvostruko negativnih limfocita T je u svim tkivima, osim koštane srži, premašio vrijednosti u skupini *gld/gld* (slika 11).

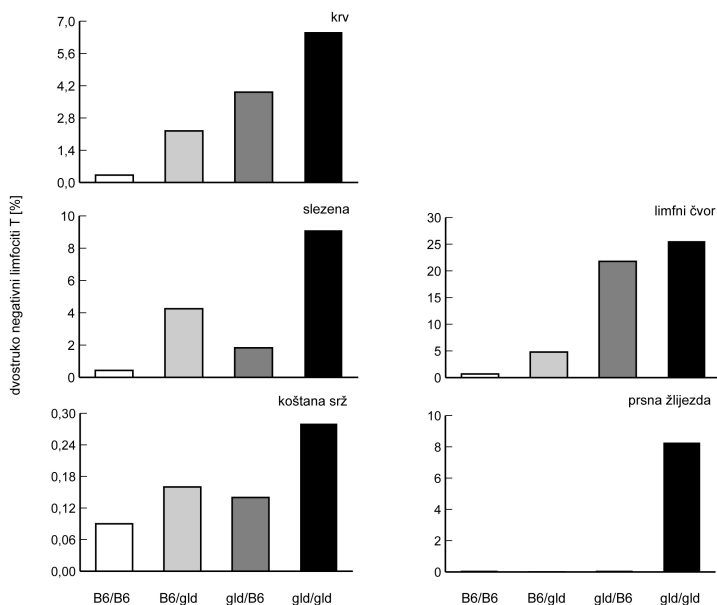


**Slika 11.** Udio dvostruko negativnih limfocita T ( $CD3^+CD4^-CD8^-B220^+$ ) u limfnim tkivima miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld* tri tjedna nakon parabioze. B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/*gld*: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld*/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; *gld*/*gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije ( $1 \times 10^6$  stanica) su obilježene sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-B220, te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog uzorka je za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Stupci prikazuju udjele dvostruko negativnih limfocita T u tkivima. Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.

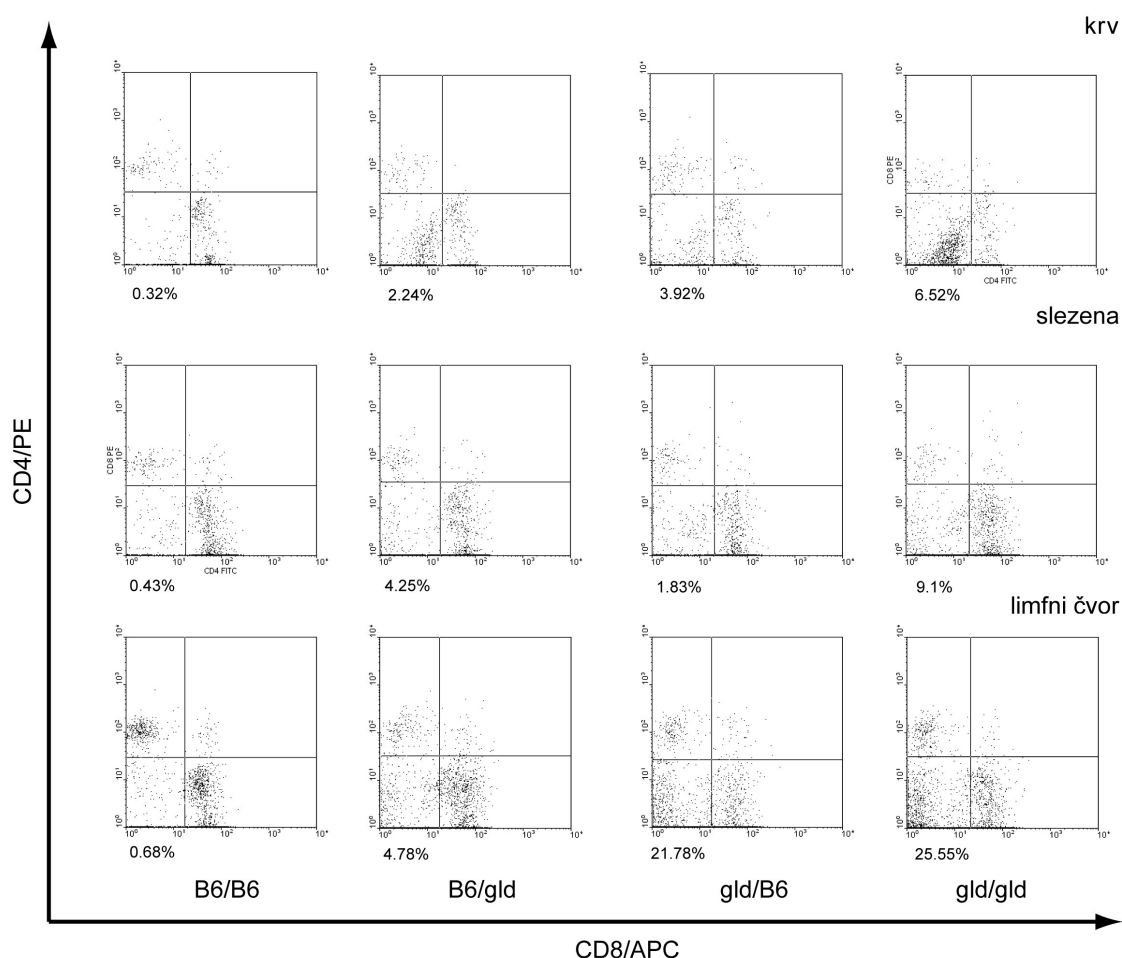
Stanje u limfnim organima miševa skupine B6/*gld* na kraju prvog mjeseca (slika 12 i tablice 1-5) slijedilo je obrazac prethodnih tjedana: u usporedbi sa skupinom B6/B6 imali su 3 puta više dvostruko negativnih limfocita T u slezeni ( $3.52 \pm 1.03$  % u miševa B6/*gld* prema  $1.14 \pm 1.00$  % u miševa B6/B6; aritmetička sredina  $\pm$  SD za pokus ponovljen dva puta), a 7 puta više dvostruko negativnih limfocita T u limfnim čvorovima ( $2.50 \pm 2.48$  % u miševa B6/*gld* prema  $0.36 \pm 0.10$  % u miševa B6/B6). Nasuprot tome, udio dvostruko negativnih limfocita T u limfnim organima miševa skupine *gld*/B6 se znatno smanjio u odnosu na prethodne tjedne (slika 12). U slezeni su prosječno imali 75% dvostruko negativnih limfocita T manje od miševa skupine *gld*/*gld* ( $2.99 \pm 1.64$ % u skupini *gld*/B6, a  $11.31 \pm 3.13$  % u skupini *gld*/*gld*), dok su u limfnim čvorovima imali 85% dvostruko negativnih limfocita T manje u odnosu na skupinu *gld*/*gld*



( $1.90 \pm 0.09\%$  u *gld/B6* te  $11.23 \pm 3.01\%$  u *gld/gld*). Rezultati protočnociometrijske analize krvi, slezene i limfnih čvorova prikazani su na slici 13.

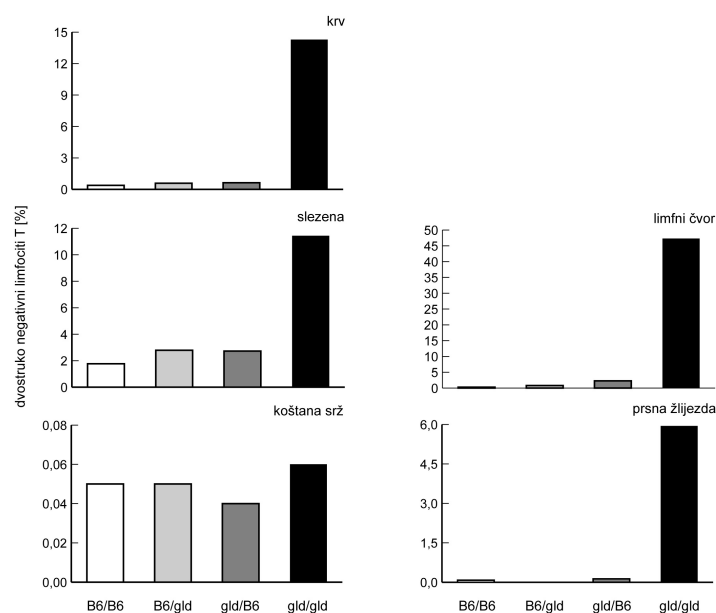


**Slika 12.** Udio dvostruko negativnih limfocita T ( $CD3^+CD4^-CD8^-B220^+$ ) u limfnim tkivima miševa divljeg tipa (*C57BL/6*; *B6*) i miševa soja *gld* četiri tjedna nakon parabioze. *B6/B6*: miš soja *B6* koji je bio u parabiozi s mišem soja *B6*; *B6/gld*: miš soja *B6* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld/B6*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *B6*; *gld/gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije ( $1 \times 10^6$  stanica) su obilježene sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti- $CD3$ , anti- $CD4$ , anti- $CD8$  i anti- $B220$ , te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog uzorka je za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Stupci prikazuju udjele dvostruko negativnih limfocita T u tkivima. Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.



**Slika 13.** Protočnometrijska analiza krvi, slezene i limfnih čvorova miševa divljeg tipa (*C57BL/6*; *B6*) i miševa soja *gld*, nakon četiri tjedna parabioze. *B6/B6*: miš soja *B6* koji je bio u parabiozi s mišem soja *B6*; *B6/gld*: miš soja *B6* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld/B6*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *B6*; *gld/gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije ( $1 \times 10^6$  stanica) obilježene su sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-B220, te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog je uzorka za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Točkasti grafikoni raščlanjuju odnos izražaja fluorescencije biljega CD8-alofikocijanin (APC) i CD4-fikoeritrin (PE) u onoj populaciji živih stanica koje su izražavale i biljeg CD3 i biljeg B220. Broj uz ishodište koordinatnih osi označava udio stanica u donjem lijevom kvadrantu među svim živim stanicama. Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.

Kao posljednji pokus u ovom nizu, rastavio sam miševe koji su mjesec dana živjeli u parabiozi te ih žrtvovao nakon dva tjedna odvojenog života. U skladu s našim predviđanjem, udjeli dvostruko negativnih limfocita T u tkivima životinja skupine B6/*gld* približili su se k vrijednostima u miševa skupine B6/B6, odnosno u neoperiranim životinjama (slike 7 i 14, tablice 1-5). No, suprotno očekivanju, u miševa skupine *gld*/B6 udjeli dvostruko negativnih limfocita T bili su vidljivo smanjeni i usporedivi s nalazom u životinja skupine B6/B6 (slika 9).



**Slika 14.** Udio dvostruko negativnih limfocita T ( $CD3^+CD4^-CD8^-B220^+$ ) u limfnim tkivima miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld* nakon četiri tjedna parabioze i dva tjedna odvojena života. B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/*gld*: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld*/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; *gld*/*gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije ( $1 \times 10^6$  stanica) su obilježene sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-B220, te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog uzorka je za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Stupci prikazuju udjele dvostruko negativnih limfocita T u tkivima.

Mogli smo, dakle, zaključiti da je tijekom parabioze došlo do vrlo brzog približavanja imunofenotipa spojenih životinja: u miševa divljeg tipa se broj dvostruko negativnih limfocita T povećao, dok se u miševa soja *gld* smanjio. Parabiozom smo također uspjeli postići ublažavanje limfoproliferacije u miševa soja *gld* koja se održala dva tjedna nakon rastavljanja životinja. To nas je ohrabrilo da u sljedećem koraku istražimo koštane posljedice imunskih promjena.

**Tablica 1.** *Prosječni udio (aritmetička sredina ± standardna devijacija) dvostruko negativnih limfocita T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>) u krvi nakon parabiotskog spajanja miševa divljeg tipa (C57BL/6) i miševa soja *gld*.\**

Skupina	Trajanje parabioze				
	1 tjedan	2 tjedna	3 tjedna <sup>†</sup>	4 tjedna	4 tjedna + 2 tjedna rastavljeno <sup>†</sup>
B6/B6	0.81 ± 0.75	0.35 ± 0.35	3.97	0.21 ± 0.15	0.38
B6/ <i>gld</i>	7.96 ± 7.16	1.36 ± 1.12	19.01	1.38 ± 1.21	0.59
<i>gld</i> /B6	5.48 ± 1.95	2.85 ± 2.24	17.78	2.71 ± 1.71	0.63
<i>gld</i> / <i>gld</i>	13.69 ± 7.00	2.41 ± 1.21	9.66	5.23 ± 1.82	14.28

\*Objašnjenje kratica – B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/*gld*: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld*/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; *gld*/*gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije (1×10<sup>6</sup> stanica) obilježene su sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-B220, te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog je uzorka za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Rezultati su oblikovani združivanjem dva ponovljena pokusa. <sup>†</sup>Rezultati jednog pokusa.

**Tablica 2.** *Prosječni udio (aritmetička sredina ± standardna devijacija) dvostruko negativnih limfocita T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>) u slezeni nakon parabiotskog spajanja miševa divljeg tipa (C57BL/6) i miševa soja *gld*.\**

Skupina	Trajanje parabioze				
	1 tjedan	2 tjedna	3 tjedna	4 tjedna	4 tjedna + 2 tjedna rastavljeno <sup>†</sup>
B6/B6	0.33 ± 0.01	0.37 ± 0.21	0.56 ± 0.60	1.14 ± 1.00	1.77
B6/ <i>gld</i>	3.86 ± 0.92	1.80 ± 1.06	3.46 ± 3.30	3.52 ± 1.03	2.79
<i>gld</i> /B6	10.38 ± 4.12	8.48 ± 2.50	10.73 ± 9.82	2.99 ± 1.64	2.73
<i>gld</i> / <i>gld</i>	9.72 ± 6.03	10.18 ± 4.00	9.27 ± 7.50	11.31 ± 3.13	11.43

\*Objašnjenje kratica – B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/*gld*: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld*/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; *gld*/*gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije (1×10<sup>6</sup> stanica) obilježene su sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-B220, te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog je uzorka za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Rezultati su oblikovani združivanjem dva ponovljena pokusa. <sup>†</sup>Rezultati jednog pokusa.

**Tablica 3.** *Prosječni udio (aritmetička sredina ± standardna devijacija) dvostruko negativnih limfocita T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>) u limfnim čvorovima nakon parabiotskog spajanja miševa divljeg tipa (C57BL/6) i miševa soja gld.\**

Skupina	Trajanje parabioze				
	1 tjedan	2 tjedna	3 tjedna	4 tjedna	4 tjedna + 2 tjedna rastavljeno <sup>†</sup>
B6/B6	0.26 ± 0.06	0.26 ± 0.13	0.77 ± 0.83	0.36 ± 0.10	0.30
B6/gld	8.49 ± 0.45	2.11 ± 1.85	9.94 ± 11.02	2.50 ± 2.48	0.81
gld/B6	27.85 ± 4.91	19.69 ± 14.24	27.83 ± 25.65	1.90 ± 0.09	2.27
gld/gld	30.23 ± 10.40	27.35 ± 10.00	22.21 ± 17.38	11.23 ± 3.01	47.42

\*Objašnjenje kratica – B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/gld: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; gld/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; gld/gld: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije (1×10<sup>6</sup> stanica) obilježene su sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-B220, te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog je uzorka za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Rezultati su oblikovani združivanjem dva ponovljena pokusa. <sup>†</sup>Rezultati jednog pokusa.

**Tablica 4.** *Prosječni udio (aritmetička sredina ± standardna devijacija) dvostruko negativnih limfocita T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>) u koštanoj srži nakon parabiotskog spajanja miševa divljeg tipa (C57BL/6) i miševa soja gld.\**

Skupina	Trajanje parabioze				
	1 tjedan	2 tjedna	3 tjedna	4 tjedna	4 tjedna + 2 tjedna rastavljeno <sup>†</sup>
B6/B6	0.12 ± 0.05	0.18 ± 0.19	0.55 ± 0.73	0.08 ± 0.01	0.05
B6/gld	0.26 ± 0.06	0.22 ± 0.24	0.62 ± 0.83	0.13 ± 0.04	0.05
gld/B6	0.39 ± 0.08	0.24 ± 0.21	0.47 ± 0.59	0.12 ± 0.03	0.04
gld/gld	0.54 ± 0.42	0.50 ± 0.23	0.83 ± 1.11	0.19 ± 0.13	0.06

\*Objašnjenje kratica – B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/gld: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; gld/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; gld/gld: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije (1×10<sup>6</sup> stanica) obilježene su sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-B220, te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog je uzorka za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Rezultati su oblikovani združivanjem dva ponovljena pokusa. <sup>†</sup>Rezultati jednog pokusa.

**Tablica 5.** Prosječni udio (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) dvostruko negativnih limfocita T ( $CD3^+CD4^-CD8^-B220^+$ ) u prsnoj žlijezdi nakon parabiotskog spajanja miševa divljeg tipa (C57BL/6) i miševa soja *gld*.\*

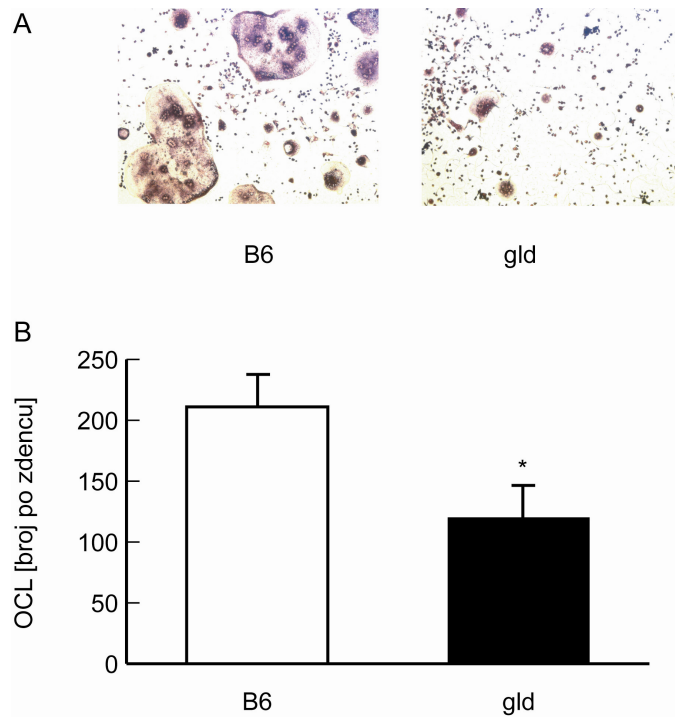
Skupina	Trajanje parabioze				
	1 tjedan	2 tjedna	3 tjedna <sup>†</sup>	4 tjedna	4 tjedna + 2 tjedna rastavljeno <sup>†</sup>
B6/B6	0.25 $\pm$ 0.25	0.11 $\pm$ 0.09	0.05	0.08 $\pm$ 0.01	0.08
B6/ <i>gld</i>	0.45 $\pm$ 0.34	0.02 $\pm$ 0.01	0.06	0.13 $\pm$ 0.04	0.02
<i>gld</i> /B6	32.26 $\pm$ 2.07	0.19 $\pm$ 0.016	0.13	0.12 $\pm$ 0.03	0.13
<i>gld</i> / <i>gld</i>	29.53 $\pm$ 8.30	3.85 $\pm$ 1.00	0.05	0.19 $\pm$ 0.13	5.94

\*Objašnjenje kratica – B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/*gld*: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld*/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; *gld*/*gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem tkiva šest životinja iste skupine. Jednostanične tkivne suspenzije ( $1 \times 10^6$  stanica) obilježene su sljedećim protutijelima, konjugiranim s prikladnim fluorescentnim bojama: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 i anti-B220, te analizirane s pomoću protočnog citometra. Od svakog je uzorka za analizu prikupljeno 50,000 događaja. Rezultati su oblikovani združivanjem dva ponovljena pokusa. <sup>†</sup>Rezultati jednog pokusa.

### 5.3. Učinak parabioze na osteoklastogenični potencijal koštane srži

Kako bismo odredili osteoklastogenični potencijal koštane srži, odlučili smo s pomoću histokemijskog bojanja prebrojati višejezgrene stanice koje izražavaju enzim TRAP (tzv. stanice nalik osteoklastima; OCL, prema engl. *osteoclast-like cell*), u staničnim kulturama pune koštane srži potaknutim rekombinantnim mišjim citokinima RANKL i M-CSF. Broj osteoklasta u kulturi stanica koštane srži neoperiranih životinja soja C57BL/6 i soja *gld* prikazan je na slici 15.

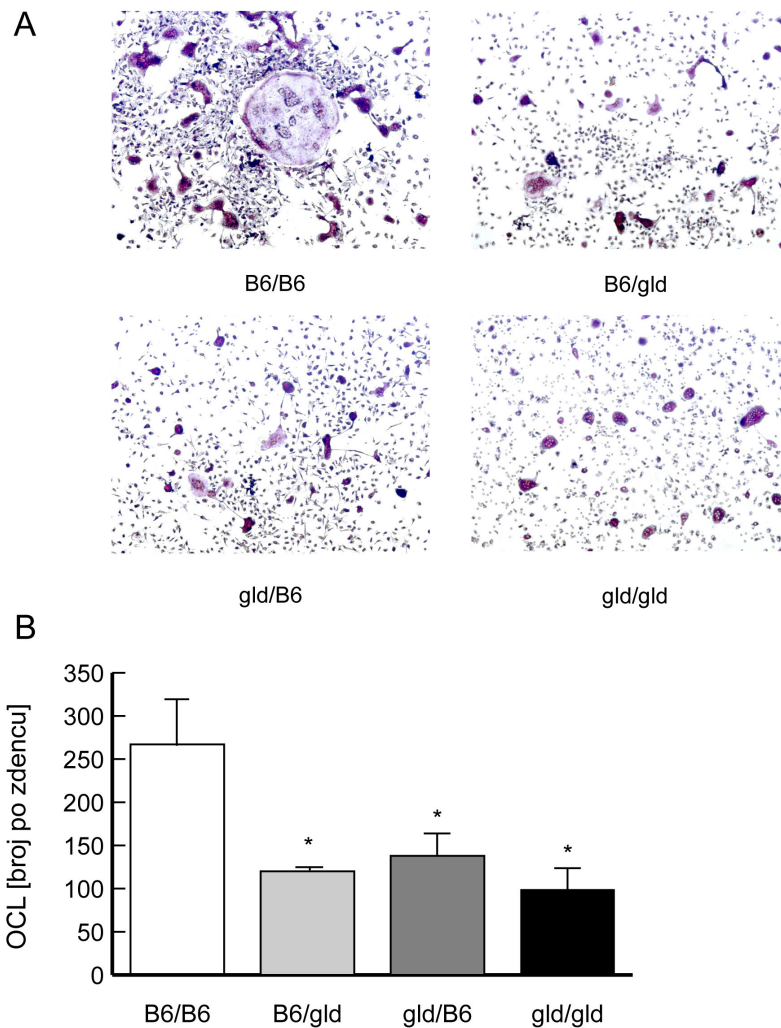
Odnos brojeva stanica OCL u koštanoj srži miševa u pokusu nije se značajno razlikovao na kraju prvog i četvrtog tjedna nakon operacije (slike 16 i 17). U obje vremenske točke je broj stanica OCL u kulturi pune koštane srži miševa skupine B6/*gld* bio statistički značajno niži od broja osteoklasta u kulturi koštane srži miševa skupine B6/B6 (ANOVA i *post hoc* test Student-Newman-Keuls,  $P < 0.05$ ). Drugim riječima, nije se značajno razlikovao od broja osteoklasta u kulturama koštane srži miševa skupine *gld*/B6, odnosno miševa skupine *gld*/*gld*.



**Slika 15.** Stanice nalik osteoklastima (OCL) u staničnoj kulturi koštane srži miševa divljeg tipa (*C57BL/6*; B6) i miševa soja *gld*. Uzorci su oblikovani združivanjem koštane srži pet životinja pojedinog soja. Stanice koštane srži zasijane su gustoći  $0.5 \times 10^6$  po zdencu uz dodatak 15 ng/mL RANKL i 15 ng/mL M-CSF. **A.** Stanice koje izražavaju kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP; prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*) (ljubičasta boja). Reprezentativna vidna polja stanične kulture pri povećanju mikroskopa  $100\times$ . **B.** Broj stanica u kulturi. Stupci prikazuju prosječan broj višejezgrenih stanica koje izražavaju TRAP po zdencu ( $\pm$  standardna devijacija) šestog dana od početka kulture, za uzorak u heksaplikatu. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu prema miševima soja B6 (Studentov t-test;  $P < 0.001$ ). Prikazan je reprezentativan pokus od tri ponavljanja.

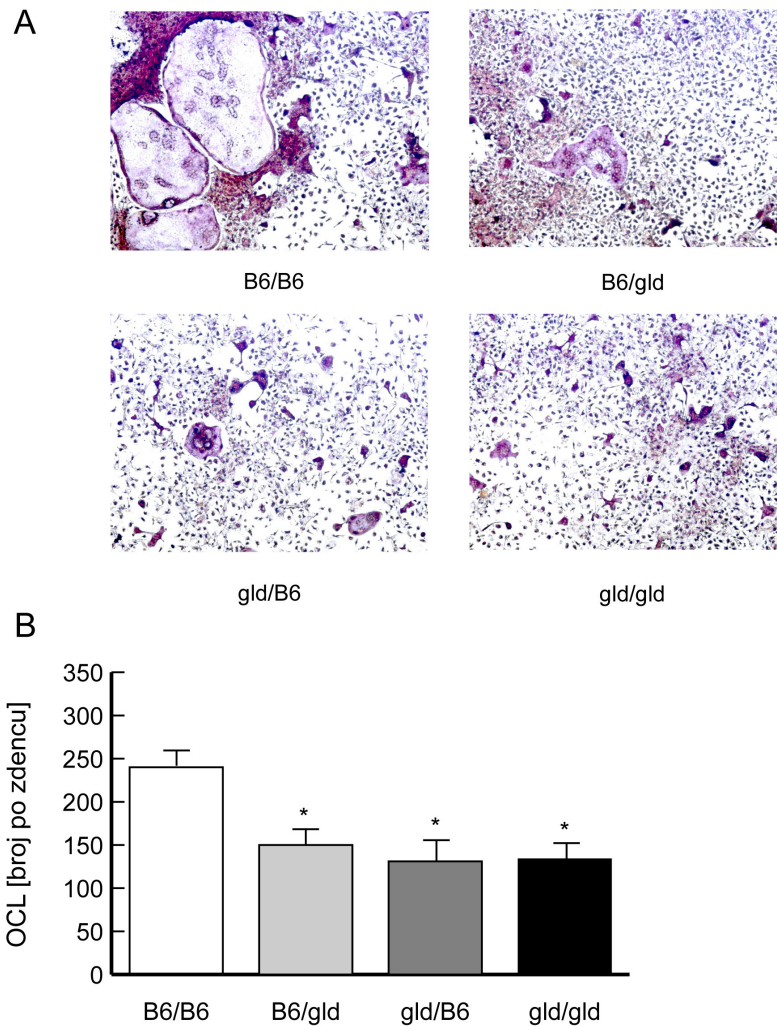
#### 5.4. Učinak parabioze na osteoblastogenični potencijal koštane srži

U istim vremenskim točkama, tjedan dana i četiri tjedna nakon operacije, provjerili smo i osteoblastogenični potencijal koštane srži tijekom parabioze. S tom smo svrhom odredili broj staničnih kolonija koje u staničnim kulturama pune koštane srži izražavaju enzim alkalnu fosfatazu. Pri tome je diferencijacija stanica koštane srži u smjeru osteoblastne loze bila potaknuta  $\beta$ -glicerofosfatom, vitaminom C i deksametazonom. Pokus na neoperiranim miševima je pokazao da je broj takvih kolonija u kulturama koštane srži miševa soja *C57BL/6* značajno niži od onoga u kulturama srži životinja soja *gld* (slika 18).

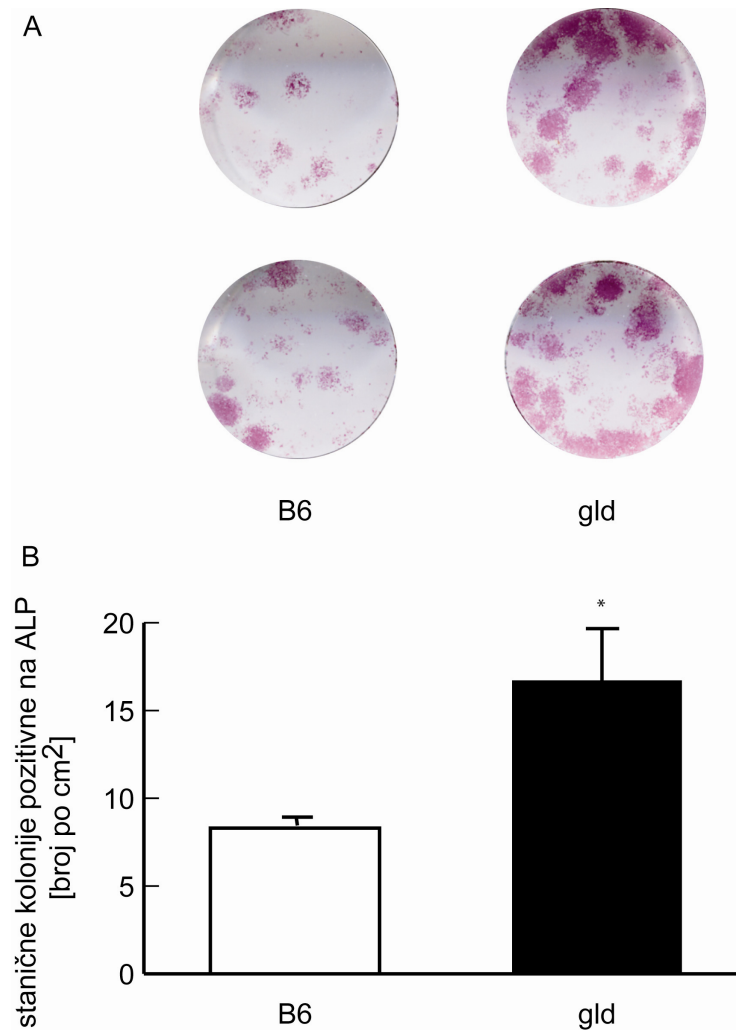


**Slika 16.** Stanice nalik osteoklastima (OCL) u staničnoj kulturi koštane srži miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld*, tjedan dana nakon parabioze. B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/gld: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; gld/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; gld/gld: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem koštane srži šest životinja iste skupine. Stanice koštane srži zasijane su gustoći  $0.5 \times 10^6$  po zdencu uz dodatak 15 ng/mL RANKL i 15 ng/mL M-CSF. Stanice su nakon šest dana histokemijski obojane na enzim kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP; prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*). **A.** Stanice koje izražavaju enzim TRAP (ljubičasta boja). Reprezentativna vidna polja stanične kulture pri povećanju mikroskopa  $100\times$ . **B.** Broj stanica u kulturi. Stupci prikazuju prosječan broj višejezgrenih stanica koje izražavaju TRAP po zdencu ( $\pm$  standardna devijacija) šestog dana od početka kulture, za uzorak u heksaplikatu. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu prema miševima soja B6 (ANOVA i *post hoc* test Student-Neuman-Keuls;  $P < 0.05$ ). Prikazan je reprezentativan pokus od tri ponavljanja.



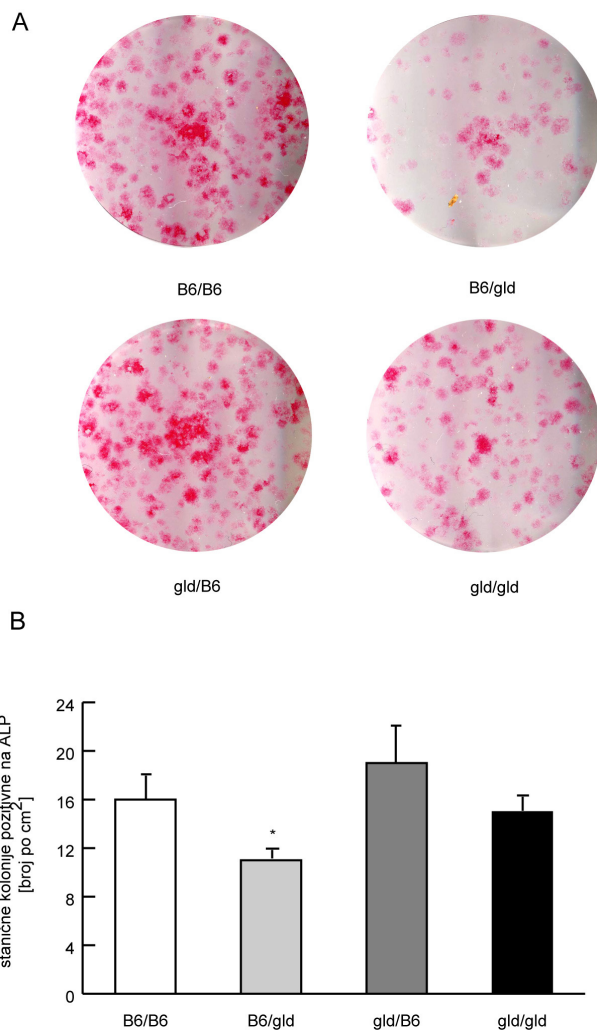


**Slika 17.** Stanice nalik osteoklastima (OCL) u staničnoj kulturi koštane srži miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld*, četiri tjedna nakon parabioze. B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/gld: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; gld/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; gld/gld: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem koštane srži šest životinja iste skupine. Stanice koštane srži zasijane su gustoći  $0.5 \times 10^6$  po zdencu uz dodatak 15 ng/mL RANKL i 15 ng/mL M-CSF. Stanice su nakon šest dana histokemijski obojane na enzim kiselu fosfatazu otpornu na tartarat (TRAP; prema engl. *tartarate-resistant acid phosphatase*). **A.** Stanice koje izražavaju enzim TRAP (ljubičasta boja). Reprezentativna vidna polja stanične kulture pri povećanju mikroskopa  $100\times$ . **B.** Broj stanica u kulturi. Stupci prikazuju prosječan broj višejezgrenih stanica koje izražavaju TRAP po zdencu ( $\pm$  standardna devijacija), za uzorak u heksaplikatu. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu prema miševima soja B6 (ANOVA i *post hoc* test Student-Neuman-Keuls;  $P < 0.05$ ). Prikazan je reprezentativan pokus od tri ponavljanja.

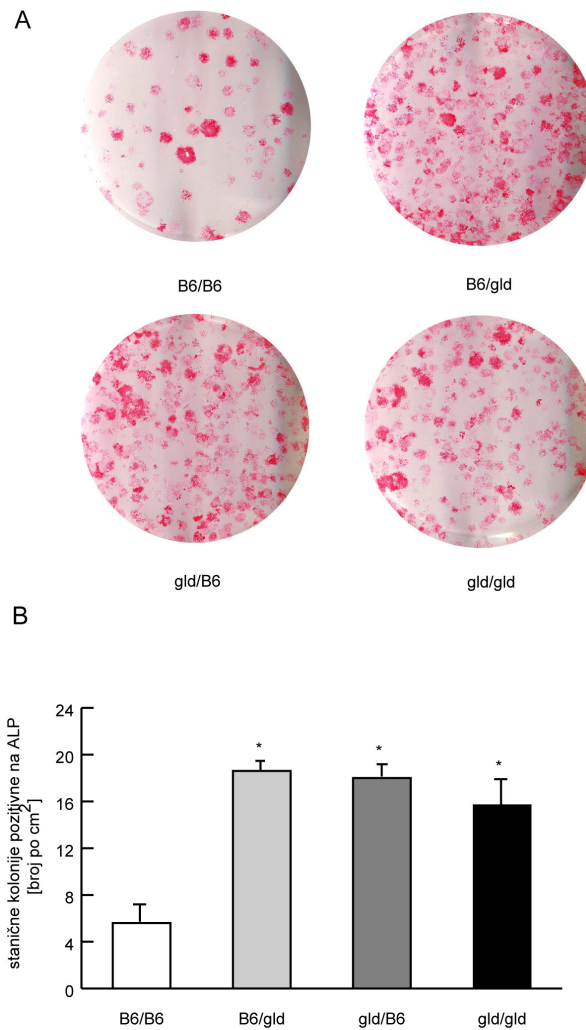


**Slika 18.** Stanične kolonije koje izražavaju enzim alkalnu fosfatazu (ALP) u staničnoj kulturi koštane srži miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld*. Uzorci su oblikovani združivanjem koštane srži pet životinja pojedinog soja. Stanice koštane srži zasijane su u gustoći  $10 \times 10^6$  po zdencu i uzgojene uz dodatak askorbinske kiseline ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), deksametazona ( $10^{-8}$  M) i  $\beta$ -glicerofosfata (8 mM). Stanice su nakon četrnaest dana histokemijski obojane na enzim ALP. **A.** Stanične kolonije koje izražavaju enzim ALP (crveno). Reprezentativni zdenci u pločici od 24 zdenaca. **B.** Broj staničnih kolonija u kulturi. Stupci pokazuju prosječan broj ( $\pm$  standardna devijacija) staničnih kolonija pozitivnih na ALP po  $1 \text{ cm}^2$  površine zdenca, za uzorak u heksaplikatu. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu prema miševima soja B6 (Studentov t-test;  $P < 0.05$ ). Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.

Prvi tjedan nakon operacije broj staničnih kolonija koje izražavaju enzim ALP bio je najmanji u miševa skupine B6/*gld* (ANOVA i *post hoc* test Student-Newman-Keuls,  $P < 0.05$ ) (slika 19) dok između ostalih pokusnih skupina nije bilo razlika u broju kolonija.



**Slika 19.** Stanične kolonije koje izražavaju enzim alkalnu fosfatazu (ALP) u staničnoj kulturi koštane srži miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld*, tjedan dana nakon parabioze. B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/gld: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; gld/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; gld/gld: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem koštane srži šest životinja iste skupine. Stanice koštane srži zasijane su u gustoći  $10 \times 10^6$  po zdencu i uzgojene uz dodatak askorbinske kiseline ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), deksametazona ( $10^{-8} \text{ M}$ ) i  $\beta$ -glicerofosfata ( $8 \text{ mM}$ ). Stanice su nakon četrnaest dana histokemijski obojane na enzim ALP. **A.** Stanične kolonije koje izražavaju enzim ALP (crveno). Reprezentativni zdenci u pločici od šest zdenaca. **B.** Broj staničnih kolonija u kulturi. Stupci pokazuju prosječan broj ( $\pm$  standardna devijacija) staničnih kolonija pozitivnih na ALP po  $1 \text{ cm}^2$  površine zdenca, za uzorak u triplicatu. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu prema ostalim skupinama (ANOVA i *post hoc* test Student-Neuman-Keuls;  $P < 0.05$ ). Prikazan je reprezentativan pokus od tri ponavljanja.



**Slika 20.** Stanične kolonije koje izražavaju enzim alkalnu fosfatazu (ALP) u staničnoj kulturi koštane srži miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld*, četiri tjedna nakon parabioze. B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/*gld*: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld*/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; *gld*/*gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Pojedini uzorci nastali su združivanjem koštane srži šest životinja iste skupine. Stanice koštane srži zasijane su u gustoći  $10 \times 10^6$  po zdencu i uzgojene uz dodatak askorbinske kiseline ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), deksametazona ( $10^{-8} \text{ M}$ ) i  $\beta$ -glicerofosfata (8 mM). Stanice su nakon četrnaest dana histokemijski obojane na enzim ALP. Reprezentativni zdenci u pločici od šest zdenaca. **A.** Stanične kolonije koje izražavaju enzim ALP (crveno). **B.** Broj staničnih kolonija u kulturi. Stupci pokazuju prosječan broj ( $\pm$  standardna devijacija) staničnih kolonija pozitivnih na ALP po  $1 \text{ cm}^2$  površine zdenca, za uzorak u triplikatu. Zvijezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu prema skupini B6/B6 (ANOVA i *post hoc* test Student-Neuman-Keuls;  $P < 0.05$ ). Prikazan je reprezentativan pokus od tri ponavljanja.

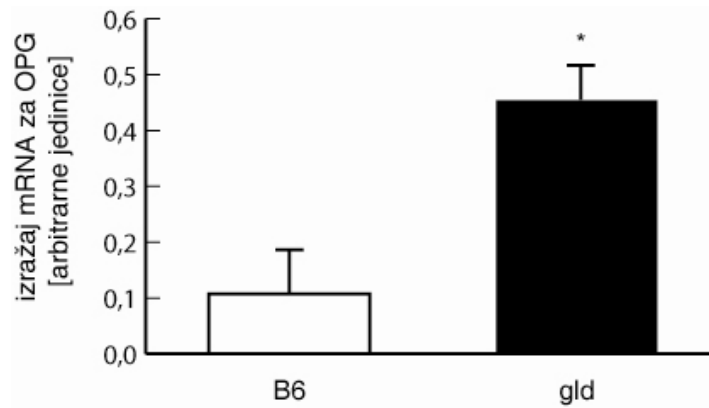
Četiri tjedna nakon operacije, međutim, broj staničnih kolonija koje izražavaju ALP bio je najmanji u životinja skupine B6/B6 (ANOVA i *post hoc* test Student-Newman-Keuls,  $P < 0.05$ ) (slika 20), a između ostalih pokusnih skupina nije bilo statistički značajnih razlika.

Smanjenje osteoklastogeničnog, uz povećanje osteoblastogeničnog potencijala koštane srži miševa divljeg tipa koji su bili u parabiozi s miševima soja *gld* moglo bi se objasniti promjenama u izražaju molekule OPG. Naime, povećani broj osteoblasta je stvorio veću količinu molekule OPG koja je, posljedično, zakočila diferencijaciju osteoklasta. Takav bi mehanizam bio i u skladu s našim dosadašnjim rezultatima<sup>294</sup>.

### **5.5. Učinak parabioze na izražaj gena za osteoprotegerin**

U neoperiranih miševa je izražaj gena za OPG, određen tehnikom qPCR, u kosti životinja soja C57BL/6 bio značajno manji nego u životinja soja *gld* (Studentov t-test,  $P=0.004$ ) (slika 21). S druge strane, u uzorcima koštane srži je signal umnožavanja cDNA za OPG dosegao prag broja ciklusa ( $C_t$ ) tek blizu 40. ciklusa umnožavanja (*nije prikazano*) što ukazuje na vrlo nizak ili čak nepostojeći genski izražaj. Usporedive rezultate sam dobio s pomoću dva para začetnika oblikovanih u našem laboratoriju te s pomoću specifično obilježene, kupovno dostupne, fluorescentne probe (tzv. postupak *TaqMan*) (*nije prikazano*).

Ako pogledamo uzorak izražaja gena za OPG kroz vrijeme, možemo uočiti dva obrasca (slike 22 i 23, tablica 6). U svim vremenskim točkama je u životinja skupine B6/B6, izražaj gena za OPG bio niži nego u životinja skupine *gld/gld*. Nadalje, u miševa skupine B6/*gld*, izražaj gena za OPG je bio pojačan u svim vremenskim točkama, osim nakon razdvajanja životinja (slika 23). Nasuprot tome, u skupini miševa skupine *gld*/B6, izražaj gena za OPG nije pratio jednostavan obrazac (slike 22 i 23): prvi tjedan je bio veći nego u skupine *gld/gld*, nakon toga se smanjio (drugi tjedan), a u trećem i četvrtom tjednu te nakon razdvajanja životinja bio vrijednostima blizak skupini *gld/gld*. Budući da promjene u genskom izražaju ne moraju nužno biti praćene promjenama u bjelančevinskom izražaju, odlučili smo odrediti i količinu bjelančevine OPG.

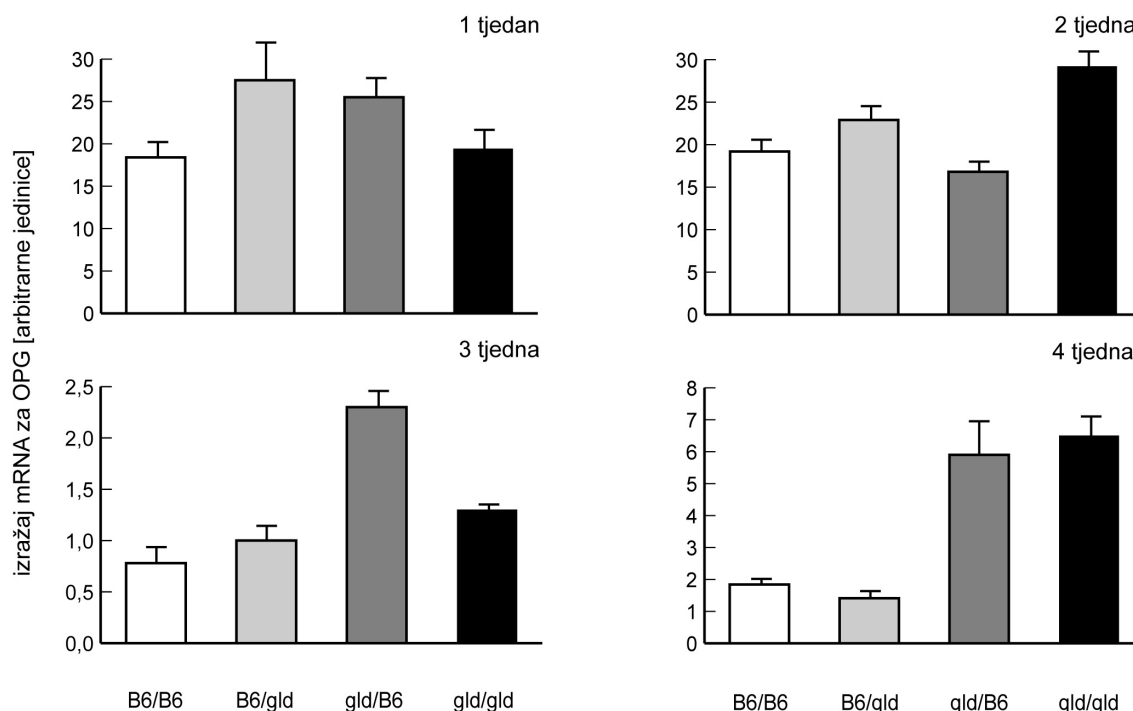


**Slika 21.** Izražaj mRNA za osteoprotegerin (OPG) u kostima miševa divljeg tipa (*C57BL/6*; B6) i miševa soja *gld*. Uzorci kosti pripremljeni su homogenizacijom kosti pet miševa pojedinog soja. Iz uzoraka je izolirana ukupna RNA, obrnuto prepisana u komplementarnu DNA koja je potom umnožena postupkom kvantitativne lančane reakcije polimerazom. Izražaj mRNA za OPG prikazan je u odnosu na izražaj mRNA za  $\beta$ -aktin. Stupci prikazuju aritmetičku sredinu ( $\pm$  standardna devijacija) relativne količine gena, za uzorke u triplicatu. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu prema skupini B6 (Studentov t-test;  $P < 0.05$ ). Prikazan je reprezentativan pokus od četiri ponavljanja.

**Tablica 6.** Relativni izražaj mRNA za osteoprotegerin (OPG) u kostima nakon parabiotskog spajanja miševa divljeg tipa (*C57BL/6*) i miševa soja *gld*.\*

Skupina	Trajanje parabioze				
	1 tjedan	2 tjedna	3 tjedna	4 tjedna	4 tjedna + 2 tjedna rastavljeno
B6/B6	1	1	1	1	1
B6/ <i>gld</i>	1.48	1.20	1.28	0.76	6.47
<i>gld</i> /B6	1.37	0.87	2.92	1.13	4.76
B6/B6	1.37	1.52	1.66	3.55	4.48

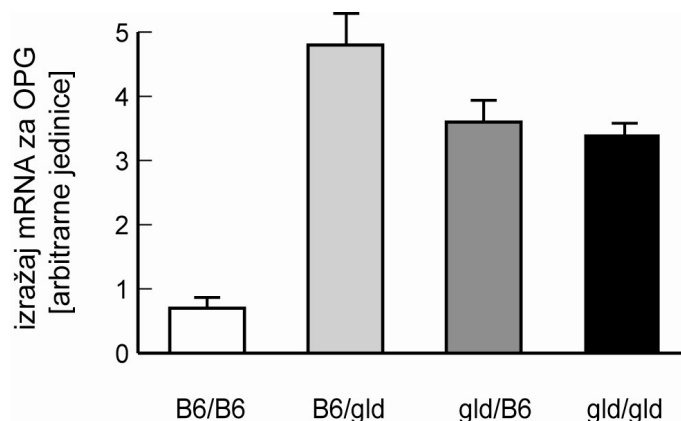
\*Objašnjenje kratica – B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/*gld*: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld*/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; *gld*/*gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Uzorci kosti pripremljeni su homogenizacijom kosti šest miševa pojedine skupine. Iz uzoraka je izolirana ukupna RNA, obrnuto prepisana u komplementarnu DNA koja je potom umnožena postupkom kvantitativne lančane reakcije polimerazom. Izražaj mRNA za OPG je normaliziran u odnosu na izražaj mRNA za  $\beta$ -aktin te prikazan relativno, u odnosu na skupinu B6/B6.



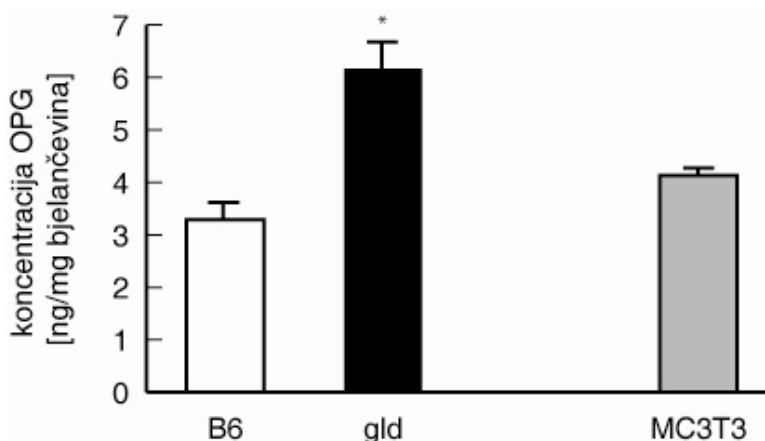
**Slika 22.** Izražaj mRNA za osteoprotegerin (OPG) u kostima miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld* nakon parabioze (1, 2, 3 i 4 tjedna). B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/gld: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; gld/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; gld/gld: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Uzorci kosti pripremljeni su homogenizacijom kosti šest miševa pojedine skupine. Iz uzoraka je izolirana ukupna RNA, obrnuto prepisana u komplementarnu DNA koja je potom umnožena postupkom kvantitativne lančane reakcije polimerazom. Izražaj mRNA za OPG relativiziran je u odnosu na izražaj mRNA za  $\beta$ -aktin. Stupci prikazuju aritmetičku sredinu ( $\pm$  standardna devijacija) relativne količine gena, za uzorke u triplicatu. Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.

## 5.6. Učinak parabioze na izražaj bjelančevine osteoprotegerin

Koncentracija bjelančevine OPG u kosti miševa soja C57BL/6, određena postupkom ELISA, bila je otprilike upola manja nego u miševa soja *gld* (Studentov t-test,  $P = 0.015$ ) (slika 24), dok je koncentracija bjelančevine OPG u koštanoj srži bila ispod praga osjetljivosti korištenog postupka (31.25 pg/mL) (*nije prikazano*). Za usporedbu sam prikazao i izražaj bjelančevine OPG u nadtalogu stanica besmrtno stanične linije mišjih kalvarijskih osteoblasta, MC3T3-E1<sup>313</sup>.



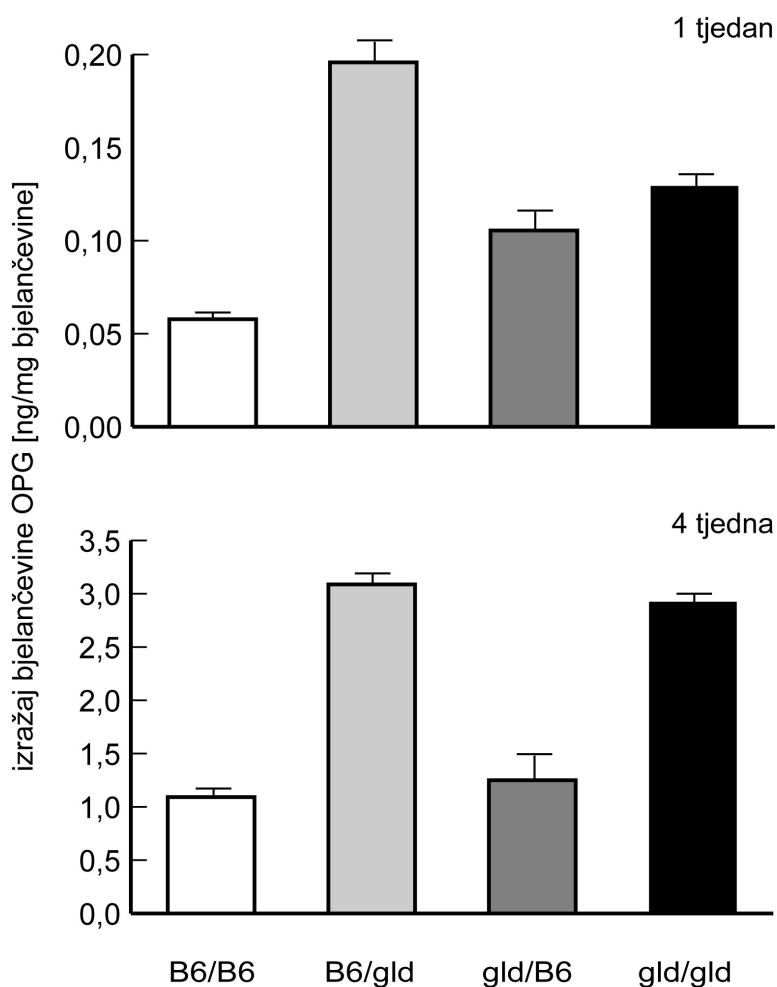
**Slika 23.** Izražaj mRNA za osteoprotegerin (OPG) u kostima miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld* nakon četiri tjedna parabioze i dva tjedna odvojenog života. B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/gld: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; gld/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; gld/gld: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Uzorci kosti pripremljeni su homogenizacijom kosti šest miševa pojedine skupine. Iz uzoraka je izolirana ukupna RNA, obrnuto prepisana u komplementarnu DNA koja je potom umnožena postupkom kvantitativne lančane reakcije polimerazom. Izražaj mRNA za OPG relativiziran je u odnosu na izražaj mRNA za  $\beta$ -aktin. Stupci prikazuju aritmetičku sredinu ( $\pm$  standardna devijacija) relativne količine gena, za uzorke u triplikatu. Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.



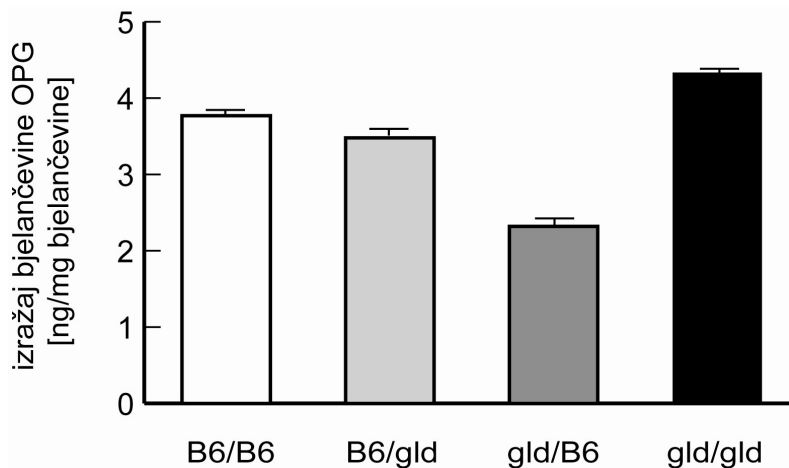
**Slika 24.** Izražaj bjelančevine osteoprotegerin (OPG) u kostima miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld*. Uzorci kosti pripremljeni su homogenizacijom kostiju pet miševa pojedine skupine. Koncentracija bjelančevine OPG u uzorcima određena je s pomoću enzimskog imunotesta (ELISA). Stupci prikazuju količinu bjelančevine OPG normaliziranu prema ukupnoj količini bjelančevina u uzorku. Za usporedbu je prikazana količina bjelančevine OPG i u nadtalogu kulture mišje osteoblastne stanične linije MC3T3-E1. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu prema skupini B6 (Studentov t-test;  $P < 0.05$ ).



Uzorak izražaja bjelančevine OPG u pokusima s parabiozom bio je istovjetan u tri ispitane vremenske točke: jedan i četiri tjedna parabioze (slika 25) te dva tjedna nakon razdvajanja (slika 26) (tablica 7). Koncentracija bjelančevine OPG u kostima životinja skupine B6/*gld* višestruko je narasla i bila je veća nego u ostalim pokusnim skupinama. U kostima miševa skupine *gld*/B6 našli smo manje OPG-a nego u skupini miševa skupine *gld*/*gld*, a razlika je bila najizraženija na kraju četvrtog tjedna.



**Slika 25.** Izražaj bjelančevine osteoprotegerin (OPG) u kostima miševa divljeg tipa (C57BL/6; B6) i miševa soja *gld* nakon parabioze (1 i 4 tjedna). B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/*gld*: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld*/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; *gld*/*gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Uzorci kosti pripremljeni su homogenizacijom kostiju šest miševa pojedine skupine. Koncentracija bjelančevine OPG u uzorcima određena je s pomoću enzimskog imunotesta (ELISA). Koncentracija bjelančevine OPG normalizirana je prema ukupnoj količini bjelančevina u uzorku. Stupci prikazuju relativni izražaj bjelančevine OPG, prema skupini B6/B6. Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.



**Slika 26.** Izražaj bjelančevine osteoprotegerin (OPG) u kostima miševa divljeg tipa (*C57BL/6*; B6) i miševa soja *gld* nakon četiri tjedna parabioze i dva tjedna odvojenog života). B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/gld: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; gld/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; gld/gld: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Uzorci kosti pripremljeni su homogenizacijom kostiju šest miševa pojedine skupine. Koncentracija bjelančevine OPG u uzorcima određena je s pomoću enzimskog imunotesta (ELISA). Koncentracija bjelančevine OPG normalizirana je prema ukupnoj količini bjelančevina u uzorku. Stupci prikazuju relativni izražaj bjelančevine OPG, prema skupini B6/B6. Prikazan je reprezentativan pokus od dva ponavljanja.

**Tablica 7.** Relativni izražaj bjelančevine osteoprotegerin (OPG) u kostima nakon parabiotskog spajanja miševa divljeg tipa (*C57BL/6*) i miševa soja *gld*.\*

Skupina	Trajanje parabioze		
	1 tjedan	4 tjedna	4 tjedna + 2 tjedna rastavljeno
B6/B6	1	1	1
B6/ <i>gld</i>	3.38	2.82	0.92
<i>gld</i> /B6	1.82	1.14	0.62
<i>gld</i> / <i>gld</i>	2.23	2.67	1.15

\*Objašnjenje kratica – B6/B6: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; B6/*gld*: miš soja B6 koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*; *gld*/B6: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja B6; *gld*/*gld*: miš soja *gld* koji je bio u parabiozi s mišem soja *gld*. Uzorci kosti pripremljeni su homogenizacijom kosti šest miševa pojedine skupine. Količina bjelančevine OPG određena je postupkom ELISA, normalizirana na ukupnu količinu bjelančevina u uzorku te prikazana relativno, u odnosu na skupinu B6/B6.

## 6. RASPRAVA

### 6.1. Miševi divljeg tipa nisu aloreaktivni prema miševima soja *gld*

Prije samog početka pokusa s parabiozama želio sam provjeriti postoji li aloreaktivnost između miševa divljeg tipa i miševa soja *gld*. Naime, postojanje aloreaktivnosti bi dovelo do pokretanja imunosnog odgovora te onemogućilo zaključivanje o ulozi imunosnog sustava u stvaranju koštanog fenotipa miševa soja *gld*.

Rezultati reakcije pomiješanih limfocita pokazali su da limfociti miševa divljeg tipa ne proliferiraju nakon inkubacije s limfocitima životinja soja *gld*, a vrijedilo je i obrnuto, pa sam mogao pretpostaviti da tijekom parabioze neće doći do aloreaktivnosti. Miševi soja *gld* imaju točkastu mutaciju u genu za ligand Fas koja dovodi do zamjene jedne aminokiseline: fenilalanin na mjestu 273 je zamijenjen leucinom<sup>242</sup>. Kako je malo vjerojatno da će takva promjena aminokiselinskog slijeda biti imunogenična, reakciju pomiješanih limfocita sam prihvatio kao dokaz nepostojanja aloreaktivnosti i nisam smatrao nužnim dodatno isključivanje drugim postupcima, poput kožnog presatka<sup>314</sup>. U prilog moje razmišljanju govorili su i prethodni pokusi s parabiotskim spajanjem miševa sojeva C57BL/6 i *gld* pri kojima nije uočena pojava aloreaktivnosti<sup>315</sup>.

### 6.2. Parabioza dovodi do ublažavanja imunofenotipa miševa soja *gld*

Parabiotsko spajanje miševa divljeg tipa i miševa soja *gld* dovelo je do "približavanja" njihovih imunofenotipova: u limfnim tkivima i krvi miševa skupine B6, koji su bili u parabiotskom paru s miševima *gld*, došlo je do povećanja udjela dvostruko negativnih limfocita T, dok je u miševa soja *gld*, koji su bili u paru s miševima soja B6, udio dvostruko negativnih limfocita T narastao. Takvo približavanje, ili "uprosječavanje" imunofenotipa doseglo je svoj vrhunac veoma brzo, već tjedan dana nakon operacije. Udjeli dvostruko negativnih limfocita T u tkivima su u sljedećim tjednima slijedili obrazac uspostavljen na kraju prvog tjedna. Dva tjedna nakon rastavljanja životinja koje

su u parabiozi bile mjesec dana, udio dvostruko negativnih limfocita T se u tkivima životinja *gld* koje su bile u parabiozi s miševima soja B6 smanjio sve do razine znakovite za skupinu B6/B6. Budući da su dvostruko negativni limfociti T izravna posljedica nedostatka liganda Fas u miševa soja *gld*<sup>191</sup> te znakoviti “biljeg” njihovog limfoproliferativnog poremećaja<sup>316</sup>, smanjenje udjela dvostruko negativnih limfocita T u limfnim tkivima životinja soja *gld* tijekom parabioze sa životinjama divljeg tipa mogao bi biti znak ublažavanja limfoproliferativne bolesti.

Promjene broja dvostruko negativnih limfocita T u tkivima parabiotiski spojenih miševa tumačim uspostavljanjem jedinstvenog krvnog optjecaja te prijelazom krvnih stanica iz jednog miša u drugog. Do smanjenja udjela dvostruko negativnih limfocita T u limfnim organima miševa soja *gld* iz parabiotskog para *gld*/B6 moglo je doći na nekoliko načina. Prvo, u miševa soja *gld*, parabiotskog para *gld*/B6, prešle su krvne stanice miša divljeg tipa (tj. miša B6/*gld*) koje izražavaju funkcionalni ligand Fas. Time je moglo doći do uklanjanja “nagomilanih” dvostruko negativnih limfocita T te, ublažavanjem limfoproliferacije, i do usporavanja ili čak prestanka stvaranja novih dvostruko negativnih limfocita. Smatram da su za takav učinak najvažniji limfociti T podrijetlom iz miševa divljeg tipa. Limfociti T s pomoću liganda Fas mogu odstraniti kronično pobuđene i autoreaktivne stanice u tkivima miševa soja *gld*, članova parabiotskog para *gld*/B6, tim više što stanice limfnih tkiva miševa soja *gld* pojačano izražavaju receptor Fas<sup>317</sup>. U prilog mom razmišljanju govori opažanje da nakon presađivanja koštane srži životinje divljeg tipa u životinju soja *gld*, stanice davaoca usmrćuju stanica primaoca s pomoću liganda Fas<sup>317</sup>. Iako se ligand Fas nalazi na površini različitih stanica podrijetlom iz koštane srži<sup>318</sup>, pokusi s uklanjanjem pojedinih staničnih populacija su potvrdili da potiskivanje imunofenotipa životinja *gld* počiva na presađenim limfocitima T divljeg tipa<sup>295,319</sup>. U miševa soja *gld*, parabiotskog para *gld*/B6, krvlju su mogle prijeći i druge stanice, uključujući krvotvorne matične stanice divljeg tipa<sup>320</sup>. Diferencijacija potomstva tih stanica mogla je doprinijeti ublažavanju imunosnog poremećaja četiri tjedna nakon operacije, a osobito nakon razdvajanja životinja. Konačno, smanjenju udjela dvostruko negativnih stanica u miševa soja *gld* koji su bili spojeni s miševima divljeg tipa, doprinjelo je i njihovo “razrjeđivanje”, tj. prelazak dvostruko negativnih limfocita T iz miša

soja *gld* u pridruženu životinju divljeg tipa (B6). No, ovo ne smatram glavnim mehanizmom jer se razrjeđivanjem ne može objasniti smanjenje udjela dvostruko negativnih limfocita T nakon razdvajanja životinja (slika 14). Glavni razlog nestanka dvostruko negativnih limfocita T je, dakle, bio učinak limfocita T divljeg tipa.

Dvostruko negativni limfociti T, koji su u parabisoskom paru iz miša *gld* prešli u miša B6 su najvjerojatniji razlog povećanja broja dvostruko negativnih limfocita T u limfnim tkivima miševa skupine B6. Drugo moguće objašnjenje povećanja broja dvostruko negativnih limfocita u organima miševa soja B6, iz parabisoskog para B6/*gld*, je proliferacija vlastitih (tj. B6) dvostruko negativnih stanica, kao odgovor na upalu izazvanu operacijom. Iako se dvostruko negativni limfociti T normalno mogu naći u limfnim tkivima miševa divljeg tipa (slika 7)<sup>251,295,321</sup>, veoma su rijetki, a sposobnost proliferacije im je veoma niska<sup>251-253</sup>, pa ovo objašnjenje ne smatram vjerojatnim. Osim toga, da je došlo do značajne proliferacije dvostruko negativnih limfocita T, došlo bi i do povećanja broja dvostruko negativnih limfocita T u tkivima miševa soja *gld*, što u pokusima nisam opazio. Sljedeći upravo izneseno razmišljanje, zaključio sam da su promjene broja dvostruko negativnih limfocita T u krvi i organima parabisoski spojenih životinja izravna posljedica razvoja združenog krvnog optjecaja i slobodnog prijelaza krvnih stanica između članova para. Tim više što je tijekom parabisoze vidljivo "približavanje" broja dvostruko negativnih limfocita T unutar članova parabisoskog para B6-*gld* (slike 8, 10-12). Posljedično tome, nisam smatrao nužnim koristiti sojeve C57BL/6 i *gld* koji se razlikuju u specifičnim biljezima limfocita T, poput Thy1.1 i Thy 1.2<sup>251,295,320,322</sup>.

Neke od promjena brojeva dvostruko negativnih limfocita T u pojedinim tkivima ispitivanih miševa nije lako objasniti prijelazom stanica (slike 8, 10-12). Takva odstupanja vjerojatno su posljedica prilično velike varijabilnosti fenotipa miševa soja *gld* koja uključuje varijacije organomegalije, varijacije titra protutijela u krvi, varijacije vremena razvoja zloćudnih novotvorina te varijacije broja dvostruko negativnih limfocita T. O tome svjedoče rezultati nekoliko istraživanja<sup>245,251,311</sup> te neobjavljeni rezultati naše istraživačke skupine (Grčević D, Kovačić N; osobno priopćenje). Na primjer, prosječni udio ( $\pm$ SD) dvostruko negativnih limfocita T u slezeni miševa soja B6 iznosio je  $2.21 \pm 0.19$  % (relativna standardna devijacija = 9%), a u miševa soja *gld*  $23.16 \pm 5.11$ %

(relativna standardna devijacija = 22%); prosječni broj osteoklasta po zdencu u kulturi stanica koštane srži miševa soja B6 bio je  $302 \pm 18$  (relativna standardna devijacija 6%) a u kulturi srži miševa soja *gld*:  $213 \pm 40$  (relativna standardna devijacija 19%). Varijabilnost fenotipa miševa soja *gld* se k tome povećava starenjem životinja<sup>245,311</sup> te može prilično utjecati na rezultate prospektivnog istraživanja, kao što je bilo moje.

Ublažavanje limfoproliferacije nakon parabioze opaženo u mojim istraživanjima je u skladu s rezultatima prethodnog rada na sličnom modelu<sup>315</sup>. Kakkanaiyah je sa suradnicima uočio potiskivanje bolesti u miševa soja *gld* nakon parabioze s miševima divljeg tipa. U pokuse su uključili miševe stare četiri tjedna ili četiri mjeseca, te ih spojene držali mjesec dana, a potom žrtvovali te odredili masu i staničnost limfnih organa, koncentracije autoprotutijela te udjele limfocita Thy1.2<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> u limfnim čvorovima. Naši pokusi, međutim, pokazuju da za ublažavanje poremećaja *gld* ne treba čekati toliko dugo već da se imunofenotip miševa soja *gld* mijenja već tjedan dana nakon parabioze. Nadalje, moje istraživanje je imalo i dvije važne metodološke prednosti. Kakkanaiyah i suradnici su za dokazivanje dvostruko negativnih limfocita T koristili trostruko, dok sam ja koristio četverostruko bojanje. Posebno ističem da smo, za razliku od Kakkanaiyaha i ostalih<sup>315</sup>, u naše pokuse uključili i kontrolnu skupinu miševa divljeg tipa koji su bili spojeni s miševima divljeg tipa (u ovom radu označene kao B6/B6) te neoperirane miševe divljeg tipa i miševe soja *gld*. Smatramo da smo uvođenjem dodatnih kontrolnih skupina mogli bolje razlučiti učinke parabioze od učinaka samog operacijskog postupka na imunofenotip životinja.

Nadalje, naši pokusi su pokazali i što se s imunosnim, odnosno, koštanim fenotipom dogodilo nakon rastavljanja parabiotski spojenih životinja. U skladu s očekivanjem, u miševa skupine B6, koji su bili u parabiotskom paru s miševima soja *gld*, udio se dvostruko negativnih limfocita T u limfnim tkivima smanjio do razine u životinja skupine B6/B6. No, i u miševa soja *gld*, iz parabiotskog para *gld*/B6, je došlo do značajnog smanjenja udjela dvostruko negativnih limfocita T, i to do razine znakovite za miševe divljeg tipa. Ovaj rezultat je posebno zanimljiv zato što smo parabiozom ostvarili učinak koji se inače postiže presađivanjem koštane srži miševa divljeg tipa u miševe soja *gld*<sup>297,298</sup>. Možemo, dakle, pretpostaviti da potiskivanje limfoproliferacije nije posljedica samo prometa zrelih leukocita, već i prijelaza krvotvornih matičnih

stanica podrijetlom iz miševa divljeg tipa. Iako nije jasno kako to da se sličan učinak ne vidi prije razdvajanja, pretpostavljam da je dijelom riječ o vremenu koje je proteklo od početka parabioze. Primjerice, za udomljavanje krvotvorne mišje matične stanice, potrebno je devet do deset dana i to pri velikoj dozi presađenih matičnih stanica<sup>8</sup>, dok diferencijacija mišjih granulocita traje oko tri tjedna<sup>323</sup>. Bilo bi zanimljivo i vidjeti što bi se dogodilo uključivanjem starijih životinja u pokuse. Naime, Kakkanaiah je pokazao da je limfoproliferaciju s pomoću parabioze moguće potpuno suzbiti u životinja starih četiri tjedna, ali da to isto nije moguće u životinja starih četiri mjeseca<sup>315</sup>. U skladu s tim, zna se da mikrokoliš ostarjelih miševa soja *gld* potiče limfoproliferaciju neovisno o nedostatku liganda Fas<sup>259</sup>.

### **6.3. Osteoblastogenični potencijal koštane srži miševa divljeg tipa se tijekom parabioze povećava, dok u miševa soja *gld* ostaje nepromijenjen**

Na kraju prvog tjedna, miševi B6 iz parabiotskog para B6/*gld* imali su značajno manji broj osteoblastnih prethodnika u koštanoj srži u usporedbi s ostalim skupinama. Mjesec dana nakon operacije je, međutim, došlo do značajnog porasta osteoblastogeničnog potencijala koštane srži miševa skupine B6/*gld*, pri čemu je broj prethodnika osteoblasta u tih miševa porastao do onog u životinja skupine *gld*/B6, odnosno *gld*/*gld*.

Zbivanja u stromalnoj sastavnici koštane srži nakon parabioze nije jednostavno objasniti zbog brojnih međudjelovanja različitih staničnih loza u mikrokolišu<sup>324</sup>. Uspostavljanjem zajedničkog krvnog optjecaja prenose se i stanice i humoralni čimbenici. Budući da je odlika periferne krvi miševa soja *gld* smanjenje ukupnog broja limfocita T uz povećan relativni broj dvostruko negativnih limfocita T<sup>248,274,311</sup>, promjene u stromalnoj sastavnici koštane srži bi se mogle pripisati i utjecaju dvostruko negativnih limfocita T. Zbog njihovog malog broja te funkcionalne anergije takvo je objašnjenje malo vjerojatno. Nadalje, temeljno obilježje miševa soja *gld* jest kronična pobuda imunskog sustava, uključujući kroničnu poliklonsku pobudu limfocita T<sup>180,325</sup>. Dobro je poznato da pobuđeni limfociti T izlučuju velik broj čimbenika koji mogu

djelovati na diferencijaciju, proliferaciju i aktivnost koštanih stanica. Primjerice, to su IL-1, TNF- $\alpha$ , RANKL, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , limfotoksin i ligand za OSCAR<sup>65,67,80,88,324,326,327</sup>. Pretpostavljam da su upalni odgovor na operaciju, zajedno s prijelazom kronično pobuđenih limfocita T iz miša *gld* u miša B6, u parabiotском paru, te posljedičnim stvaranjem niza upalnih citokina doveli do privremenog smanjenja osteoblastogeničnog potencijala koštane srži životinja skupine B6/*gld* u prvom tjednu nakon operacije. To potkrepljujem opažanjem da je smanjenje broja osteoblasta na koštanoj površini važna sastavnica odgovora akutne faze tijekom upale<sup>328</sup>.

Veći broj osteoblasta u miševa soja *gld* (slike 18 i 20) bi mogao biti uzrokovan izostankom apoptoze stanica osteoblastne loze preko puta ligand Fas – receptor Fas<sup>294</sup>. Naime, stanice osteoblastne loze izražavaju receptor Fas, a aktivacijom toga receptora se u stanicama pokreće kaskada stanične smrti<sup>278,279,285,286,289,290</sup>. U prilog ovom razmišljanju govore naši prethodni rezultati, prema kojima miševi soja *gld* imaju manje apoptotičnih osteoblasta tijekom stvaranja nove kosti nakon ablacije koštane srži<sup>293</sup>. Izvor liganda Fas u koštanoj srži, međutim, nije jednostavno utvrditi. Načelno bi to mogli biti limfociti T, čija je homeostatska uloga u srži nedavno opisana<sup>329</sup>. Rezultati toga istraživanja pokazuju da su za poticanje hematopoeze važni različiti čimbenici koje u koštanoj srži stvaraju pobuđeni limfociti T<sup>329</sup>. Budući da je kronična pobuda imunosnog sustava temelj poremećaja *gld*<sup>180,191,325,330</sup>, kronično pobuđeni limfociti koji su u parabiotском paru iz miša soja *gld* prešli u miša B6 bi na proliferaciju možda mogli potaknuti ne samo hematopoetske, nego i stanice osteoblastne loze<sup>331</sup>. Osim limfocita T, koji u koštanu srž dolaze krvlju, od stanica koje su “autohtone” u koštanoj srži nezreli limfociti B izražavaju ligand Fas<sup>332</sup>. Budući da su nezreli limfociti B funkcionalno povezani sa stanicama osteoblastne loze<sup>333</sup>, treba ih imati u vidu pri razmatranju o izvoru liganda Fas. Konačno, promjena osteoblastnog potencijala koštane srži životinja u mojim pokusima bi mogla biti posljedicom prijelaza i krvotvorne matične stanice, za koju je nedavno, s pomoću različitih modela *in vitro* i *ex vivo*, pokazano da se može diferencirati i u smjeru osteoblastne loze<sup>12,334,335</sup>. Međutim, naša suradnička skupina iz Sjedinjenih Država, koja to pokušava dokazati s pomoću modela parabioze, još uvijek nema dokaz *in vivo* (Kalajzić I, osobno priopćenje).



#### **6.4. Osteoklastogenični potencijal koštane srži miševa divljeg tipa se tijekom parabioze smanjuje, dok u miševa soja *gld* ostaje nepromijenjen**

Broj osteoklastnih prethodnika u koštanoj srži miševa skupine *gld* iz parabiotskog para *gld/B6* se tijekom parabioze nije promijenio, ali je zato tjedan dana i četiri tjedna nakon operacije bio značajno smanjen u miševa soja B6 iz para *B6/gld*, poprimajući vrijednosti znakovite za životinje soja *gld*.

Smanjenje osteoklastogeničnog potencijala koštane srži miševa soja B6 koji su bili u paru s miševima soja *gld* može se povezati s istovremenim povećanjem osteoplastnog potencijala miševa te iste skupine (tj *B6/gld*). Djelovanje osteoplasta i osteoklasta u kosti usko su povezani te, štoviše, većina lokalnih i sustavnih čimbenika koji utječu na diferencijaciju i aktivnost osteoklasta to čine posredno, djelujući na osteoplaste<sup>13,64,81</sup>. U mom radu, čimbenik koji povezuje broj osteoplasta s brojem osteoklasta najvjerojatnije je bio OPG. Za OPG je nizom istraživanja dokazano da je glavni inhibitor diferencijacije i aktivnosti osteoklasta<sup>336</sup>, a osteoplasti miševa soja *gld* ga izlučuju u većoj mjeri od osteoplasta miševa divljeg tipa<sup>294</sup>.

Porast broja osteoplasta bi, znači, mogao biti uzročno povezan sa smanjenjem broja osteoklasta u miševa skupine *B6/gld*. Stoga smatram da je OPG taj čimbenik koji u imunosnom okruženju miševa soja *gld* povezuje broj osteoplasta s brojem osteoklasta<sup>294</sup>.

#### **6.5. Osteoprotegerin kao posrednik promjena u koštanoj srži**

U prethodnom radu naše istraživačke skupine pokazali smo pojačani izražaj gena za OPG u miševa soja *gld*<sup>294</sup> koji bi barem dijelom mogao biti odgovoran za koštani fenotip životinja toga soja. OPG bi, također, mogao biti uvjerljivo objašnjenje promjena u koštanoj srži tijekom parabioze. Izražaj gena za OPG se u kostima miševa B6, parabiotskog para *B6/gld*, tijekom parabioze pojačao, da bi se rastavljanjem životinja vratio na razinu tipičnu za skupinu *B6/B6*. S druge strane, nije primijećen jednostavan uzorak izražaja gena za OPG u kostima miševa *gld*, parabiotskog para *gld/B6*: nakon smanjenja u drugom tjednu, u

trećem i četvrtom tjednu je premašio vrijednosti u skupine *gld/gld* te se ponovo smanjio rastavljanjem životinja. Budući da genski izražaj ne mora biti praćen bjelančevinskim izražajem<sup>337</sup>, odredio sam i koncentraciju bjelančevine OPG u uzorcima. Dok je koncentracija bjelančevine OPG u miševa *gld*, parabiotskog para *gld/B6*, tijekom parabioze bila smanjena, u miševa B6 iz parabiotskog para *B6/gld* se povećala, i to iznad vrijednosti u životinja skupine *gld/gld*. Isti odnos koncentracija postojao je i nakon rastavljanja parabiotskog para.

U svojim pokusima nisam mogao dokazati OPG u koštanoj srži ni na genskoj niti na bjelančevinskoj razini. Naime, iako se mRNA za OPG može izolirati iz različitih tkiva, kao najvažniji izvor obično se navode stanice strome koštane srži, uz važnu napomenu da su mnogi rezultati dobijeni radom na primarnim staničnim kulturama ili staničnim linijama<sup>75,336</sup>. No, ako pogledamo tkivni izražaj bjelančevine OPG, radovi *in vivo* ukazuju da su stanice koje naliježu uz koštanu površinu, poput osteoblasta i obložnih stanica, glavni izvor OPG-a<sup>338,339</sup>. To nimalo ne začuđuje budući je riječ o diferenciranim stanicama osteoblastne loze, a stvaranje OPG-a se diferencijacijom povećava<sup>340,341</sup>. Pretpostavljam da je sasvim moguće da tijekom ispiranja koštane srži stanice koje stvaraju najveće količine OPG-a ostanu vezane uz koštanu površinu te se stoga mRNA za OPG, odnosno bjelančevina OPG koju stvaraju, ne prikazuje u pripravcima koštane srži, nego u pripravcima “prazne” kosti.

Veća količina OPG-a u kostima miševa soja *gld* može se objasniti smanjenom apoptozom stanica osteoblastne loze, zbog gubitka funkcije apoptotskog puta ligand Fas – receptor Fas. Rezultati istraživanja *in vivo* pokazuju da u modelima osteoindukcije u miševa soja *gld* dolazi do obilnijeg stvaranja novog koštanog tkiva<sup>292,293</sup> te da pri tome miševi soja *gld* imaju manje apoptotičnih osteoblasta na koštanoj površini<sup>294</sup>. U uvjetima smanjenja apoptotske stope osteoblastnih prethodnika, postoji veći broj zrelih osteoblasta, koji izlučuju najviše OPG-a<sup>340,341</sup>. U prilog tome govori moj nalaz da se mRNA za OPG te bjelančevina OPG mogu izdvojiti iz kosti, u kojoj se osteoblasti i nalaze, ali ne i iz koštane srži. Smanjeni broj osteoklastnih prethodnika u koštanoj srži miševa soja *gld* u skladu je s pojačanim izražajem gena i većom količinom bjelančevine OPG u miševa soja *gld*, budući da je OPG glavni negativni regulator diferencijacije i pobude osteoklasta<sup>326</sup>. Rezultati pokusa s parabiozom pokazuju

da je u miševa skupine B6/*gld* došlo do povećanja izražaja OPG-a kako na genskoj, tako i na bjelančevinskoj razini, što se uklapa u iznesena razmišljanja. No, veća koncentracija bjelančevine OPG u kosti mogla bi dijelom biti i posljedicom sustavnog poremećaja. Prema našim neobjavljenim rezultatima (Grčević D, Lukić IK) izražaj mRNA za OPG u slezeni miševa soja *gld* je četiri puta veći no u miševa divljeg tipa (B6,  $\Delta C_t$  za OPG = 15.32; *gld*,  $\Delta C_t$  za OPG = 13.18;  $\Delta\Delta C_t$  = -2.14; postupak qPCR). Izvor tog OPG-a mogli bi biti pobuđeni limfociti T i pobuđeni makrofagi<sup>326,342-344</sup>. Prema neobjavljenim rezultatima naše istraživačke skupine, genski izražaj za OPG je u pobuđenih limfocita T veći 7 puta, u usporedbi s mirujućim limfocitima T (relativni izražaj mRNA za OPG u pobuđenih limfocita T: 0.190; u mirujućih limfocita T: 0.028; postupak qPCR) (Grčević D, osobno priopćenje). Takvo značajno povećanje izražaja OPG-a u imunskim tkivima miševa soja *gld* navodi razmišljanje o povezanosti imunskog poremećaja i pojačanog izražaja OPG-a. Naime, molekularni sustav RANKL/RANK/OPG je izvorno opisan u imunskom sustavu<sup>75</sup>, kad se pokazalo da limfociti T stvaraju RANKL<sup>345</sup>, odnosno da dendritične stanice izražavaju RANK<sup>346</sup>. Daljnja istraživanja o ulozi sustava RANKL/RANK/OPG pokazala su da ti citokini imaju imunoregulacijsku ulogu<sup>347</sup>. Dendritične stanice potiču izvršne i memorijske citotoksične limfocite T preko para molekula RANKL – RANK<sup>348</sup>, dok limfociti T s pomoću istih molekula djeluju kemotaktično na makrofage, potiču njihovu aktivnost te upalnu reakciju<sup>187,349</sup>. Nadalje, RANKL produljuje život dendritičnih stanica<sup>350</sup> te time doprinosi razvoju upale<sup>351</sup>. OPG, s druge strane, regulira proliferaciju limfocita T<sup>352</sup> te može ograničiti proizvodnju različitih citokina u dendritičnim stanicama<sup>353</sup>. U odnosu na moje istraživanje, posebno su zanimljivi izvještaji o uključenosti RANKL-a u stvaranje imunotolerancije<sup>354</sup>, odnosno o ulozi sustava RANKL/RANK u usmjeravanju imunске reakcije u smislu imunoreaktivnosti ili pak imunotolerancije<sup>355</sup>. Iako mi ustroj istraživanja ne dopušta neposredno zaključivanje o tome, povećanje izražaja bjelančevine OPG u miševa soja *gld* može se shvatiti dijelom i kao kompenzacijski mehanizam kojim organizam nastoji obuzdati autoimunosna zbivanja. Ako je to točno, valjalo bi očekivati pojačani izražaj OPG-a u miševa koji nemaju funkcionalan sustav ligand Fas – Fas. Upravo to i govore preliminarni rezultati našeg laboratorija prema kojima je mRNA za OPG pojačano izražena u primarnim osteoblastnim kulturama stanica koštane srži

životinja soja kojima je genskom manipulacijom izbačen gen za receptor Fas (Fas  $-/-$ ): relativni izražaj mRNA za OPG, određen postupkom qPCR, je osamnaesti dan kulture u miševa soja B6 bio  $1.8 \pm 0.1$  (arbitrarne jedinice; aritmetička sredina  $\pm$  SD) a u miševa soja *gld*  $3.4 \pm 0.1$  (Kovačić N, osobno priopćenje).

Smatram da se na temelju rezultata mojih pokusa i iznesenog razmišljanja može zaključiti da koštani fenotip miševa soja *gld* nastaje dvojako: dijelom “izravno”, zbog nedostatka apoptotskog puta ligand Fas – Fas u osteoblastima, a dijelom posredno, kao odraz imunskih zbivanja. Prijenos limfocita iz miša *gld* u miša B6 je tijekom parabioze doveo do istovremenog prijelaza imunskog, ali i koštanog fenotipa. Taj rezultat ukazuje da je koštani fenotip miševa soja *gld*<sup>293,294,355</sup> dijelom uvjetovan i poremećajem u imunskom sustavu. Nasuprot tome, iako je tijekom parabioze došlo do ublažavanja limfoproliferacije u miševa soja *gld* koji su bili u parabiozi s miševima soja B6, njihov koštani fenotip ostao je nepromijenjen. To opažanje govori u prilog “imanentne” uloge molekule ligand Fas u koštanom sustavu.

## 6.6. Ograničenja pokusnog modela i rezultata istraživanja

Kako bismo istražili koštane posljedice autoimunskog poremećaja miševa soja *gld* odabrali smo tehnički vrlo zahtjevan i za pokusne životinje izuzetno neugodan model – parabiozu. Iako se limfoproliferacija u soja *gld* može ublažiti ili izliječiti presađivanjem koštane srži miševa divljeg tipa<sup>295-301</sup>, nismo koristili taj model. Naime, uobičajeni postupci pripreme primatelja za presađivanje koštane srži, zračenje i farmakološka obrada, dovode do značajnog gubitka koštanog tkiva<sup>356-358</sup> (Katavić V., Lorenzo J.A., osobno priopćenje). Nasuprot tome, klasični pokusi s parabiozom pokazuju da je promjene koštanog fenotipa u miševa, i to u smislu osteopetroze kao što imaju miševi soja *gld*<sup>294</sup>, moguće ispraviti spajanjem sa zdravom životinjom<sup>359,360</sup>.

Pri promišljanju mehanizma nastanka koštanog fenotipa miševa soja *gld* valja uzeti u obzir ograničenja provedenih pokusa. Prvo, radom na komplementarnom modelu – miševima koji su spontani mutanti gena za receptor Fas (soj *lpr*) je prije desetak godina dokazano da ti miševi nemaju

potpunu penetrantnost alela *lpr*, odnosno da na stanicama ipak postoji izražaj funkcionalnog receptora Fas<sup>361</sup>. Stoga su proizvedeni miševi kojima je genskom manipulacijom izbačen gen za receptor Fas<sup>362</sup>. Nasuprot tome se sve do nedavno smatralo da u miševa soja *gld* nema izražaja funkcionalnog liganda Fas. No, novi rezultati francuske istraživačke skupine ukazuju na to da mutacijom izmijenjena bjelančevina ligand Fas u miševa soja *gld* ipak ima sposobnost vezivanja na receptor Fas, ali s mnogo manjim afinitetom u odnosu na bjelančevinu divljeg tipa<sup>363</sup>. Budući da miševi bez gena za Fas ligand (FasL  $-/-$ ) imaju bitno teži autoimunski poremećaj od miševa soja *gld*<sup>363</sup>, bilo bi zanimljivo provjeriti hoće li u miševa soja FasL  $-/-$  koštani fenotip biti još naglašeniji no u miševa soja *gld*. Drugo, promjene osteoklastogeničnog i osteoblastogeničnog potencijala koštane srži miševa divljeg tipa tijekom parabioze navode na zaključak da bi se u njihovim kostima mogle pronaći i morfološke promjene svojstvene fenotipu miševa soja *gld*, kao što su povećanje koštane mineralne gustoće te povećanje koštanog trabekularnog volumena<sup>294</sup>. Bilo bi također zanimljivo to predviđanje potvrditi *in vivo*. Treće, u stvaranju mikrookoliša koštane srži sudjeluju i druge stanice, poput endotelne stanice<sup>364,365</sup>, koji ovim istraživanjem nisu obuhvaćeni. I, četvrto, u promatranju uloge sustava ligand Fas – receptor Fas na stvaranje koštanog fenotipa treba imati u vidu obilje međudjelovanja između članova obitelji TNF<sup>131</sup>. Na primjer, ligand Fas se veže na DcR3, na koji se mogu vezati VEGI i LIGHT (slika 3), a DcR3 k tome potiče diferencijaciju osteoklasta<sup>366</sup>.

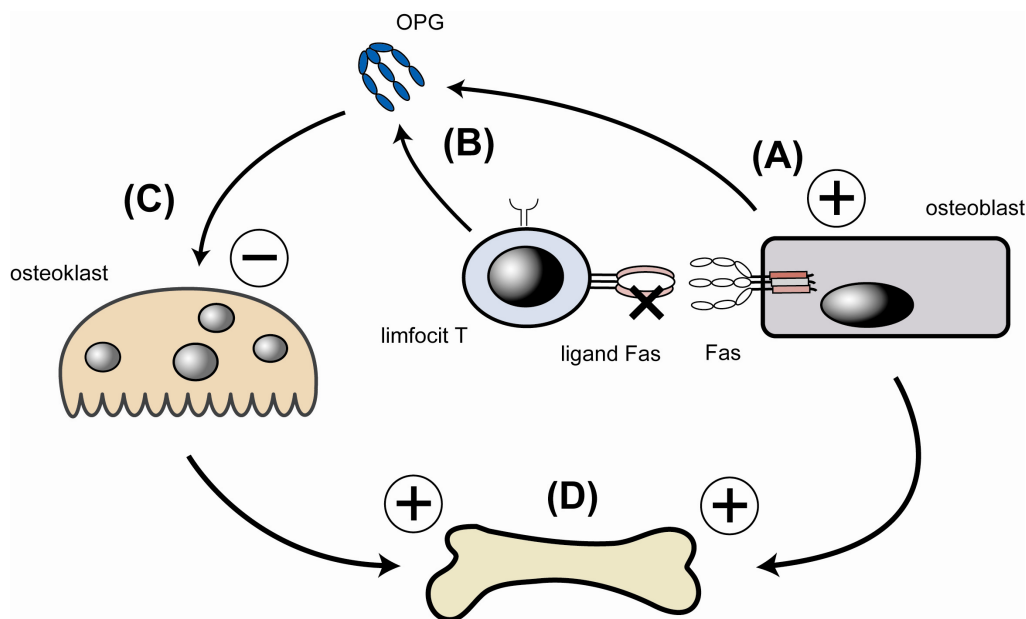
Također napominjem da je ulogu liganda Fas u oblikovanju koštanog fenotipa bilo moguće istražiti na još nekoliko načina. Prvo, mogao sam miševe soja *gld* obraditi prikladnim oblikom molekule ligand Fas. Nažalost, iako postoji rad koji ukazuje na farmakološku iskoristivost topljivog ligand Fas u autoimunskim bolestima<sup>223</sup>, sama farmakološka primjena molekule ligand Fas prilično je složena, jer za punu aktivnost mora biti izražena na staničnoj membrani<sup>162,367</sup>. Stoga se taj problem u pokusnim modelima pokušava riješiti transfekcijom stanica genom za ligand Fas<sup>368,369</sup> ili pak primjenom agonističkih protutijela usmjerenih na molekulu receptora Fas<sup>370</sup>. Međutim, zbog složenosti biološke uloge liganda Fas<sup>179,192</sup> tumačenje rezultata bi bilo prilično otežano. Naposljetku, ukoliko bismo željeli ispitati hipotezu da upravo limfociti T s pomoću Fas liganda reguliraju broj prethodničkih stanica koštanih loza u

koštanoj srži, prikladni bi bili miševi u kojima se gen za ligand Fas može ciljano inaktivirati u limfocitima T<sup>260</sup>.

## 6.7. Završna razmišljanja i poopćenje rezultata

Na temelju rezultata ovog istraživanja te razmatranja navedenih u prethodnim odjeljcima može se stvoriti sljedeća slika tkivnih zbivanja (Slika 25). Zbog nedostatka liganda Fas na limfocitima T životinje soja *gld* pate od složenog autoimunskog poremećaja koji uključuje nakupljanje dvostruko negativnih, memorijskih i naivnih limfocita T, poliklonsku pobudu limfocita T i limfocita B, pojačano lučenje citokina limfocita T, stvaranje niza protutijela usmjerenih na autoantigene te razvoj zloćudnih limfoma<sup>244-247,259,298</sup>. Nedostatak izražaja funkcionalnog liganda Fas na limfocitima T u mikrookolišu koštane srži dovodi do povećanja broja stromalnih stanica (slika 25-A). Povećanje broja stromalnih stanica, tj. stanica osteoblastne loze, dovodi do stvaranja veće količine OPG-a. Osim toga, OPG je, zbog kronične pobude, pojačano izražen i u imunskom sustavu (slika 25-B). OPG koji stvaraju osteoblasti i limfociti T usporava diferencijaciju i djelovanje osteoklasta (slika 25-C). Naposljetku, smanjeni broj osteoklasta uz povećani broj osteoblasta združeno dovode do povećanja koštane mase (slika 25-D).

Povećanje broja osteoblasta i smanjenje broja osteoklasta u miševa divljeg tipa tijekom parabioze s miševima soja *gld* omogućuje uvid u novi oblik povezanosti imunskog i koštanog sustava. Česta posljedica neprimjerene pobude imunskog sustava je koštana resorpcija i gubitak koštanog tkiva koji se temelje na osteoresorptivnom djelovanju brojnih molekula koje luče imunosne stanice<sup>70,75,86,324,336,371,372</sup>. Primjerice, imunosni sustav posreduje koštanoj razgradnji u postmenopauzalnoj osteoporozi<sup>373-375</sup>, reumatoidnom artritisu<sup>376</sup> i periodontopatiji<sup>377,378</sup>. Nasuprot tome, miševi s poremećajem *gld* su, koliko ja znam, jedini primjer koji ukazuje da pojačana pobuda imunskog sustava može dovesti i do povećanja koštane mase.



**Slika 27.** Predloženi mehanizam tkivnih zbivanja koja dovode do razvoja koštanog fenotipa u miševa s nedostatkom funkcionalnog liganda Fas. Nedostatak liganda Fas na limfocitima T dovodi do limfoproliferacije. Izražaj nefunkcionalne molekule liganda Fas na limfocitima T dovodi do povećanja broja osteoblastnih prethodnika u koštanoj srži (A). Kronično pobuđeni limfociti T te stanice osteoblastne loze izlučuju osteoprotegerin (OPG) (B). Posljedica pojačanog izražaja OPG-a je usporavanje diferencijacije i djelovanja osteoklasta (C). Smanjeni broj osteoklasta uz povećani broj osteoblasta združeno dovode do povećanja koštane mase (D).

Naposlijetku, moji rezultati potiču i na razmišljanje o liječenju autoimunskih bolesti presađivanjem koštane srži. Miševi soja *gld* model su za proučavanje rijetke ljudske bolesti – autoimunskog limfoproliferativnog sindroma (ALPS), poznatog i kao sindrom Canale-Smith<sup>379,380</sup>. Molekulska podloga sindroma ALPS je raznolika i uključuje mutacije gena za ligand Fas, receptor Fas, kaspazu 8 i kaspazu 10. Klinička slika se razvija u ranom djetinjstvu, a uključuje autoimunosne citopenije, limfadenopatiju i organomegaliju te povećanu sklonost razvoju zloćudnih novotvorina<sup>381,382</sup>. Također je pokazano kako je ALPS zapravo temeljna bolest većine ljudi kojima je prethodno bio dijagnosticiran Evansov sindrom – autoimunosna trombocitopenija i

anemija<sup>383</sup>. Ukupan broj objavljenih slučajeva ALPS-a se još uvijek izražava u stotinama pa nije poznato postoji li u bolesnika i koštani fenotip<sup>384</sup>. Nadalje, budući da umjereno povećanje koštane mase, poput onog u miševa soja *gld*, ne bi trebalo imati klinički značajnih posljedica, ne začuđuje nedostatak zanimanja za koštana zbivanja u tih bolesnika. Iako nemamo detaljan uvid u životnu prognozu bolesnika s ALPS-om<sup>384</sup>, kakvoća života im je značajno smanjena. Liječenje načelno nije usmjereno na limfoproliferativni poremećaj nego, ako postoje, na autoimunosna očitovanja bolesti. Jedan od tipova ALPS-a, ALPS o, kojemu je uzrok mutacija gena za receptor Fas<sup>384</sup> moguće je ispraviti presađivanjem koštane srži<sup>385</sup>. Rezultati mog istraživanja, pak, uljevaju nadu da bi presađivanje moglo biti učinkovito i u tipu Ib, u kojem je osnovni poremećaj mutacija gena za ligand Fas<sup>384</sup>.



## 7. ZAKLJUČCI

1. Parabiotsko spajanje miševa soja *gld* i miševa soja B6 dovelo je do brzog smanjenja udjela dvostruko negativnih limfocita T u limfnim tkivima miševa soja *gld*, uočljivog već nakon tjedan dana. Takvo smanjenje broja dvostruko negativnih stanica može se smatrati znakom povlačenja limfoproliferativne bolesti. Rezultati analize životinja koje su nakon mjesec dana parabioze živjele dva tjedna odvojene ukazuju na stalnost ublaženja limfoproliferacije postignutog parabiozom.

2. Nakon parabiotskog spajanja miša soja *gld* i miša soja B6, u miša soja B6 došlo je do povećanja udjela dvostruko negativnih limfocita T u limfnim organima. Dva tjedna nakon rastavljanja životinja, međutim, udjeli dvostruko negativnih limfocita T su se spustili na kontrolne vrijednosti, što znači da parabiozom nije moguće trajno prenijeti imunofenotip miša soja *gld* u miša soja B6.

3. Tjedan dana i četiri tjedna nakon parabiotskog spajanja došlo je do značajnog smanjenja broja osteoklasta u kulturi stanica koštane srži miševa soja B6 koji su bili u spojeni s miševima soja *gld*. Pri tome su se brojevi osteoklasta u srži miševa soja B6 koji su bili spojeni s miševima soja *gld* smanjili do vrijednosti tipičnih za soj *gld*. S druge strane, nije opažena promjena broja osteoklasta u srži miševa soja *gld* koji su bili spojeni s miševima soja B6. Prema tome, promjena imunofenotipa miša soja B6 tijekom parabioze praćena je promjenom osteoklastogeničnog potencijala koštane srži.

4. Četiri tjedna nakon operacije, broj kolonija stanica osteoblastne loze u staničnim kulturama koštane srži miševa soja B6 koji su bili spojeni s miševima soja *gld* značajno je narastao i time postao blizak vrijednostima u miševa soja *gld*. Broj staničnih kolonija osteoblastne loze u staničnim kulturama srži miševa soja *gld* nije se promijenio i ostao je sličan broju u kontrolnih životinja soja *gld*. Može se zaključiti da se nakon mjesec dana parabioze imunosni, ali i koštani

fenotip miševa soja B6 koji su bili u parabiozi s miševima soja *gld* mijenjaju prema fenotipu miševa soja *gld*.

5. U miševa soja B6 tijekom parabioze s miševima soja *gld* došlo je do porasta izražaja mRNA za OPG u kosti te povećanja koncentracije bjelančevine OPG u kosti, a takve promjene su se održale i nakon razdvajanja životinja. Dakle, istovremeno s promjenama imunosnog sustava tijekom parabioze dolazi i do promjena izražaja citokina OPG u kosti.

6. Izražaj OPG-a u koštanoj srži nije pronađen ni na genskoj niti na bjelančevinskoj razini. Taj rezultat je vjerojatno posljedica pripreme uzorka koštane srži propuhivanjem, pri čemu stanice koje proizvode najveće količine OPG-a (osteoblasti) ostaju priljubljene uz kost.

7. Pojačanje izražaja OPG-a u kosti miševa soja B6 nakon parabiotskog spajanja s miševima soja *gld* u skladu je s rezultatima stanične kulture. Veći broj zrelih stanica osteoblastne loze mogao je stvoriti i više OPG-a koji je potom zakočio diferencijaciju stanica osteoklastne loze zbog nedostatka funkcije apoptotskog puta ligand Fas – Fas.

8. Na temelju provedenih pokusa može se zaključiti da tijekom parabioze dolazi do prijenosa imunosnog, ali i koštanog fenotipa s miša soja *gld* u miša divljeg tipa te da su promjene u mišu divljeg tipa pri tome dijelom posredovane i citokinom OPG. Ti rezultati ukazuju na imunosnu komponentu koštanog fenotipa miševa soja *gld*. Istovremeno nije bilo promjene koštanog fenotipa miševa soja *gld*, unatoč ublaženju limfoproliferacije tijekom parabioze. Taj, pak, rezultat govori u prilog neposredne uloge liganda Fas u homeostazi koštanog sustava.

## 8. SAŽETAK

Miševi s mutacijom gena za ligand Fas (soj *gld*) boluju od općeg limfoproliferativnog poremećaja, obilježenog nakupljanjem dvostruko negativnih (DN; CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) limfocita T, te imaju veću koštanu gustoću i više trabekularne kosti. Kako bismo procijenili ulogu imunskog sustava u nastanku koštanog fenotipa miševa *gld*, parabiotiski smo ih spojili s miševima divljeg tipa (C57BL/6, B6) te kroz mjesec dana žrtvovali svaki tjedan, odnosno nakon mjesec dana rastavili te žrtvovali nakon dodatna dva tjedna. Limfoproliferativni poremećaj u miševa soja *gld* ublažen je već tjedan dana nakon početka parabioze te je poboljšanje bilo vidljivo i nakon rastavljanja životinja. U miševa soja B6 je tijekom parabioze došlo do porasta broja DN limfocita T u tkivima, što znači da im se imunofenotip približio onome u miševa soja *gld*. Usporedno s imunofenotipom je u miševa soja B6 promijenjen i koštani fenotip i to u smjeru nalaza tipičnih za soj *gld*. Jedan i četiri tjedna nakon parabiotskog spajanja je u staničnoj kulturi koštane srži miševa soja B6 došlo do smanjenja broja osteoklastnih prethodnika, a k tome se četiri tjedna nakon operacije povećao broj osteoblastnih prethodnika. Promjene u koštanoj srži miševa soja B6, tijekom parabioze, bile su praćene i povećanjem izražaja citokina osteoprotegerina u kosti, na genskoj i bjelančevinskoj razini, što ukazuje da je osteoprotegerin bio poveznica imunskog i koštanog fenotipa. Istovremeni prijenos imunskog i koštanog fenotipa s miša soja *gld* u miša soja B6 upućuje na postojanje imunskog komponente koštanog fenotipa miševa soja *gld*. S druge strane, izostanak promjena u koštanoj srži miševa *gld* tijekom parabioze pokazuje da ligand Fas ima neposrednu ulogu u oblikovanju koštanog fenotipa miševa soja *gld*.

## 9. SUMMARY

Ivan Krešimir Lukić, MD: *Mechanism of development of bone phenotype in murine generalised lymphoproliferative disorder; 2005*

Mice with mutation in the Fas-ligand gene develop generalised lymphoproliferative disorder (*gld* mice), characterised by accumulation of double negative (DN) T cells (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), as well as higher bone mineral density and more trabecular bone. To evaluate the role of immune system in the development of bone phenotype of *gld* mice, we parabiotically joined the wild-type (C57BL/6, B6) with *gld* mice. The mice were sacrificed weekly for four weeks. Additionally, the mice were separated after four weeks and sacrificed two weeks after separation. Lymphoproliferative disorder was suppressed in *gld* mice during the first week and the suppression was evident even after the animals were separated. The proportion of DN T cells in the lymphoid tissues of B6 increased during parabiosis, suggesting that the immune phenotype of B6 mice became similar to that of *gld* mice. At the same time, the bone phenotype of B6 animals shifted towards the *gld* bone phenotype. The number of osteoclast precursors in the cell culture of B6 bone marrow decreased at one and four weeks, while the number of osteoblast precursors increased at four weeks after parabiosis. The alterations of B6 bone marrow during parabiosis were paralleled by increased expression of cytokine osteoprotegerin in the bone, both at the gene and the protein levels, suggesting that osteoprotegerin was the link between the bone and immune phenotype. Simultaneous transfer of both immune and bone phenotype from *gld* to B6 mice point to the immune component of *gld* bone phenotype. On the other hand, lack of changes in the bone marrow of *gld* mice during parabiosis indicated that Fas-ligand has a direct role in the formation of bone phenotype of *gld* mice.

## 10. LITERATURA

1. Frost HM. Tetracycline bone labeling in anatomy. *Am J Phys Anthropol* 1968;**29**(2):183-95.
2. Vigorita VJ. Orthopaedic pathology. Philadelphia: J.B. Lippincot Co., 1998.
3. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;**289**(5484):1501-4.
4. Aubin JE. The role of osteoblasts. In: Henderson JE, Goltzman D, eds. The osteoporosis primer. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 18-36.
5. Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;**35**(9):1301-5.
6. Aubin JE, Triffitt JT. Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of bone biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002: 59-81.
7. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988;**10**:63-76.
8. Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med* 2005;**56**:509-38.
9. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;**284**(5411):143-7.
10. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001;**414**(6859):118-21.
11. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 2000;**105**(12):1663-8.
12. Dominici M, Pritchard C, Garlits JE, Hofmann TJ, Persons DA, Horwitz EM. Hematopoietic cells and osteoblasts are derived from a common marrow progenitor after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**(32):11761-6.
13. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002;**8**(3):147-59.
14. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;**89**(5):747-54.
15. Kobayashi T, Kronenberg H. Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology* 2005;**146**(3):1012-7.
16. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. Regulation of chondrocyte differentiation by *Cbfa1*. *Mech Dev* 1999;**80**(2):159-70.
17. D'Souza RN, Aberg T, Gaikwad J, et al. *Cbfa1* is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 1999;**126**(13):2911-20.
18. Desbois C, Hogue DA, Karsenty G. The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J Biol Chem* 1994;**269**(2):1183-90.
19. Ducy P, Desbois C, Boyce B, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996;**382**(6590):448-52.
20. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;**150**(698):893-9.
21. Capdevila J, Izpisua Belmonte JC. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;**17**:87-132.
22. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2002;**2**(4):389-406.

23. Hock JM, Fitzpatrick LA, Bilezikian JP. Actions of parathyroid hormone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of bone biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002: 463-481.
24. Boyden LM, Mao J, Belsky J, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002;**346**(20):1513-21.
25. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* 2002;**70**(1):11-9.
26. Kato M, Patel MS, Lévassieur R, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 2002;**157**(2):303-14.
27. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;**20**:781-810.
28. Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;**349**(26):2483-94.
29. Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med* 2000;**108**(2):153-64.
30. Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 1995;**136**(8):3632-8.
31. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res* 2001;**16**(9):1575-82.
32. Compston JE. Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol* 2002;**173**(3):387-94.
33. Rho J, Takami M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the immune and skeletal systems. *Mol Cells* 2004;**17**(1):1-9.
34. Mullender MG, Huiskes R. Osteocytes and bone lining cells: which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone? *Bone* 1997;**20**(6):527-32.
35. Nijweide P, Burger EH, Klain-Nulend J. The osteocyte. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of bone biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002: 93-107.
36. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;**425**(6960):836-41.
37. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;**425**(6960):841-6.
38. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;**118**(2):149-61.
39. Visnjic D, Kalajzic I, Gronowicz G, et al. Conditional ablation of the osteoblast lineage in Col2.3deltatg transgenic mice. *J Bone Miner Res* 2001;**16**(12):2222-31.
40. Marriott I, Gray DL, Tranguch SL, et al. Osteoblasts express the inflammatory cytokine interleukin-6 in a murine model of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and infected human bone tissue. *Am J Pathol* 2004;**164**(4):1399-406.

41. Gasper NA, Petty CC, Schrum LW, Marriott I, Bost KL. Bacterium-induced CXCL10 secretion by osteoblasts can be mediated in part through toll-like receptor 4. *Infect Immun* 2002;**70**(8):4075-82.
42. Bost KL, Bento JL, Ellington JK, Marriott I, Hudson MC. Induction of colony-stimulating factor expression following Staphylococcus or Salmonella interaction with mouse or human osteoblasts. *Infect Immun* 2000;**68**(9):5075-83.
43. Bost KL, Bento JL, Petty CC, Schrum LW, Hudson MC, Marriott I. Monocyte chemoattractant protein-1 expression by osteoblasts following infection with Staphylococcus aureus or Salmonella. *J Interferon Cytokine Res* 2001;**21**(5):297-304.
44. Marriott I. Osteoblast responses to bacterial pathogens: a previously unappreciated role for bone-forming cells in host defense and disease progression. *Immunol Res* 2004;**30**(3):291-308.
45. Riley JL, June CH. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 2005;**105**(1):13-21.
46. Suh WK, Wang SX, Jheon AH, et al. The immune regulatory protein B7-H3 promotes osteoblast differentiation and bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**(35):12969-73.
47. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;**289**(5484):1504-8.
48. Pap T, Claus A, Ohtsu S, et al. Osteoclast-independent bone resorption by fibroblast-like cells. *Arthritis Res Ther* 2003;**5**(3):R163-73.
49. Katavic V, Grecevic D, Lee SK, et al. The surface antigen CD45R identifies a population of estrogen-regulated murine marrow cells that contain osteoclast precursors. *Bone* 2003;**32**(6):581-90.
50. Horowitz MC, Xi Y, Pflugh DL, et al. Pax5-deficient mice exhibit early onset osteopenia with increased osteoclast progenitors. *J Immunol* 2004;**173**(11):6583-91.
51. Horowitz MC, Lorenzo JA. The origins of osteoclasts. *Curr Opin Rheumatol* 2004;**16**(4):464-8.
52. Blin-Wakkach C, Wakkach A, Rochet N, Carle GF. Characterization of a novel bipotent hematopoietic progenitor population in normal and osteopetrotic mice. *J Bone Miner Res* 2004;**19**(7):1137-43.
53. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;**423**(6937):337-42.
54. Li YP, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat Genet* 1999;**23**(4):447-51.
55. Toyomura T, Oka T, Yamaguchi C, Wada Y, Futai M. Three subunit a isoforms of mouse vacuolar H(+)-ATPase. Preferential expression of the a3 isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 2000;**275**(12):8760-5.
56. Zaidi M, Troen B, Moonga BS, Abe E. Cathepsin K, osteoclastic resorption, and osteoporosis therapy. *J Bone Miner Res* 2001;**16**(10):1747-9.
57. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982;**34**(3):285-90.
58. Kaye M. When is it an osteoclast? *J Clin Pathol* 1984;**37**(4):398-400.
59. Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. Acid phosphatases. *Mol Pathol* 2002;**55**(2):65-72.

60. Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, et al. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development* 1996;**122**(10):3151-62.
61. Fujikawa Y, Sabokbar A, Neale SD, Itonaga I, Torisu T, Athanasou NA. The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. *Bone* 2001;**28**(3):261-7.
62. Hayashi S, Miyamoto A, Yamane T, et al. Osteoclast precursors in bone marrow and peritoneal cavity. *J Cell Physiol* 1997;**170**(3):241-7.
63. Miyamoto T, Arai F, Ohneda O, Takagi K, Anderson DM, Suda T. An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. *Blood* 2000;**96**(13):4335-43.
64. Zaidi M, Blair HC, Moonga BS, Abe E, Huang CL. Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics. *J Bone Miner Res* 2003;**18**(4):599-609.
65. Baron R. Arming the osteoclast. *Nat Med* 2004;**10**(5):458-60.
66. Koga T, Inui M, Inoue K, et al. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 2004;**428**(6984):758-63.
67. Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 2005;**83**(3):170-9.
68. Hill PA. Bone remodelling. *Br J Orthod* 1998;**25**(2):101-7.
69. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000;**289**(5484):1508-14.
70. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;**15**(6):457-75.
71. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, et al. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* 1988;**122**(4):1373-82.
72. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 1993;**91**(1):257-63.
73. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;**93**(2):165-76.
74. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;**89**(2):309-19.
75. Walsh MC, Choi Y. Biology of the TRANCE axis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;**14**(3-4):251-63.
76. Murakami T, Yamamoto M, Ono K, et al. Transforming growth factor-beta1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;**252**(3):747-52.
77. Bell NH. RANK ligand and the regulation of skeletal remodeling. *J Clin Invest* 2003;**111**(8):1120-2.
78. Locklin RM, Khosla S, Turner RT, Riggs BL. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 2003;**89**(1):180-90.



79. Zaidi M, Moonga B, Moss DW, MacIntyre I. Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;**159**(1):68-71.
80. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 2002;**416**(6882):744-9.
81. Yamada T, Yamazaki H, Yamane T, et al. Regulation of osteoclast development by Notch signaling directed to osteoclast precursors and through stromal cells. *Blood* 2003;**101**(6):2227-34.
82. Suda K, Woo JT, Takami M, Sexton PM, Nagai K. Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF-alpha, IL-1, and RANKL. *J Cell Physiol* 2002;**190**(1):101-8.
83. Fox SW, Fuller K, Chambers TJ. Activation of osteoclasts by interleukin-1: divergent responsiveness in osteoclasts formed in vivo and in vitro. *J Cell Physiol* 2000;**184**(3):334-40.
84. Fuller K, Murphy C, Kirstein B, Fox SW, Chambers TJ. TNFalpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology* 2002;**143**(3):1108-18.
85. Kudo O, Fujikawa Y, Itonaga I, Sabokbar A, Torisu T, Athanasou NA. Proinflammatory cytokine (TNFalpha/IL-1alpha) induction of human osteoclast formation. *J Pathol* 2002;**198**(2):220-7.
86. Theoleyre S, Wittrant Y, Couillaud S, et al. Cellular activity and signaling induced by osteoprotegerin in osteoclasts: involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and MAPK. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1644**(1):1-7.
87. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;**15**(1):49-60.
88. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 2005;**115**(2):282-90.
89. Okamoto Y, Kim D, Battaglini R, Sasaki H, Spate U, Stashenko P. MIP-1 gamma promotes receptor-activator-of-NF-kappa-B-ligand-induced osteoclast formation and survival. *J Immunol* 2004;**173**(3):2084-90.
90. Lean JM, Murphy C, Fuller K, Chambers TJ. CCL9/MIP-1gamma and its receptor CCR1 are the major chemokine ligand/receptor species expressed by osteoclasts. *J Cell Biochem* 2002;**87**(4):386-93.
91. Watanabe T, Kukita T, Kukita A, et al. Direct stimulation of osteoclastogenesis by MIP-1alpha: evidence obtained from studies using RAW264 cell clone highly responsive to RANKL. *J Endocrinol* 2004;**180**(1):193-201.
92. Roodman GD, Choi SJ. MIP-1 alpha and myeloma bone disease. *Cancer Treat Res* 2004;**118**:83-100.
93. Giuliani N, Colla S, Rizzoli V. New insight in the mechanism of osteoclast activation and formation in multiple myeloma: focus on the receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL). *Exp Hematol* 2004;**32**(8):685-91.
94. Lam J, Nelson CA, Ross FP, Teitelbaum SL, Fremont DH. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity. *J Clin Invest* 2001;**108**(7):971-9.
95. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their

- differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001;**142**(4):1419-26.
96. Ikeda T, Kasai M, Suzuki J, et al. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2003;**278**(47):47217-22.
97. Bharti AC, Aggarwal BB. Ranking the role of RANK ligand in apoptosis. *Apoptosis* 2004;**9**(6):677-90.
98. Wittrant Y, Couillaud S, Theoleyre S, Dunstan C, Heymann D, Redini F. Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;**293**(1):38-44.
99. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998;**273**(23):14363-7.
100. Standal T, Seidel C, Hjertner O, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 2002;**100**(8):3002-7.
101. Johnson ML, Harnish K, Nusse R, Van Hul W. LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. *J Bone Miner Res* 2004;**19**(11):1749-57.
102. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 1998;**13**(5):793-802.
103. Noble B. Bone microdamage and cell apoptosis. *Eur Cell Mater* 2003;**6**:46-55; discussion 55.
104. Clohisy DR. Could apoptosis be responsible for localized imbalances in bone cell homeostasis? *J Lab Clin Med* 1999;**134**(3):190-1.
105. Boyce B, Xing L, Jilka RL, et al. Apoptosis in bone cells. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of bone biology. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002: 151-168.
106. Kameda T, Mano H, Yuasa T, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 1997;**186**(4):489-95.
107. Kousteni S, Chen JR, Bellido T, et al. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* 2002;**298**(5594):843-6.
108. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**(9):3128-35.
109. Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* 1998;**13**(8):1243-50.
110. Clarke PGH. Apoptosis versus necrosis. In: Koliatsos VE, Ratan RR, eds. Cell death and diseases of the nervous system. Totowa (NJ): Humana Press, Inc., 1999: 3-28.
111. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004;**4**(8):592-603.
112. Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**(6):2239-44.
113. Wu M, Ding H-F, Fisher DE. Apoptosis: Molecular mechanisms. Encyclopedia of life sciences. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons., Ltd., 2001.
114. Gobe G, Harmon B. Apoptosis: Morphological criteria and other assays. Encyclopedia of life sciences. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons., Ltd., 2001.
115. Garrido C, Kroemer G. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2004;**16**(6):639-46.

116. Graves JD, Craxton A, Clark EA. Modulation and function of caspase pathways in B lymphocytes. *Immunol Rev* 2004;**197**:129-46.
117. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, et al. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 2003;**11**(2):529-41.
118. Marsden VS, Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol* 2003;**21**:71-105.
119. Su H, Bidere N, Zheng L, et al. Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* 2005;**307**(5714):1465-8.
120. McDonald RE, El-Deiry WS. Mammalian cell death pathways: Intrinsic and extrinsic. In: El-Deiry WS, ed. *Death receptors in cancer therapy*. Totowa (NJ): Humana Press, Inc., 2005: 1-43.
121. Gervais FG, Singaraja R, Xanthoudakis S, et al. Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hipp1. *Nat Cell Biol* 2002;**4**(2):95-105.
122. Breckenridge DG, Nguyen M, Kuppig S, Reth M, Shore GC. The procaspase-8 isoform, procaspase-8L, recruited to the BAP31 complex at the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(7):4331-6.
123. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000;**403**(6765):98-103.
124. Bratton SB, Cohen GM. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci* 2001;**22**(6):306-15.
125. Lockshin RA, Zakeri Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene* 2004;**23**(16):2766-73.
126. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;**90**(3):405-13.
127. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001;**15**(22):2922-33.
128. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. 3rd ed. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons., Inc., 2004.
129. Hymowitz SG, de Vos AM. Structures of TNF receptors and their interactions with ligands. In: El-Deiry WS, ed. *Death receptors in cancer therapy*. Totowa (NJ): Humana Press, Inc., 2005: 65-83.
130. Fulda S, Debatin KM. Signaling through death receptors in cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2004;**4**(4):327-32.
131. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;**16**(1):35-53.
132. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**(9):745-56.
133. Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* 2004;**21**(4):461-5.
134. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003;**114**(2):181-90.
135. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;**14**(3-4):193-209.
136. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;**75**(6):1169-78.

137. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002;**2**(6):401-9.
138. French LE, Hahne M, Viard I, et al. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J Cell Biol* 1996;**133**(2):335-43.
139. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, et al. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996;**274**(5291):1363-6.
140. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996;**184**(3):1075-82.
141. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, et al. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996;**2**(12):1361-6.
142. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 1995;**377**(6550):630-2.
143. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995;**270**(5239):1189-92.
144. Houston A, O'Connell J. The Fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2004;**4**(4):321-6.
145. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;**66**(2):233-43.
146. Sharma K, Wang RX, Zhang LY, et al. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther* 2000;**88**(3):333-47.
147. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;**267**(5203):1449-56.
148. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**(6):420-30.
149. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993;**268**(15):10932-7.
150. Fesik SW. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 2000;**103**(2):273-82.
151. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995;**14**(6):1129-35.
152. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 1998;**4**(1):31-6.
153. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 1997;**186**(12):2045-50.
154. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998;**187**(8):1205-13.
155. Hohlbaum AM, Moe S, Marshak-Rothstein A. Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J Exp Med* 2000;**191**(7):1209-20.
156. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;**14**(1):53-66.

157. Yokota A, Takeuchi E, Iizuka M, Ikegami Y, Takayama H, Shinohara N. Prominent dominant negative effect of a mutant Fas molecule lacking death domain on cell-mediated induction of apoptosis. *Mol Immunol* 2005;**42**(1):71-8.
158. Jenkins M, Keir M, McCune JM. A membrane-bound Fas decoy receptor expressed by human thymocytes. *J Biol Chem* 2000;**275**(11):7988-93.
159. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000;**288**(5475):2351-4.
160. Papoff G, Hausler P, Eramo A, et al. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 1999;**274**(53):38241-50.
161. Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, et al. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 2004;**200**(3):353-65.
162. Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 2002;**22**(1):207-20.
163. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002;**7**(4):313-9.
164. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**(20):10964-7.
165. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 2003;**15**(3):185-93.
166. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;**17**(6):1675-87.
167. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;**94**(4):491-501.
168. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;**94**(4):481-90.
169. Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* 1999;**190**(12):1891-6.
170. Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sekaly RP. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* 1999;**190**(12):1879-90.
171. Wilhelm S, Wagner H, Hacker G. Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur J Immunol* 1998;**28**(3):891-900.
172. Wajant H, Haas E, Schwenzer R, et al. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem* 2000;**275**(32):24357-66.
173. Manos EJ, Jones DA. Assessment of tumor necrosis factor receptor and Fas signaling pathways by transcriptional profiling. *Cancer Res* 2001;**61**(2):433-8.
174. Newell MK, Desbarats J. Fas ligand: receptor or ligand? *Apoptosis* 1999;**4**(5):311-5.
175. Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;**15**(5):353-66.

176. Hahne M, Peitsch MC, Irmeler M, et al. Characterization of the non-functional Fas ligand of gld mice. *Int Immunol* 1995;**7**(9):1381-6.
177. Boursalian TE, Fink PJ. Mutation in fas ligand impairs maturation of thymocytes bearing moderate affinity T cell receptors. *J Exp Med* 2003;**198**(2):349-60.
178. Suzuki I, Fink PJ. Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J Exp Med* 1998;**187**(1):123-8.
179. Brunner T, Wasem C, Torgler R, Cima I, Jakob S, Corazza N. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* 2003;**15**(3):167-76.
180. Sabelko-Downes KA, Russell JH. The role of fas ligand in vivo as a cause and regulator of pathogenesis. *Curr Opin Immunol* 2000;**12**(3):330-5.
181. Green DR, Ferguson TA. The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;**2**(12):917-24.
182. Cefai D, Schwaninger R, Balli M, Brunner T, Gimmi CD. Functional characterization of Fas ligand on tumor cells escaping active specific immunotherapy. *Cell Death Differ* 2001;**8**(7):687-95.
183. Chen JJ, Sun Y, Nabel GJ. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science* 1998;**282**(5394):1714-7.
184. Suzuki A, Enari M, Eguchi Y, et al. Involvement of Fas in regression of vaginal epithelia after ovariectomy and during an estrous cycle. *EMBO J* 1996;**15**(2):211-15.
185. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998;**280**(5361):243-8.
186. De Maria R, Testa U, Luchetti L, et al. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood* 1999;**93**(3):796-803.
187. Breuil V, Schmid-Antomarchi H, Schmid-Alliana A, Rezzonico R, Euller-Ziegler L, Rossi B. The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes. *FASEB J* 2003;**17**(12):1751-3.
188. Kishimoto H, Surh CD, Sprent J. A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 1998;**187**(9):1427-38.
189. Kishimoto H, Sprent J. A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat Immunol* 2001;**2**(11):1025-31.
190. Trimble LA, Prince KA, Pestano GA, Daley J, Cantor H. Fas-dependent elimination of nonselected CD8 cells and lpr disease. *J Immunol* 2002;**168**(10):4960-7.
191. Suda T, Nagata S. Why do defects in the Fas-Fas ligand system cause autoimmunity? *J Allergy Clin Immunol* 1997;**100**(6 Pt 2):S97-101.
192. Lee HO, Ferguson TA. Biology of FasL. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;**14**(3-4):325-35.
193. Wong B, Arron J, Choi Y. T cell receptor signals enhance susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 1997;**186**(11):1939-44.
194. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995;**373**(6513):441-4.
195. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995;**373**(6513):438-41.
196. Ju ST, Panka DJ, Cui H, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 1995;**373**(6513):444-8.

197. Askenasy N, Yolcu ES, Yaniv I, Shirwan H. Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator. *Blood* 2005;**105**(4):1396-404.
198. Strasser A, Pellegrini M. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol* 2004;**25**(11):610-5.
199. Gorbachev AV, Fairchild RL. CD4+ T cells regulate CD8+ T cell-mediated cutaneous immune responses by restricting effector T cell development through a Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol* 2004;**172**(4):2286-95.
200. Daniel PT, Krammer PH. Activation induces sensitivity toward APO-1 (CD95)-mediated apoptosis in human B cells. *J Immunol* 1994;**152**(12):5624-32.
201. Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, et al. CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 1995;**376**(6536):181-4.
202. Arai H, Gordon D, Nabel EG, Nabel GJ. Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**(25):13862-7.
203. Mizuno T, Zhong X, Rothstein TL. Fas-induced apoptosis in B cells. *Apoptosis* 2003;**8**(5):451-60.
204. Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 1996;**87**(2):319-29.
205. Minagawa R, Okano S, Tomita Y, et al. The critical role of Fas-Fas ligand interaction in donor-specific transfusion-induced tolerance to H-Y antigen. *Transplantation* 2004;**78**(6):799-806.
206. Dalton JE, Howell G, Pearson J, Scott P, Carding SR. Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells. *J Immunol* 2004;**173**(6):3660-7.
207. Chen A, Xu H, Choi Y, Wang B, Zheng G. TRANCE counteracts FasL-mediated apoptosis of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cellular Immunology* 2005;**231**.
208. D'Alessio A, Riccioli A, Lauretti P, et al. Testicular FasL is expressed by sperm cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**(6):3316-21.
209. Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA, Miller L. Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol* 1997;**158**(9):4122-8.
210. Frangsmyr L, Baranov V, Nagaeva O, Stendahl U, Kjellberg L, Mincheva-Nilsson L. Cytoplasmic microvesicular form of Fas ligand in human early placenta: switching the tissue immune privilege hypothesis from cellular to vesicular level. *Mol Hum Reprod* 2005;**11**(1):35-41.
211. Pinkoski MJ, Droin NM, Lin T, Genestier L, Ferguson TA, Green DR. Nonlymphoid Fas ligand in peptide-induced peripheral lymphocyte deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(25):16174-9.
212. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 1994;**370**(6491):650-2.
213. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994;**265**(5171):528-30.
214. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;**150**(1):76-85.

215. Bossi G, Griffiths GM. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* 1999;**5**(1):90-6.
216. Kojima Y, Kawasaki-Koyanagi A, Sueyoshi N, Kanai A, Yagita H, Okumura K. Localization of Fas ligand in cytoplasmic granules of CD8+ cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells: participation of Fas ligand in granule exocytosis model of cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;**296**(2):328-36.
217. Riera L, Gariglio M, Pagano M, Gaiola O, Simon MM, Landolfo S. Control of murine cytomegalovirus replication in salivary glands during acute infection is independent of the Fas ligand/Fas system. *New Microbiol* 2001;**24**(3):231-8.
218. Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med* 1997;**3**(4):409-13.
219. Hayashi N, Mita E. Fas system and apoptosis in viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;**12**(9-10):S223-6.
220. Shin JN, Seo YW, Kim M, et al. Cisplatin inactivation of caspases inhibits death ligand-induced cell death in vitro and fulminant liver damage in mice. *J Biol Chem* 2005;**280**(11):10509-15.
221. Theofilopoulos AN, Balderas RS, Gozes Y, et al. Association of lpr gene with graft-vs.-host disease-like syndrome. *J Exp Med* 1985;**162**(1):1-18.
222. Su X, Hu Q, Kristan JM, et al. Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *J Immunol* 2000;**164**(5):2523-32.
223. Li NL, Nie H, Yu QW, et al. Role of soluble Fas ligand in autoimmune diseases. *World J Gastroenterol* 2004;**10**(21):3151-6.
224. Giroux M, Denis F. CD1d-unrestricted human NKT cells release chemokines upon Fas engagement. *Blood* 2005;**105**(2):703-10.
225. Rescigno M, Piguet V, Valzasina B, et al. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med* 2000;**192**(11):1661-8.
226. Ma Y, Liu H, Tu-Rapp H, et al. Fas ligation on macrophages enhances IL-1R1-Toll-like receptor 4 signaling and promotes chronic inflammation. *Nat Immunol* 2004;**5**(4):380-7.
227. Newton K, Harris AW, Bath ML, Smith KG, Strasser A. A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO J* 1998;**17**(3):706-18.
228. Walsh CM, Wen BG, Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Dixit VM, Hedrick SM. A role for FADD in T cell activation and development. *Immunity* 1998;**8**(4):439-49.
229. Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 1998;**392**(6673):296-300.
230. Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, et al. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* 1993;**178**(6):2231-5.
231. Thome M, Hofmann K, Burns K, et al. Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol* 1998;**8**(15):885-8.



232. Juttler E, Tarabin V, Schwaninger M. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *Neuroscientist* 2002;**8**(3):268-75.
233. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994;**56**(5):559-64.
234. Dybedal I, Yang L, Bryder D, Aastrand-Grundstrom I, Leandersson K, Jacobsen SE. Human reconstituting hematopoietic stem cells up-regulate Fas expression upon active cell cycling but remain resistant to Fas-induced suppression. *Blood* 2003;**102**(1):118-26.
235. Maurillo L, Del Poeta G, Venditti A, et al. Quantitative analysis of Fas and bcl-2 expression in hematopoietic precursors. *Haematologica* 2001;**86**(3):237-43.
236. Josefsen D, Myklebust JH, Lynch DH, Stokke T, Blomhoff HK, Smeland EB. Fas ligand promotes cell survival of immature human bone marrow CD34+CD38- hematopoietic progenitor cells by suppressing apoptosis. *Exp Hematol* 1999;**27**(9):1451-9.
237. Barcena A, Muench MO, Song KS, Ohkubo T, Harrison MR. Role of CD95/Fas and its ligand in the regulation of the growth of human CD34(++)CD38(-) fetal liver cells. *Exp Hematol* 1999;**27**(9):1428-39.
238. Alenzi FQ, Marley SB, Lewis JL, et al. A role for the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in regulating myeloid progenitor cell kinetics. *Exp Hematol* 2002;**30**(12):1428-35.
239. Kaplan HJ, Leibole MA, Tezel T, Ferguson TA. Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina. *Nat Med* 1999;**5**(3):292-7.
240. Sata M, Walsh K. TNFalpha regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. *Nat Med* 1998;**4**(4):415-20.
241. Lambert C, Landau AM, Desbarats J. Fas-beyond death: a regenerative role for Fas in the nervous system. *Apoptosis* 2003;**8**(6):551-62.
242. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994;**76**(6):969-76.
243. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992;**356**(6367):314-7.
244. Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991;**9**:243-69.
245. Davidson WF, Giese T, Fredrickson TN. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med* 1998;**187**(11):1825-38.
246. Davidson WF, Calkins C, Hugins A, Giese T, Holmes KL. Cytokine secretion by C3H-lpr and -gld T cells. Hypersecretion of IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha by stimulated CD4+ T cells. *J Immunol* 1991;**146**(12):4138-48.
247. Giese T, Davidson WF. Evidence for early onset, polyclonal activation of T cell subsets in mice homozygous for lpr. *J Immunol* 1992;**149**(9):3097-106.
248. Reap EA, Piecyk ML, Oliver A, et al. Phenotypic abnormalities of splenic and bone marrow B cells in lpr and gld mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;**78**(1):21-9.

249. Morse HC, 3rd, Davidson WF, Yetter RA, Murphy ED, Roths JB, Coffman RL. Abnormalities induced by the mutant gene *lpr*: expansion of a unique lymphocyte subset. *J Immunol* 1982;**129**(6):2612-5.
250. Cohen PL, Eisenberg RA. The *lpr* and *gld* genes in systemic autoimmunity: life and death in the Fas lane. *Immunol Today* 1992;**13**(11):427-8.
251. Sobel ES, Kakkanaiah VN, Rapoport RG, Eisenberg RA, Cohen PL. The abnormal *lpr* double-negative T cell fails to proliferate in vivo. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;**74**(2):177-84.
252. Giese T, Allison JP, Davidson WF. Functionally anergic *lpr* and *gld* B220+ T cell receptor (TCR)-alpha/beta+ double-negative T cells express CD28 and respond to costimulation with phorbol myristate acetate and antibodies to CD28 and the TCR. *J Immunol* 1993;**151**(2):597-609.
253. Clements JL, Winslow G, Donahue C, Cooper SM, Allison JP, Budd RC. Costimulation via CD28 induces activation of a refractory subset of MRL-*lpr/lpr* T lymphocytes. *Int Immunol* 1993;**5**(11):1451-60.
254. Budd RC, Schumacher JH, Winslow G, Mosmann TR. Elevated production of interferon-gamma and interleukin 4 by mature T cells from autoimmune *lpr* mice correlates with Pgp-1 (CD44) expression. *Eur J Immunol* 1991;**21**(4):1081-4.
255. Sobel ES, Cohen PL, Eisenberg RA. *lpr* T cells are necessary for autoantibody production in *lpr* mice. *J Immunol* 1993;**150**(9):4160-7.
256. Watanabe D, Suda T, Hashimoto H, Nagata S. Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders. *EMBO J* 1995;**14**(1):12-8.
257. Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B. B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol* 2005;**174**(4):1775-81.
258. Weintraub JP, Cohen PL. Ectopic expression of B7-1 (CD80) on T lymphocytes in autoimmune *lpr* and *gld* mice. *Clin Immunol* 1999;**91**(3):302-9.
259. Aranami T, Iclozan C, Iwabuchi K, Onoe K. IL-7-dependent homeostatic proliferation in the presence of a large number of T cells in *gld* mice. *Microbiol Immunol* 2004;**48**(6):477-84.
260. Hao Z, Hampel B, Yagita H, Rajewsky K. T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2004;**199**(10):1355-65.
261. Watson ML, Rao JK, Gilkeson GS, et al. Genetic analysis of MRL-*lpr* mice: relationship of the Fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci. *J Exp Med* 1992;**176**(6):1645-56.
262. Wang Y, Nose M, Kamoto T, Nishimura M, Hiai H. Host modifier genes affect mouse autoimmunity induced by the *lpr* gene. *Am J Pathol* 1997;**151**(6):1791-8.
263. Matsuzawa A, Shimizu M, Takeda Y, Nagase H, Sayama K, Kimura M. Significant role of Fas ligand-binding but defective Fas receptor (CD95) in lymph node hyperplasia composed of abnormal double-negative T cells. *Immunology* 2002;**106**(4):470-5.
264. Mixter PF, Russell JQ, Durie FH, Budd RC. Decreased CD4-CD8- TCR-alpha beta + cells in *lpr/lpr* mice lacking beta 2-microglobulin. *J Immunol* 1995;**154**(5):2063-74.
265. Merino R, Fossati L, Iwamoto M, et al. Effect of long-term anti-CD4 or anti-CD8 treatment on the development of *lpr* CD4- CD8- double negative T cells and of the autoimmune syndrome in MRL-*lpr/lpr* mice. *J Autoimmun* 1995;**8**(1):33-45.

266. Renno T, Attinger A, Rimoldi D, Hahne M, Tschopp J, MacDonald HR. Expression of B220 on activated T cell blasts precedes apoptosis. *Eur J Immunol* 1998;**28**(2):540-7.
267. Hamad AR, Mohamood AS, Trujillo CJ, Huang CT, Yuan E, Schneck JP. B220+ double-negative T cells suppress polyclonal T cell activation by a Fas-independent mechanism that involves inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 2003;**171**(5):2421-6.
268. von Boehmer H, Kirberg J, Rocha B. An unusual lineage of alpha/beta T cells that contains autoreactive cells. *J Exp Med* 1991;**174**(5):1001-8.
269. Shivakumar S, Tsokos GC, Datta SK. T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J Immunol* 1989;**143**(1):103-12.
270. Liu CP, Kappler JW, Marrack P. Thymocytes can become mature T cells without passing through the CD4+ CD8+, double-positive stage. *J Exp Med* 1996;**184**(5):1619-30.
271. Hamad AR, Schneck JP. Antigen-induced T cell death is regulated by CD4 expression. *Int Rev Immunol* 2001;**20**(5):535-46.
272. Hamad AR, Srikrishnan A, Mirmonsef P, et al. Lack of coreceptor allows survival of chronically stimulated double-negative alpha/beta T cells: implications for autoimmunity. *J Exp Med* 2001;**193**(10):1113-21.
273. Paul R, Angele B, Sporer B, Pfister HW, Koedel U. Inflammatory response during bacterial meningitis is unchanged in Fas- and Fas ligand-deficient mice. *J Neuroimmunol* 2004;**152**(1-2):78-82.
274. Fecho K, Bentley SA, Cohen PL. Mice deficient in fas ligand (gld) or fas (lpr) show few alterations in granulopoiesis. *Cell Immunol* 1998;**188**(1):19-32.
275. Fecho K, Cohen PL. Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils. *J Leukoc Biol* 1998;**64**(3):373-83.
276. Schneider E, Moreau G, Arnould A, et al. Increased fetal and extramedullary hematopoiesis in Fas-deficient C57BL/6-lpr/lpr mice. *Blood* 1999;**94**(8):2613-21.
277. Kovac AD, Grammig J, Mahlo J, et al. Comparison of neuronal density and subfield sizes in the hippocampus of CD95L-deficient (gld), CD95-deficient (lpr) and nondeficient mice. *Eur J Neurosci* 2002;**16**(1):159-63.
278. Ozeki N, Mogi M, Nakamura H, Togari A. Differential expression of the Fas-Fas ligand system on cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cells. *Arch Oral Biol* 2002;**47**(7):511-7.
279. Bu R, Borysenko CW, Li Y, Cao L, Sabokbar A, Blair HC. Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts. *Bone* 2003;**33**(5):760-70.
280. Duque G, El Abdaimi K, Henderson JE, Lomri A, Kremer R. Vitamin D inhibits Fas ligand-induced apoptosis in human osteoblasts by regulating components of both the mitochondrial and Fas-related pathways. *Bone* 2004;**35**(1):57-64.
281. Hatakeyama S, Tomichi N, Ohara-Nemoto Y, Satoh M. The immunohistochemical localization of Fas and Fas ligand in jaw bone and tooth germ of human fetuses. *Calcif Tissue Int* 2000;**66**(5):330-7.
282. Wu X, Pan G, McKenna MA, Zayzafoon M, Xiong WC, McDonald JM. RANKL regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2005;**20**(1):107-16.

283. Wang XM, Yu SF, Yang ZP. Apoptosis of osteoclast-like cells induced by alendronate is related to Fas gene expression. *Chin J Dent Res* 2000;**3**(2):26-32.
284. Kitaura H, Nagata N, Fujimura Y, Hotokezaka H, Yoshida N, Nakayama K. Effect of IL-12 on TNF-alpha-mediated osteoclast formation in bone marrow cells: apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interaction. *J Immunol* 2002;**169**(9):4732-8.
285. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, et al. Fas and Fas ligand interaction is necessary for human osteoblast apoptosis. *J Bone Miner Res* 1997;**12**(10):1637-46.
286. Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**328**(3):709-20.
287. Kogianni G, Mann V, Ebetino F, et al. Fas/CD95 is associated with glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis. *Life Sci* 2004;**75**(24):2879-95.
288. Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2002;**2**(7):527-35.
289. Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *J Lab Clin Med* 1999;**134**(3):222-31.
290. Garcia-Moreno C, Catalan MP, Ortiz A, Alvarez L, De la Piedra C. Modulation of survival in osteoblasts from postmenopausal women. *Bone* 2004;**35**(1):170-7.
291. Lafleur EA, Koshkina NV, Stewart J, et al. Increased Fas expression reduces the metastatic potential of human osteosarcoma cells. *Clin Cancer Res* 2004;**10**(23):8114-9.
292. Mori S, Nose M, Chiba M, et al. Enhancement of ectopic bone formation in mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis. *Pathol Int* 1997;**47**(2-3):112-6.
293. Katavic V, Greecevic D, Lukic IK, et al. Non-functional Fas ligand increases the formation of cartilage early in the endochondral bone induction by rhBMP-2. *Life Sci* 2003;**74**(1):13-28.
294. Katavic V, Lukic IK, Kovacic N, Greecevic D, Lorenzo JA, Marusic A. Increased bone mass is a part of the generalized lymphoproliferative disorder phenotype in the mouse. *J Immunol* 2003;**170**(3):1540-7.
295. MacDonald GC, Kakkanaiiah VN, Sobel ES, Cohen PL, Eisenberg RA. In vivo depletion of Thy-1-positive cells originating from normal bone marrow abrogates the suppression of gld disease in normal-gld mixed bone marrow chimeras. *J Immunol* 1995;**154**(1):444-9.
296. Ettinger R, Wang JK, Bossu P, et al. Functional distinctions between MRL-lpr and MRL-gld lymphocytes. Normal cells reverse the gld but not lpr immunoregulatory defect. *J Immunol* 1994;**152**(4):1557-68.
297. Sobel ES, Kakkanaiiah VN, Cohen PL, Eisenberg RA. Correction of gld autoimmunity by co-infusion of normal bone marrow suggests that gld is a mutation of the Fas ligand gene. *Int Immunol* 1993;**5**(10):1275-8.
298. Sobel ES, Kakkanaiiah VN, Kakkanaiiah M, Cohen PL, Eisenberg RA. Co-infusion of normal bone marrow partially corrects the gld T-cell defect. Evidence for an intrinsic and extrinsic role for Fas ligand. *J Immunol* 1995;**154**(1):459-64.
299. Allen RD, Marshall JD, Roths JB, Sidman CL. Differences defined by bone marrow transplantation suggest that lpr and gld are mutations of genes encoding an interacting pair of molecules. *J Exp Med* 1990;**172**(5):1367-75.

300. Yasutomo K, Maeda K, Nagata S, et al. Defective T cells from gld mice play a pivotal role in development of Thy-1.2+B220+ cells and autoimmunity. *J Immunol* 1994;**153**(12):5855-64.
301. Wahlsten JL, Gitchell HL, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. Fas and Fas ligand expressed on cells of the immune system, not on the target tissue, control induction of experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* 2000;**165**(10):5480-6.
302. Bunster E, Meyer R. An improved method of parabiosis. *Anatomical Record* 1933;**57**(4):339.
303. Selvaggi G, Ricordi C, Podack ER, Inverardi L. The role of the perforin and Fas pathways of cytotoxicity in skin graft rejection. *Transplantation* 1996;**62**(12):1912-5.
304. Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone* 1996;**18**(5):397-403.
305. Marusic A, Katavic V, Grcevic D, Lukic IK. Genetic variability of new bone induction in mice. *Bone* 1999;**25**(1):25-32.
306. Adams RJ. Techniques of experimentation. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, eds. Laboratory animal medicine. 2nd ed. San Diego (CA): Academic Press, 2002: 1006-1046.
307. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;**162**(1):156-9.
308. Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Brenner CA. Quantification of mRNA in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR. *Mol Hum Reprod* 2000;**6**(5):448-53.
309. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* 2001;**25**(4):443-51.
310. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;**65**(1-2):55-63.
311. Korner H, Cretney E, Wilhelm P, et al. Tumor necrosis factor sustains the generalized lymphoproliferative disorder (gld) phenotype. *J Exp Med* 2000;**191**(1):89-96.
312. Klein J. Biology of mouse H-2 complex. Berlin: Springer Verlag, 1975.
313. Towler DA, St. Arnaud R. Use of cultured osteoblastic cells to identify and characterize transcriptional regulatory complexes. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of bone biology. San Diego (CA): Academic Press, 2002: 1503.
314. Rosenberg AJ. Skin allograft rejection. In: Coligan JE, Bierer BD, Margulies DM, Schevach EM, Strober W, eds. Current protocols in immunology. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons., Inc., 2005.
315. Kakkanaiyah VN, MacDonald GC, Cohen PL, Eisenberg RA. Suppression and reversal of gld disease by parabiosis with normal mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;**78**(1):6-13.
316. Refaeli Y, Van Parijs L, Abbas AK. Genetic models of abnormal apoptosis in lymphocytes. *Immunol Rev* 1999;**169**:273-82.
317. Kobata T, Takasaki K, Asahara H, et al. Apoptosis with FasL+ cell infiltration in the periphery and thymus of corrected autoimmune mice. *Immunology* 1997;**92**(2):206-13.

318. Maher S, Toomey D, Condrón C, Bouchier-Hayes D. Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol Cell Biol* 2002;**80**(2):131-7.
319. Maldonado MA, MacDonald GC, Kakkanaiyah VN, et al. Differential control of autoantibodies and lymphoproliferation by Fas ligand expression on CD4+ and CD8+ T cells in vivo. *J Immunol* 1999;**163**(6):3138-42.
320. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* 2001;**294**(5548):1933-6.
321. Weintraub JP, Godfrey V, Wolthusen PA, Cheek RL, Eisenberg RA, Cohen PL. Immunological and pathological consequences of mutations in both Fas and Fas ligand. *Cell Immunol* 1998;**186**(1):8-17.
322. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005;**433**(7027):760-4.
323. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 2000;**404**(6774):193-7.
324. Grcevic D, Katavic V, Lukic IK, Kovacic N, Lorenzo JA, Marusic A. Cellular and molecular interactions between immune system and bone. *Croat Med J* 2001;**42**(4):384-92.
325. Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 2000;**1**(6):469-74.
326. Feng X. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. *Gene* 2005;**350**(1):1-13.
327. Horowitz MC, Lorenzo JA. Local regulators of bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. Principles of bone biology. 2nd ed. San Diego (CA): Academic Press, 2002: 961-977.
328. Marusic A, Kos K, Stavljenic A, Vukicevic S. Talc granulomatosis in the rat. Involvement of bone in the acute-phase response. *Inflammation* 1990;**14**(2):205-16.
329. Monteiro JP, Benjamin A, Costa ES, Barcinski MA, Bonomo A. Normal hematopoiesis is maintained by activated bone marrow CD4+ T cells. *Blood* 2005;**105**(4):1484-91.
330. Goverman J. Autoimmune disease: Animal models. Encyclopedia of life sciences. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons., Ltd., 2001.
331. Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem* 2003;**88**(4):650-9.
332. Nilsson N, Ingvarsson S, Borrebaeck CA. Immature B cells in bone marrow express Fas/FasL. *Scand J Immunol* 2000;**51**(3):279-84.
333. Lu L, Chaudhury P, Osmond DG. Regulation of cell survival during B lymphopoiesis: apoptosis and Bcl-2/Bax content of precursor B cells in bone marrow of mice with altered expression of IL-7 and recombinase-activating gene-2. *J Immunol* 1999;**162**(4):1931-40.
334. Dominici M, Tadjali M, Kepes S, et al. Transgenic mice with pan-cellular enhanced green fluorescent protein expression in primitive hematopoietic cells and all blood cell progeny. *Genesis* 2005;**42**(1):17-22.

335. Olmsted-Davis EA, Gugala Z, Camargo F, et al. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**(26):15877-82.
336. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:795-823.
337. Hack CJ. Integrated transcriptome and proteome data: the challenges ahead. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2004;**3**(3):212-9.
338. Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli F, et al. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. *J Mol Histol* 2005;**36**(1-2):59-67.
339. Nakamura H, Tsuji T, Hirata A, Yamamoto T. Localization of osteoprotegerin (OPG) on bone surfaces and cement lines in rat tibia. *J Histochem Cytochem* 2002;**50**(7):945-53.
340. Shipman CM, Croucher PI. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res* 2003;**63**(5):912-6.
341. Thomas GP, Baker SU, Eisman JA, Gardiner EM. Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. *J Endocrinol* 2001;**170**(2):451-60.
342. Haynes DR, Crotti TN, Loric M, Bain GI, Atkins GJ, Findlay DM. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology (Oxford)* 2001;**40**(6):623-30.
343. Haynes DR, Barg E, Crotti TN, et al. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology (Oxford)* 2003;**42**(1):123-34.
344. Vanderborght A, Linsen L, Thewissen M, Geusens P, Raus J, Stinissen P. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand mRNA expression in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls. *J Rheumatol* 2004;**31**(8):1483-90.
345. Wong BR, Rho J, Arron J, et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997;**272**(40):25190-4.
346. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;**390**(6656):175-9.
347. Bengtsson AK, Ryan EJ. Immune function of the decoy receptor osteoprotegerin. *Crit Rev Immunol* 2002;**22**(3):201-15.
348. Wieth C, Dittmar K, Doan T, Lindenmaier W, Tindle R. Enhanced effector and memory CTL responses generated by incorporation of receptor activator of NF-kappa B (RANK)/RANK ligand costimulatory molecules into dendritic cell immunogens expressing a human tumor-specific antigen. *J Immunol* 2003;**171**(8):4121-30.
349. Seshasayee D, Wang H, Lee WP, et al. A novel in vivo role for osteoprotegerin ligand in activation of monocyte effector function and inflammatory response. *J Biol Chem* 2004;**279**(29):30202-9.
350. Cremer I, Dieu-Nosjean MC, Marechal S, et al. Long-lived immature dendritic cells mediated by TRANCE-RANK interaction. *Blood* 2002;**100**(10):3646-55.

351. Varsani H, Patel A, van Kooyk Y, Woo P, Wedderburn LR. Synovial dendritic cells in juvenile idiopathic arthritis (JIA) express receptor activator of NF-kappaB (RANK). *Rheumatology (Oxford)* 2003;**42**(4):583-90.
352. Stolina M, Guo J, Faggioni R, Brown H, Senaldi G. Regulatory effects of osteoprotegerin on cellular and humoral immune responses. *Clin Immunol* 2003;**109**(3):347-54.
353. Yun TJ, Tallquist MD, Aicher A, et al. Osteoprotegerin, a crucial regulator of bone metabolism, also regulates B cell development and function. *J Immunol* 2001;**166**(3):1482-91.
354. Williamson E, Billsborough JM, Viney JL. Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF-kappa B (RANK)/RANK ligand interactions: impact on tolerance induction. *J Immunol* 2002;**169**(7):3606-12.
355. Hochweller K, Anderton SM. Kinetics of costimulatory molecule expression by T cells and dendritic cells during the induction of tolerance versus immunity in vivo. *Eur J Immunol* 2005;**35**(4):1086-96.
356. Szymczyk KH, Shapiro IM, Adams CS. Ionizing radiation sensitizes bone cells to apoptosis. *Bone* 2004;**34**(1):148-56.
357. Ballou M, Nelson R. Immunopharmacology: immunomodulation and immunotherapy. *JAMA* 1997;**278**(22):2008-17.
358. Epstein S. Post-transplantation bone disease: the role of immunosuppressive agents and the skeleton. *J Bone Miner Res* 1996;**11**(1):1-7.
359. Walker DG. Congenital osteopetrosis in mice cured by parabiotic union with normal siblings. *Endocrinology* 1972;**91**(4):916-20.
360. Walker DG. Osteopetrosis cured by temporary parabiosis. *Science* 1973;**180**(88):875.
361. Mariani SM, Matiba B, Armandola EA, Krammer PH. The APO-1/Fas (CD95) receptor is expressed in homozygous MRL/lpr mice. *Eur J Immunol* 1994;**24**(12):3119-23.
362. Adachi M, Suematsu S, Kondo T, et al. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet* 1995;**11**(3):294-300.
363. Karray S, Kress C, Cuvellier S, et al. Complete loss of Fas ligand gene causes massive lymphoproliferation and early death, indicating a residual activity of gld allele. *J Immunol* 2004;**172**(4):2118-25.
364. Menu E, Asosingh K, Van Riet I, Croucher P, Van Camp B, Vanderkerken K. Myeloma cells (5TMM) and their interactions with the marrow microenvironment. *Blood Cells Mol Dis* 2004;**33**(2):111-9.
365. Ribatti D, Scavelli C, Roccaro AM, Crivellato E, Nico B, Vacca A. Hematopoietic cancer and angiogenesis. *Stem Cells Dev* 2004;**13**(5):484-95.
366. Yang CR, Wang JH, Hsieh SL, Wang SM, Hsu TL, Lin WW. Decoy receptor 3 (DcR3) induces osteoclast formation from monocyte/macrophage lineage precursor cells. *Cell Death Differ* 2004;**11 Suppl 1**:S97-107.
367. Linkermann A, Qian J, Lettau M, Kabelitz D, Janssen O. Considering Fas ligand as a target for therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2005;**9**(1):119-34.
368. Hong NM, Masuko-Hongo K, Sasakawa H, et al. Amelioration of lymphoid hyperplasia and hypergammaglobulinemia in lupus-prone mice (gld) by Fas-ligand gene transfer. *J Autoimmun* 1998;**11**(4):301-7.
369. Modiano JF, Sun J, Lang J, et al. Fas ligand-dependent suppression of autoimmunity via recruitment and subsequent termination of activated T cells. *Clin Immunol* 2004;**112**(1):54-65.



370. Yonehara S. Death receptor Fas and autoimmune disease: from the original generation to therapeutic application of agonistic anti-Fas monoclonal antibody. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;**13**(4-5):393-402.
371. Wittrant Y, Theoleyre S, Chipoy C, et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1704**(2):49-57.
372. Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Redini F. Relevance of an in vitro osteoclastogenesis system to study receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin biological activities. *Exp Cell Res* 2004;**293**(2):292-301.
373. Gao Y, Qian WP, Dark K, et al. Estrogen prevents bone loss through transforming growth factor beta signaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**(47):16618-23.
374. Cenci S, Toraldo G, Weitzmann MN, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by increasing T cell proliferation and lifespan through IFN-gamma-induced class II transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**(18):10405-10.
375. Roggia C, Gao Y, Cenci S, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**(24):13960-5.
376. Firestein GS. The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytokine networks in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2004;**114**(4):471-4.
377. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* 1998;**160**(1):403-9.
378. Teng YT, Nguyen H, Gao X, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;**106**(6):R59-67.
379. Sneller MC, Straus SE, Jaffe ES, et al. A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease. *J Clin Invest* 1992;**90**(2):334-41.
380. Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr* 1967;**70**(6):891-9.
381. Sneller MC, Dale JK, Straus SE. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2003;**15**(4):417-21.
382. Oliveira JB, Fleisher T. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;**4**(6):497-503.
383. Teachey DT, Manno CS, Axsom KM, et al. Unmasking Evans syndrome: T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood* 2005;**105**(6):2443-8.
384. Rieux-Laucat F, Fischer A, Deist FL. Cell-death signaling and human disease. *Curr Opin Immunol* 2003;**15**(3):325-31.
385. Benkerrou M, Le Deist F, de Villartay JP, et al. Correction of Fas (CD95) deficiency by haploidentical bone marrow transplantation. *Eur J Immunol* 1997;**27**(8):2043-7.

## **11. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 1973. godine u Zagrebu, gdje sam i diplomirao na Medicinskom fakultetu (1998.). Sve od tada sam, ako izuzmemo 10 mjeseci provedenih u odori Hrvatske vojske, suradnik pri Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2000. godine sam jedan od izvršnih urednika časopisa *Croatian Medical Journal*. Nakon diplome sam školovan u više istraživačkih središta. Zanima me imunologija, i to međudjelovanje imunološkog sustava i kosti, imunoreumatologija, te biologija hematoloških bolesti, a posebno multiplog mijeloma.