

Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

Sara Priselac

Midline 1 kao posrednik proupalne signalizacije receptora Fas u
mijeloidnim stanicama mišje koštane srži

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, pod vodstvom prof. dr. sc. Nataše Kovačić, u okviru projekata „Molekularni posrednici koštane resorpcije uvjetovane receptorom Fas u artritisu“ (br. 7406) i „Uloga bjelančevine Midline 1 u aktivaciji mijeloidnih stanica i autoimunom oštećenju tkiva“ (EP230/2020) te financijske potpore znanstvenim istraživanjima Sveučilišta u Zagrebu za ak. godinu 2019./2020. za projekt „Uloga bjelančevine Mid 1 u patogenezi reumatoidnog artritisa“ i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

POPIS KRATICA

7-AAD	7-amino-aktinomicin D
α -MEM	minimalni esencijalni medij α
AIA	artritis potaknut antigenom (prema engl. <i>antigen-induced arthritis</i>)
AICD	stanična smrt izazvana pobudom (prema engl. <i>activation-induced cell death</i>)
ANOVA	analiza varijance (prema engl. <i>analysis of variance</i>)
ATP	adenozin trifosfat
CC	zavijena zavojnica (prema engl. <i>coiled-coil</i>)
cDNA	komplementarna DNA (prema engl. <i>complementary DNA</i>)
CFA	potpuni Freundov adjuvans (prema engl. <i>complete Freund's adjuvant</i>)
COS	prema engl. <i>C-terminal subgroup one signature</i>
CT	kritični broj ciklusa (prema engl. <i>cycle threshold</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DAMP	molekularni obrazac povezan s oštećenjem tkiva (prema engl. <i>damage-associated molecular pattern</i>)
DD	domena smrti (prema engl. <i>death domain</i>)
DED	izvršna domena smrti (prema engl. <i>death effector domain</i>)
DISC	signalni sklop koji potiče staničnu smrt (prema engl. <i>death-inducing signaling complex</i>)
ERK	kinaze aktivirane izvanstaničnim receptorom (prema engl. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
FADD	bjelančevina sa smrtonosnom domenom pridružena receptoru Fas (prema engl. <i>Fas-associated protein with death domain</i>)
FBS	fetalni bovini serum
FITC	fluorescin izocijanat
gld	generalizirani limfoproliferativni poremećaj (prema engl. <i>generalized lymphoproliferative disorder</i>)
HSP	bjelančevine toplinskog šoka (prema engl. <i>heat shock protein</i>)
IAP	inhibitor apoptotskih bjelančevina (prema engl. <i>inhibitor of apoptosis proteins</i>)
I κ B	inhibitor jezgrinog čimbenika κ B (prema engl. <i>inhibitor of nuclear factor κB</i>)
IL	interleukin
JNK	kinaze koje fosforiliraju N-terminalni dio čimbenika c-Jun (prema engl. <i>c-Jun N-terminal kinases</i>)
lpr	limfoproliferacija
MAPK	proteinska kinaza aktivirana mitogenom (prema engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)

MEKK1	kinaza kinaze MAPK 1 (prema engl. <i>MAPK kinase kinase 1</i>)
MHC	glavni kompleks tkivne podudarnosti (prema engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
Mid	Midline (središnja linija, prema engl. <i>midline</i>)
Mid 1	Midline 1
Mid 2	Midline 2
mRNA	glasnička RNA (prema engl. <i>messenger RNA</i>)
mTORC1	sklop rapamicinskog cilja sisavaca 1 (prema engl. <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>)
NETs	neutrofilne izvanstanične zamke (prema engl. <i>neutrophil extracellular traps</i>)
NFκB	jezgreni čimbenik κB (prema engl. <i>nuclear factor κB</i>)
qRT-PCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (prema engl. <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
PAMP	molekularni obrazac patogenih mikroorganizama (prema engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (prema engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PI3K/Akt	fosfatidil-inozitol-3-kinaza/Akt
PP2A	proteinska fosfataza 2A (prema engl. <i>protein phosphatase 2A</i>)
PRR	receptor za prepoznavanje obrazaca (prema engl. <i>pattern recognition receptor</i>)
RING	stvarno zanimljivi novi gen (prema engl. <i>really interesting new gene</i>)
RIP	bjelančevina koja međudjeluje s receptorom (prema engl. <i>receptor-interacting protein</i>)
RNA	ribonukleinska kiselina (prema engl. <i>ribonucleic acid</i>)
SHH	sonic hedgehog
TLR	receptor sličan Tollu (prema engl. <i>Toll-like receptor</i>)
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze α (prema engl. <i>tumor necrosis factor α</i>)
TRADD	bjelančevina sa smrtonosnom domenom pridružena receptoru TNFR (prema engl. <i>TNFR-associated protein with DD</i>)
TRAIL	ligand povezan s TNF koji uzrokuje apoptozu (prema engl. <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>)
TRIM/RBCC	prema engl. <i>tripartite motif family/N-terminal RING finger/B-box/coiled coil</i>
XLOS	spolno vezani sindrom Opitz (prema engl. <i>X-linked Opitz syndrome</i>)

SADRŽAJ RADA

1. Uvod.....	1
1.1. Proupalno djelovanje stanica urođenog imunskog sustava.....	1
1.2. Sustav Fas/ligand Fas.....	2
1.3. Bjelančevina Midline 1.....	4
2. Hipoteza.....	6
3. Opći i specifični ciljevi rada.....	6
3.1. Opći cilj.....	6
3.2. Specifični ciljevi.....	6
4. Materijali i metode.....	7
4.1. Pokusne životinje.....	7
4.2. Ustroj pokusa.....	7
4.3. Stanična kultura.....	7
4.4. Protočna citometrija.....	8
4.5. Analiza genskog izražaja.....	8
4.5.1. Izolacija RNA.....	8
4.5.2. Obrnuto prepisivanje RNA.....	9
4.5.3. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu.....	9
4.6. Statistička analiza.....	10
5. Rezultati.....	11
5.1. Oligomerizano protutijelo anti-Fas djeluje apoptotski, a neoligomerizirano proupalno, pojačavajući izražaj gena proupalnih citokina i <i>Mid 1</i>	11
5.2. Niske koncentracije neoligomeriziranog protutijela anti-Fas imaju slabo apoptotsko djelovanje, a izraženo proupalno djelovanje.....	14
5.3. Izražaj gena <i>Mid 1</i> potaknut neapoptotskom signalizacijom protutijela anti-Fas povezan je s izražajem gena proupalnog citokina <i>IL-1β</i>	17
5.4. Upalno potaknute stanice koštane srži miševa <i>Mid 1</i> $-/-$ pojačavaju izražaj gena proupalnih citokina.....	18
6. Rasprava.....	19
7. Zaključci.....	22
8. Zahvale.....	23
9. Popis literature.....	24
10. Sažetak.....	28
11. Summary.....	29

1. UVOD

1.1. Proupalno djelovanje stanica urođenog imunskog sustava

Upalni odgovor je zaštitna reakcija organizma, a njegova nedostatna regulacija temelj je patogeneze mnogih bolesti. Za pokretanje i održavanje upalnog odgovora presudne su stanice urođene imunosti. Za razliku od stanica stečene imunosti čija je aktivacija posredovana receptorima koji prepoznaju antigene specifične za njihov klon, stanice urođene imunosti izražavaju receptore za prepoznavanje obrazaca (PRR, prema engl. *pattern recognition receptors*). Oni prepoznaju široko zastupljene antigene podijeljene na molekularne obrasce patogenih mikroorganizama (PAMP, prema engl. *pathogen-associated molecular pattern*), poput peptidoglikana ili lipoproteina bakterijske stijenke, i molekularne obrasce povezane s oštećenjem tkiva (DAMP, prema engl. *damage-associated molecular pattern*), poput bjelančevina toplinskog stresa (HSP, prema engl. *heat shock proteins*) ili izvanstaničnog adenozin trifosfata (ATP) (Newton i Dixit 2012). Aktivnost stanica dodatno nadziru posrednici poput citokina, kemokina, Fc dijelova protutijela i komponenata komplementa vežući se na odgovarajuće receptore. Signali se s receptora prenose unutarstaničnim putevima o čijem međudjelovanju ovisi konačna izvršna reakcija stanice. Primjeri proupalnih signalnih puteva su put aktivacije jezgrenog čimbenika κB (NF κB , prema engl. *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells*) i put aktivacije proteinskih kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK, prema engl. *mitogen-activated protein kinase*). NF κB je transkripcijski čimbenik koji se u citoplazmi nalazi u inaktivnom stanju, u sklopu s inhibitorском podjedinicom κB (I κB , prema engl. *inhibitor of κB*) čijom se fosforilacijom NF κB izdvaja iz sklopa i premješta u jezgru gdje pojačava transkripciju gena za proupalne citokine (Vallabhapurapu i Karin 2009). Najvažniji signalni putevi MAPK su put kinaza aktiviranih izvanstaničnim receptorom (ERK, prema engl. *extracellular signal-regulated kinases*), put posredovan kinazama koje fosforiliraju N-terminalni dio čimbenika c-Jun (JNK, prema engl. *c-Jun N-terminal kinases*) i put posredovan kinazom p38, a svi oni nadziru aktivnost niza transkripcijskih čimbenika djelujući time na proliferaciju, aktivnost i preživljenje stanica (Krishna i Narang 2008).

Fagociti, makrofazi i neutrofili, izvršne su stanice urođene imunosti. Makrofazi se mogu polarizirati upalno klasičnom aktivacijom ili protuupalno alternativnom aktivacijom, ovisno o citokinskom podražaju (Fujiwara i Kobayashi 2005). Klasična aktivacija podrazumijeva fagocitnu aktivnost, predočavanje antigena putem molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC, prema engl. *major histocompatibility complex*) te lučenje proupalnih citokina, prvenstveno čimbenika tumorske nekroze α (TNF- α , prema engl. *tumor necrosis factor α*), interleukina-1 β (IL-1 β) i interleukina-6 (IL-6). Alternativna aktivacija podrazumijeva lučenje citokina i čimbenika rasta koji pospješuju obnovu tkiva te ograničavaju upalni odgovor. Neutrofili djeluju istim mehanizmima klasične aktivacije, a imaju i mogućnost degranulacije

antimikrobnih tvari te stvaranja neutrofilnih izvanstaničnih zamki (NETs, prema engl. *neutrophil extracellular traps*) koje se sastoje od istisnutog staničnog sadržaja te vežu antigene, protutijela i molekule komplemenata pospješujući upalni odgovor (Amulic *i sur.* 2012). Degranulacija i rasap lizosomskih enzima iz mrtvih fagocita dodatno oštećuje patogene i omogućuje lakši dolazak imunskih stanica na mjesto upale, no uz cijenu ozljede zdravoga tkiva koja je česta posljedica upalnog odgovora.

Pretjerana klasična aktivacija i slabo ograničavanje upalnog odgovora ili nedovoljna alternativna aktivacija stanica urođene imunosti bitan su uzrok kroničnog tkivnog oštećenja u upalnim bolestima (Morell *i sur.* 2017). Od brojnih regulacijskih sustava izdvaja se sustav Fas/ligand Fas koji ima dvojni ulogu, apoptotskim djelovanjem ograničava upalni odgovor, a proupalnim djelovanjem ga održava.

1.2. Sustav Fas/ligand Fas

Fas (CD95/APO-1/TNFRSF6) je transmembranska bjelančevina iz nadobitelji receptora TNF. Izvanstanična domena odgovorna je za vezanje liganda, a unutarstanični dio sadrži domenu smrti (DD, prema engl. *death domain*) karakterističnu za smrtonosne receptore čije je dominantno djelovanje poticanje apoptoze (Dempsey *i sur.* 2003). Fas je izražen u svim tkivima (Aggarwal 2003), uključujući stanice imunskog sustava gdje mu je uloga opsežno opisana. Ligand Fas (FasL/CD178/CD95L) transmembranska je bjelančevina iz nadobitelji liganda TNF čiji je izvanstanični dio odgovoran za interakciju s receptorom. Za razliku od opsežne zastupljenosti receptora Fas, ligand Fas selektivno je izražen (Aggarwal 2003) na citotoksičnim (CD8+) i dijelu pomoćničkih (CD4+) limfocita T, prirodnoubilačkih stanica i u imunsko izdvojenim tkivima. Djelovanjem metaloproteinaza nastaje topljivi oblik koji inhibira učinak membranskog oblika molekule (Cheng *i sur.* 1994), ili, ovisno o stupnju oligomerizacije i drugim uvjetima, djeluje aktivacijski (Holler *i sur.* 2003).

Signalizacija potaknuta interakcijom receptora i liganda Fas tipičan je primjer apoptotskog puta. (Dempsey *i sur.* 2003) Započinje oligomerizacijom sklopa receptor-ligand, čime se unutarstanične DD približavaju te privlače bjelančevinu sa smrtonosnom domenom pridruženu receptoru Fas (FADD, prema engl. *Fas-associated protein with death domain*) koja sadrži izvršnu domenu smrti (DED, prema engl. *death effector domain*) odgovornu za interakciju s istoimenom domenom prokaspaze 8 te nastaje signalni sklop koji potiče staničnu smrt (DISC, prema engl. *death-inducing signaling complex*). DISC-a aktivira početnu kaspazu 8 te započinje kaskadu koja aktivira izvršnu kaspazu 3 odgovornu za brojne proteolitičke procese i konačnu razgradnju citoplazme i jezgre. Kada je u stanici prisutna velika količina inhibitora apoptotskih bjelančevina (IAP, prema engl. *inhibitor of apoptosis proteins*), aktivirane početne kaspaze ne djeluju na kaspazu 3, već aktiviraju Bid, pro-apoptotsku bjelančevinu obitelji Bcl-2 koja je posrednik unutarnjeg apoptotskog puta. Ove bjelančevine potiču propusnost

mitochondrijske membrane i izlazak citokroma c u citoplazmu gdje sudjeluje u stvaranju apoptosoma, signalnog sklopa unutarnjeg apoptotskog puta. Apoptoza posredovana sustavom Fas/ligand Fas bitan je čimbenik u ograničavanju imunskog odgovora kroz staničnu smrt izazvanu pobudom (AICD, prema engl. *activation-induced cell death*) pri čemu aktivirani limfociti T pojačavaju vlastiti izražaj receptora i liganda Fas uzrokujući time vlastitu apoptozu (Brunner *i sur.* 1995). Sličan učinak predložen je i za stanice mijeloidno-monocitne loze (Cuda *i sur.* 2012). Uloga u održavanju imunosne homeostaze potvrđena je na mišjim modelima. Mišje mutacije u sastavnicama sustava Fas/ligand Fas, *lpr* (limfoproliferacija), *lpr^{cg}* i *gld* (generalizirani limfoproliferativni poremećaj, prema engl. *generalized lymphoproliferative disorder*), obilježava fenotip limfadenopatije i autoimunosti (Adachi *i sur.* 1995; Ramsdell *i sur.* 1994). Nadalje, u imunoprivilegiranim tkivima, kao što je prednja očna sobica, izražaj liganda Fas održava imunosnu toleranciju poticanjem apoptoze imunosnih stanica (Griffith *i sur.* 1995), a na sličan način i tumorske stanice mogu izbjeći imunosni odgovor, no ovisno o nedovoljno razjašnjenim čimbenicima takav izražaj liganda Fas može djelovati proupalno (Igney *i sur.* 2005), što odražava dvojnu ulogu sustava Fas/ligand Fas.

Neapoptotski signalni putevi receptora Fas mogu aktivirati signalne puteve NFκB, MAPK i put fosfatidil-inozitol-3-kinaze/Akt (PI3K/Akt) (Siegmond *i sur.* 2017). Jedan od predloženih mehanizama je asocijacija bjelančevine FADD s bjelančevinom TRADD (prema engl. *TNFR-associated protein with DD*) odnosno RIP (prema engl. *receptor-interacting protein*) zahvaljujući interakciji njihovih DD, koja ima sposobnost aktivirati kinazu kinaze MAPK 1 (MEKK1, prema engl. *MAPK kinase kinase 1*) i posljedično NFκB. Osim navedenog, predloženi su i brojni drugi proupalni signalni putevi receptora Fas (Siegmond *i sur.* 2017). Precizni uvjeti za poticanje svakog od predloženih puteva te njihova prevaga nad apoptotskim putem nisu definirani i smatra se da ovise o modifikacijama liganda i receptora, vrsti stanice, njenom mikrokolišu i brojnim unutarstaničnim čimbenicima. Uloga neapoptotske signalizacije sustava Fas/ligand Fas u organizmu slabije je istražena od njegove apoptotske uloge. Na imunosnim stanicama zabilježeni su učinci suprotni ranije opisanoj negativnoj povratnoj sprezi kroz AICD budući da ligand Fas izražen na limfocitima T retrogradnom signalizacijom djeluje kao aktivacijski koreceptor (Sun *i sur.* 2006). Proupalni učinak vidljiv je i na stanicama urođene imunosti, gdje topljivi ligand Fas kemotaktično djeluje na neutrofile (Seino *i sur.* 1998). Taj učinak je potvrđen i u mišjim modelima reumatoidnog artitisa, gdje miševi s nefunkcionalnim receptorom Fas razvijaju značajno slabiji oblik bolesti (Tu-Rapp *i sur.* 2004), a naša istraživačka skupina pokazala je i da miševi s izbačenim genom za Fas (Fas $-/-$) imaju i smanjen subhondralni gubitak kosti (Lazić Mosler *i sur.* 2019) i manje zglobno nakupljanje mijeloidnih stanica koje imaju značajno smanjen izražaj gena *Midline 1* (Lukač 2020).

1.3. Bjelančevina Midline 1

Gen *Midline 1* (*Mid 1*, *Fxy*, *TRIM18*) smješten je na kromosomu X, a ime je dobio jer njegova mutacija u ljudi dovodi do razvoja rijetkog poremećaja zvanog spolno vezani sindrom Opitz (XLOS, prema engl. *X-linked Opitz syndrome*), karakteriziranog poremećajem u razvoju struktura središnje linije (engl. *midline*) (Quaderi *i sur.* 1997). Bjelančevina Midline 1 (*Mid 1*, *TRIM18*) pripada obitelji bjelančevina s tripartitnim motivom (*TRIM/RBCC*, prema engl. *tripartite motif family/N-terminal RING finger/B-box/coiled coil*) na čijem se N-terminalnom dijelu nalazi slijed građen od domene RING (prema engl. *really interesting new gene*), dvije domene B-box, B1 i B2, te domene zavijene zavojnice (CC, prema engl. *coiled-coil*). Domene RING i B-box odgovorne su za enzimsku aktivnost bjelančevine Mid 1, a na domenu CC nastavlja se domena COS (prema engl. *C-terminal subgroup one signature*) koja je odgovorna za vezanje na stanične mikrotubule. Za njom slijede domene FNIII te SPRY/B30.2. (Baldini *i sur.* 2020)

Opisano je nekoliko mehanizama djelovanja Mid 1. Ima funkciju ubikvitinske ligaze E3 (Han *i sur.* 2011) kojom posreduje ubikvitinaciju vežući konjugirajući enzim (E2) i odgovarajući supstrat. Dobro opisan supstrat je proteinska fosfataza 2A (PP2A, prema engl. *protein phosphatase 2A*) na čiju se podjedinicu $\alpha 4$ veže Mid 1 (Trockenbacher *i sur.* 2001). Stvoreni mikrotubularni sklop Mid 1/ $\alpha 4$ /PP2A potiče poliubikvitinaciju PP2A i obilježava je za proteasomsku razgradnju. Signalni put koji podliježe aktivaciji putem Mid 1, odnosno inaktivaciji fosfataznom aktivnošću PP2A, je sklop rapamicinskog cilja sisavaca 1 (mTORC1, prema engl. *mammalian target of rapamycin complex 1*) koji nadzire procese izgradnje i proliferacije u stanici (Liu *i sur.* 2011). Nedavno je zabilježeno protuupalno djelovanje PP2A defosforilacijom puteva MAPK i NF κ B (Sun *i sur.* 2017), što neizravno upućuje na proupalno djelovanje Mid 1. Osim djelovanja kao ubikvitinska ligaza E3, opisano je i poticajno djelovanje Mid 1 na translaciju bjelančevina (Aranda-Orgillés *i sur.* 2011) vezanjem na određene molekule glasničke RNA (mRNA, prema engl. *messenger RNA*).

Uloge bjelančevine Mid 1 raznolike su te još uvijek nepotpuno istražene. Mid 1 ima važnu ulogu u migraciji stanica neuralnog grebena (Baldini *i sur.* 2020) što je u ljudi potvrđeno u kontekstu ranije opisanog XLOS karakteriziranog razvojnim anomalijama mozga, lica, srca te drugih struktura središnje linije (Quaderi *i sur.* 1997). Mid 1 sudjeluje i u patogenezi Huntingtonove i Alzheimerove bolesti povećavajući translaciju huntingtina (Krauss *i sur.* 2013) i preteče amiloidne bjelančevine (Matthes *i sur.* 2018). Mid 1 uključen je i u patogenezu malignih bolesti, jedan od mehanizama je njegovo djelovanje na signalni put SHH (sonic hedgehog) (Schweiger *i sur.* 2014). U imunskom sustavu potvrđena je njegova uloga u migraciji, egzocitozi i citotoksičnoj funkciji limfocita T (Boding *i sur.* 2014 a; Boding *i sur.* 2014 b). Proupalno djelovanje Mid 1 opisano je u mišjem modelu astme (Collison *i sur.* 2013) i eozinofilnog ezofagitisa (Collison *i sur.* 2015) i plućnoj fibrozi (Collison *i sur.* 2019). Taj učinak

ovisan je o signalizaciji putem liganda povezanog s TNF koji uzrokuje apoptozu (TRAIL, prema engl. *TNF-related apoptosis inducing ligand*). TRAIL potiče izražaj Mid 1 koji proupalni učinak ostvaruje kočeci inhibicijsko djelovanje PP2A na NFκB i MAPK puteve. Naša istraživačka skupina zabilježila je sličan proupalni učinak signalizacije putem receptora Fas, koji poput receptora za TRAIL pripada skupini smrtonosnih receptora, u mišjem modelu artritisa potaknutog antigenom (AIA, prema engl. *antigen induced arthritis*). Miševi Fas $-/-$ imali su ublaženi artritis u odnosu na miševe divljeg tipa, što je bilo praćeno smanjenim izražajem gena *Mid 1*. Inhibicija djelovanja Mid 1 primjenom metformina ili blokirajućeg peptida GSK'364A smanjila je izražaj gena proupalnih citokina u upalno aktiviranim stanicama koštane srži (Lukač 2020).

Načini na koji smrtonosni receptori djeluju na izražaj Mid 1 nisu u potpunosti razjašnjeni, kao ni njegovo proupalno djelovanje potaknuto signalizacijom putem receptora Fas, čiji bi izostanak mogao biti odgovoran za ublaženi oblik artritisa. Cilj ovog rada je pobliže istražiti te učinke.

2. HIPOTEZA

Aktivacija receptora Fas izraženog na stanicama koštane srži miševa C57BL6 *in vitro* pri neapoptotskoj dozi agonista potiče njihovo proupalno djelovanje, pojačavajući izražaj gena *Mid 1* i djelovanje istoimene bjelančevine. Funkcionalni *Mid 1* važan je posrednik proupalnog djelovanja te se mijeloidne stanice podrijetla koštane srži miševa s izbačenim genom *Mid 1* slabije aktiviraju upalnim podražajem.

3. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Istražiti djelovanje aktivacije receptora Fas proupalnom koncentracijom agonista na izražaj *Mid 1 in vitro* te istražiti djelovanje tog signalnog puta na upalni odgovor stanica koštane srži miša.

3.2. Specifični ciljevi

1. Odrediti koncentraciju i uvjete primjene agonističkog protutijela anti-Fas u kojima prevladava neapoptotska, odnosno proupalna signalizacija, u nepotaknutim i upalno potaknutim stanicama koštane srži.
2. Istražiti djelovanje neapoptotske i proupalne aktivacije receptora Fas agonističkim protutijelom na izražaj gena proupalnih citokina i gena *Mid 1*, u nepotaknutim i upalno potaknutim stanicama koštane srži.
3. Odrediti djelovanje upalnog podražaja na izražaj gena proupalnih citokina u stanicama koštane srži miševa s izbačenim genom *Mid 1*.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Pokusne životinje

U istraživanju su korišteni miševi soja B6 (C57BL/6) te miševi s izbačenim genom *Mid 1* (*Mid 1* $-/-$) temeljnog soja B6 (poklon prof. G. Meroni sa Sveučilišta u Trstu), uzgojeni u vivariju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokusi su izvedeni u okviru projekata za koje su izdane dopusnice Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja Ministarstva poljoprivrede (EP 07-2/2015, 19.10.2015.; EP 230/2020, 02.03.2020.) i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (24.10.2019.). Živim miševima rukovali su članovi Laboratorija za molekularnu imunologiju osposobljeni za rad s pokusnim životinjama.

4.2. Ustroj pokusa

U prvom setu pokusa native i upalno potaknute stanice koštane srži miševa soja B6 te *Mid 1* $-/-$ inkubirane su *in vitro* s različitim koncentracijama i uvjetima primjene agonističkog protutijela receptora Fas da bi se procijenio apoptotski i proupalni učinak agonističkog protutijela ovisan o dozi. Udio apoptotičnih stanica određen je protočnom citometrijom, a proupalni učinak određivanjem izražaja gena proupalnih citokina i *Mid 1* postupkom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu. U drugom setu pokusa procijenjen je utjecaj niskih doza agonističkog protutijela anti-Fas na izražaj gena proupalnih citokina i *Mid 1*. U trećem setu pokusa upalni odgovor stanica koštane srži miševa soja *Mid 1* $-/-$ uspoređen je sa stanicama koštane srži soja B6 određivanjem izražaja gena proupalnih citokina postupkom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

4.3. Stanična kultura

Suspenzija stanica koštane srži pripremljena je ispuhivanjem koštane srži iz bedrene i goljenične kosti miševa minimalnim esencijalnim medijem α (α -MEM) (Capricorn Scientific GmbH, Ebsderfergrund, Njemačka) pomoću igle provrta 23G. Nakon višestrukog protiskivanja kroz iglu radi dobivanja jednostanične suspenzije, stanice su centrifugiranjem 5 minuta na 250 g pri temperaturi 4°C spuštene na dno epruvete, resuspendirane u mediju α -MEM obogaćenom s 10% fetalnog bovinog seruma (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, SAD) i 1% PenStrep (Gibco, Thermo Fisher Scientific), a potom propuštene kroz najlonsku mrežicu promjera okna 100 μ m u čistu epruvetu. Stanice su izbrojane u Bürker-Türkovoj komorici, a mrtve stanice isključene dodavanjem 0,05% tripanskog plavila. Potom su stanice zasijane u pločicu sa 96 zdenaca u gustoći 10^6 živih stanica po zdencu. U prazne zdence dodana je sterilna voda kako bi se izjednačili uvjeti vlažnosti središnjih i rubnih zdenaca. Stanice su upalno potaknute dodavanjem 2 μ g/ml bakterije *Mycobacterium tuberculosis* inaktivirane visokom temperaturom (BD™ Difco™, Thermo Fischer Scientific) i

inkubirane sat vremena na 37 °C, a potom je dodano aktivirajuće mišje protutijelo anti-CD95 (Jo2, BD Pharmingen, San Jose, CA, SAD), sa ili bez bjelančevine G (Sigma Aldrich) u odgovarajućim koncentracijama. U kontrolne zdence dodano je izotipsko kontrolno protutijelo (BD Pharmingen, San Jose, CA, SAD). Stanice su inkubirane 18 sati na 37 °C uz 5% CO₂ te je potom sadržaj cijelog zdenca uzet za odgovarajuću analizu.

4.4. Protočna citometrija

Sadržaj zdenca sakupljen je u epruvetu, uz naknadno ispiranje zdenca fiziološkom otopinom puferiranom fosfatnim puferom (PBS, prema engl. *phosphate-buffered saline*). Stanice su potom centrifugirane 5 minuta na 250 g pri temperaturi 4°C. Potom im je prvo dodan Fc blok u razrjeđenju 1:100, a nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi stanice su obilježene odgovarajućim koncentracijama protutijela konjugiranih fluorescentnim bojama usmjerenim na mišje biljege Gr1-PE (klon RB6-8C5, razrjeđenje 1:400, BD eBioscience, SAD), CD11b-PECy7 (klon M1/70, razrjeđenje 1:400, eBioscience, SAD), CD3e-APC (klon 145-2C11, razrjeđenje 1:200, eBioscience, SAD), B220-APC (razrjeđenje 1:200, eBioscience, SAD), NK1.1-APC (razrjeđenje 1:200, BD Pharmingen, San Jose, CA, SAD), F4/80-APCCy7 (razrjeđenje 1:200, Biolegend, SAD) uz inkubaciju od 30 minuta na 4°C. Potom je suspenziji dodan 1 ml PBS i stanice su spuštene na dno centrifugiranjem 5 minuta na 250 g pri temperaturi 4°C. Stanice su resuspendirane u 100 ml pufera za vezanje aneksina (10 mM pufera Hepes, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4) te je svakom uzorku dodano 3 µl aneksina V-FITC (Biolegend, SAD) i 2,5 µl 7-amino-aktinomicina (7-AAD, Biolegend, SAD) te su stanice inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi zaštićene od svjetla, nakon čega im je dodano još 200 ml pufera te su unutar 15 minuta propuštene na protočnom citometru Attune (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), a dobiveni podatci analizirani su pomoću programa FlowJo (FlowJo, Ashland, Oregon, SAD).

4.5. Analiza genskog izražaja

4.5.1. Izolacija RNA

Za izolaciju ribonukleinske kiseline (RNA, prema engl. *ribonucleic acid*) sadržaji zdenaca sakupljeni u epruvete, uz ispiranje zdenca PBS-om, a potom su stanice centrifugirane 5 minuta na 250 g pri temperaturi 4°C. Talog je resuspendiran u 500 ml reagensa TRIzol (Sigma). Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi, svakom uzorku je dodano 200 µl kloroforma te je uzorak dobro promiješan jakim protresanjem epruvete i ostavljen još 2 minute na sobnoj temperaturi. Mješavina je potom centrifugirana 15 minuta na 12 000 g pri temperaturi 4 °C što rezultira razdvajanjem triju faza, donje koja sadrži bjelančevine, srednje koje sadrži deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA, prema engl. *deoxyribonucleic acid*) i gornje vodene faze koja sadrži RNA. Vodena faza prebačena je u čistu epruvetu i njoj je dodano 500 µl

izopropanola koji precipitira RNA. Uzorci su lagano promiješani okretanjem epruvete te ostavljeni na sobnoj temperaturi 10 minuta, a potom centrifugirani 15 minuta na 12 000 g pri temperaturi 4 °C. Nakon toga je izopropanol izliven, a talog RNA je opran dodavanjem 1 ml 75% etanola i centrifugiran 5 minuta na 7500 g pri temperaturi 4 °C. Etanol je potom izliven, a talog RNA ostavljen da se osuši 10 min na sobnoj temperaturi u otvorenoj epruveti. Zaostale kapi tekućine na rubnim stijenkama epruvete pokupljene su uskim nastavkom pipete. RNA je otopljena u prikladnom volumenu sterilne vode da koncentracija otopine bude između 100 i 500 ng/μl uz višestruko protiskivanje kroz nastavak pipete kako bi se RNA u potpunosti otopila. Količina RNA procijenjena je na UV-VIS spektrofotometru (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, SAD) mjerenjem apsorbanacija 1 μl uzorka pri 230, 260 i 280 nm valne duljine.

4.5.2. Obrnuto prepisivanje RNA

Po 1 μg RNA iz svakog uzorka prepisan je u komplementarnu (c, prema engl. *complementary*) DNA pomoću seta kemikalija High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). RNA otopljenom u vodi do volumena 10 μl dodano je 2 μl pufera RT, 2 μl nasumičnih početnica, 0,8 μl mješavine deoksiribonukleodida, 1 μl enzima reverzne transkriptaze i 0,5 μl inhibitora RNAze. Uzorci su potom inkubirani u uređaju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) 2 sata na temperaturi od 37 °C, nakon čega se reakcija zaustavlja zagrijavanjem na 95 °C.

4.5.3. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

Izražaj gena *IL-1β*, *TNF-α* i *Mid 1* određen je postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR, prema engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*) pomoću uređaja 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) korištenjem komercijalno dostupnih setova kemikalija TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) (*IL-1β*, Mm00434228_m1; *TNF-α*, Mm00443258_m1; *Mid 1*, Mm04933166_m1; *β-actin*, Mm00607939_s1) i TaqMan Gene Expression Master mix (Applied Biosystems). TaqMan® Gene Expression Assay sadrži početnice i probu specifične za mjereni gen. Proba je obilježena fluorescentnom bojom FaM na 5' kraju i prigušivačem fluorescencije (NFQ, prema engl. *nonfluorescent quencher*) na 3' kraju. TaqMan Gene Expression Master mix sadrži DNA polimerazu (AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase, Applied Biosystems), uracil-N glikozilazu za uklanjanje eventualno prisutnih stranih PCR produkata te boju ROXTM kao unutarnju kontrolu za normalizaciju signala. DNA polimeraza iz mješavine TaqMan Gene Expression Master mix prema predlošku cDNA izgrađuje novi lanac počevši od mjesta vezanja početnica. Cijepa probu te udaljuje boju FAM od prigušivača što izaziva fluorescentni signal. qPCR reakcija provedena je u pločici s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate; Applied

Biosystems), u volumenu od 25,5 μ l (1 μ l cDNA, 1,25 μ l TaqMan® Gene Expression Assay, 12,5 μ l TaqMan Gene Expression Master mix, 11,75 μ l H₂O). Reakcija započinje inkubacijom od 2 minute na 50 °C, potom inkubacijom od 10 minuta na 95 °C. Slijedi 45 ciklusa naizmjenične inkubacije na 95 °C od 15 sekundi pri čemu dolazi do denaturacije DNA te 60 °C tijekom 60 sekundi kada se vežu početnice te stvara komplementarni DNA lanac. Izmjereni intenzitet fluorescencije u reakciji qPCR proporcionalan je količini umnoženih fragmenata. Za analizu izražaja *Mid 1* korišten je i set početnica (sense 5'-CACTCGCTGAAGGAAAATGACCA-3', antisense 5'-AATCAAAGGCAAAAGTGTCAAA-3') (Applied Biosystems™ Sequence Detection Primer, Applied Biosystems), preuzet od Collison *i sur.* 2014, te komercijalno dostupna mješavina SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Uz DNA polimerazu mješavina sadrži boju SYBR® Green koja fluorescira nakon vezanja dvolančanih molekula DNA. Reakcija je provedena u pločici s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate), a ukupni volumen reakcije je 25,5 μ l, od čega je 1 μ l cDNA, 0,5 μ l (200 nM) sense i antisense početnica, 12,5 μ l SYBR™ Green PCR Master Mix te ostatak voda. Reakcija započinje inkubacijom tijekom 2 minute na 50 °C te 10 minuta na 95 °C, a potom slijedi 45 ciklusa naizmjenične inkubacije na 95 °C 15 sekundi te 60 °C 60 sekundi. Zbog nespecifičnog vezanja SYBR® Green boje za dvolančanu DNA, PCR produkti su nakon zadnjeg ciklusa razdvojeni zagrijavanjem sa 60 °C na 95 °C brzinom 0,03 °C/s, da bi se potvrdilo da temperatura tališta odgovara specifičnom proizvodu umnažanja. Izmjereni intenzitet fluorescencije u reakciji qPCR proporcionalan je količini umnoženih fragmenata. Odabran je prag vrijednosti fluorescencije pri kojem je izmjeren fluorescentni signal veći od pozadinskog signala. Potom je za svaki uzorak određen broj ciklusa potreban za postizanje određene razine fluorescencije, što nazivamo kritični broj ciklusa (CT, prema engl. *cycle threshold*). Relativna količina RNA u uzorku izračunata je pomoću standardne krivulje, prikazane u koordinatnom sustavu u kojem su logaritmi količine cDNA prikazani na apscisi, a vrijednosti CT na ordinati, a napravljena je pomoću pet serijskih razrjeđenja kalibracijskog uzoraka analiziranih stanica. Relativna količina RNA u uzorku izražena je u odnosu na količinu RNA endogenog kontrolnog gena β -aktin.

4.6. Statistička analiza

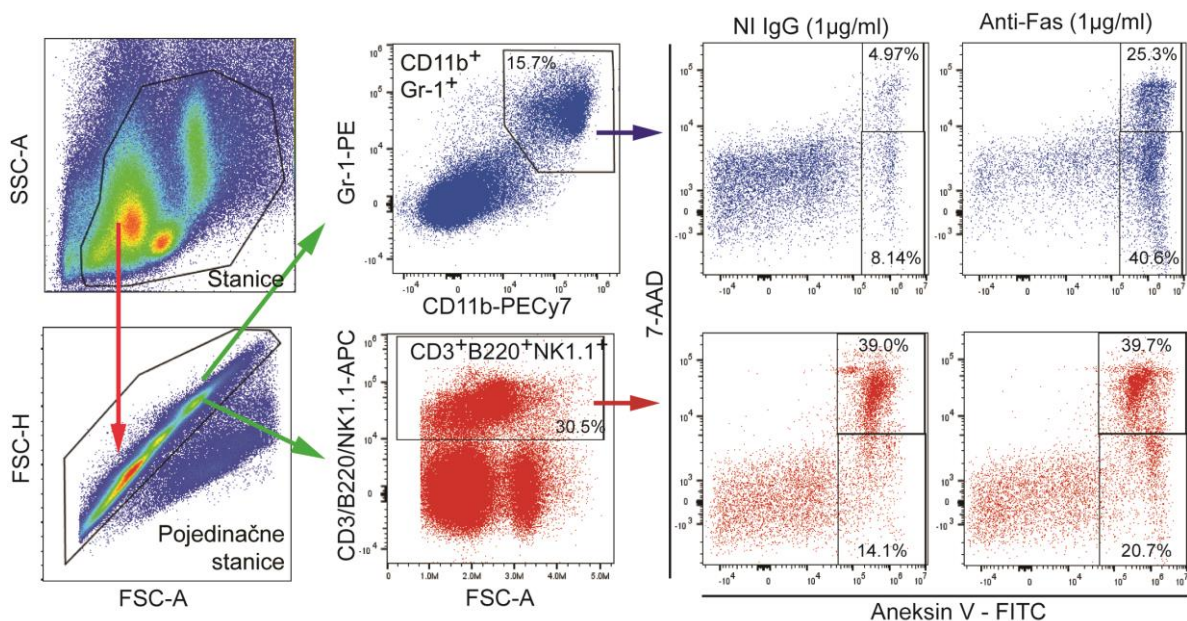
Na grafičkim prikazima prikazane su pojedinačne vrijednosti za svaki uzorak, a vodoravne crte označavaju aritmetičku sredinu \pm standardna devijacija. Za usporedbu skupina korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA, prema engl. *analysis of variance*) sa Student-Newman-Keul *post-hoc* testom za određivanje razlika između pojedinih skupina. Povezanost genskog izražaja određena je Pearsonovim korelacijskim koeficijentom. Razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Statistička analiza provedena je koristeći program MedCalc (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija).

5. REZULTATI

5.1. Oligomerizano protutijelo anti-Fas djeluje apoptotski, a neoligomerizirano proupalno, pojačavajući izražaj gena proupalnih citokina i *Mid 1*

U prvom dijelu istraživanja cilj mi je bio utvrditi postoji li razlika između apoptotskog i proupalnog djelovanja oligomeriziranog i neoligomeriziranog protutijela anti-Fas te razlika u djelovanju protutijela anti-Fas u ovisnosti o upalnoj aktivaciji.

Za određivanje udjela apoptotičnih i mrtvih stanica mijeloidne ($CD11b^+Gr1^+$), limfoidne ($CD3^+/B220^+/NK1.1^+$) loze i makrofaga ($F4/80^+$, nije prikazano) stanice koštane srži prvo su obilježene odgovarajućim protutijelima konjugiranih fluorescentnim bojama, a potom i aneksinom V konjugiram s fluorescein izocijanatom (FITC) te bojom 7-AAD. Aneksin V veže se na fosfatidil-serin koji je izložen na površini stanične membrane apoptotičnih stanica (Martin *i sur.* 1995), a 7-AAD obilježava nukleinske kiseline u mrtvim stanicama koje su izgubile

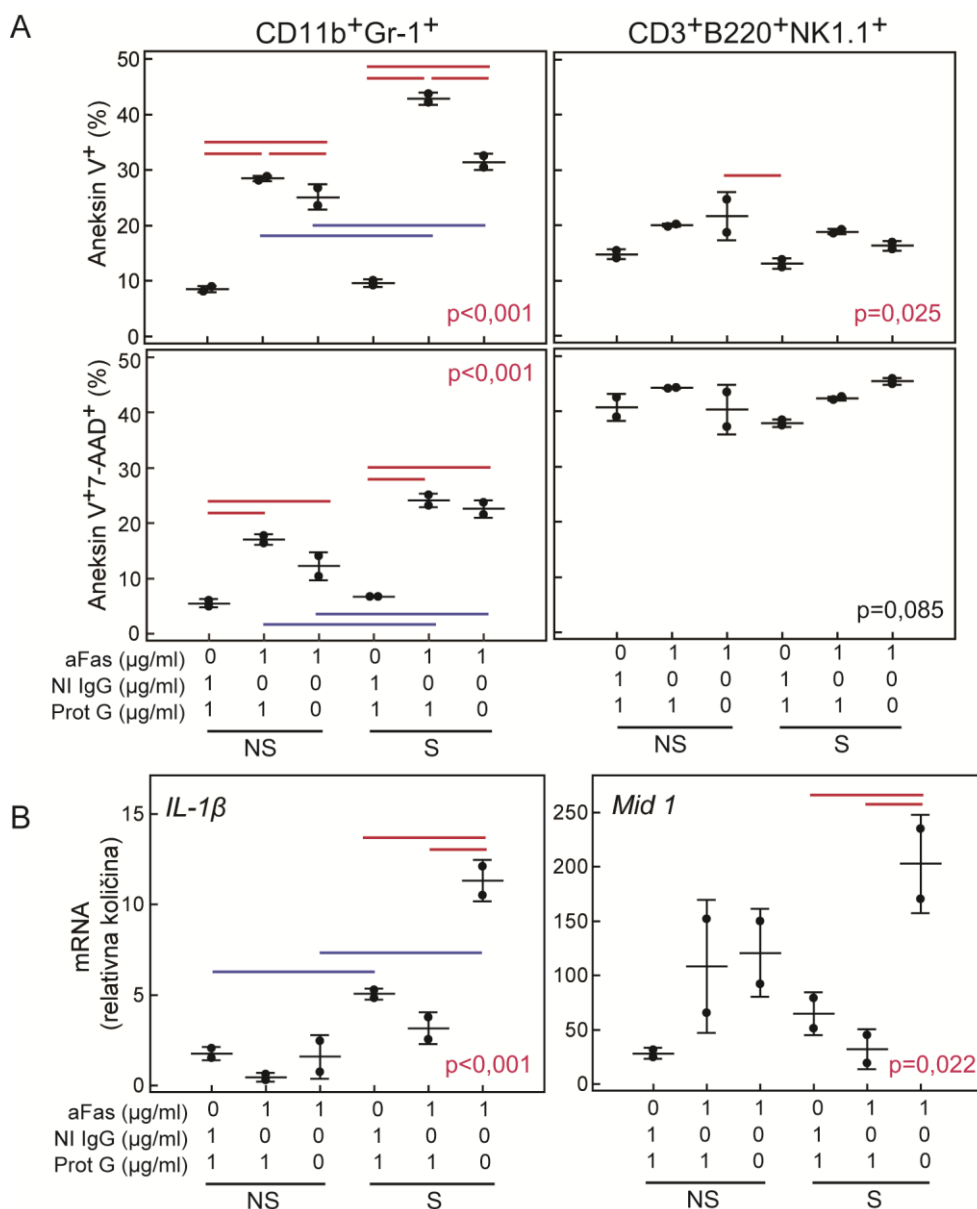


Slika 1. Protočno-citometrijska analiza udjela apoptotičnih i mrtvih stanica mijeloidne ($CD11b^+Gr1^+$) i limfoidne loze ($CD3^+/B220^+/NK1.1^+$). Stanice su tretirane izotipskim kontrolnim protutijelom (Ha4/8, BD Pharmingen) i protutijelom anti-Fas (Jo2, BD Pharmingen) u koncentraciji 1 $\mu\text{g/ml}$ *in vitro* tijekom 18h. Udio apoptotičnih i mrtvih stanica određen je unutar populacije pojedinačnih stanica koje su odabrane za analizu na temelju njihove sposobnosti izazivanja ogiba (FSC, prema engl. *forward scatter*) i refleksije (SSC, prema engl. *side scatter*) laserskog snopa svjetlosti. Populacija stanica mijeloidne loze (plavo) izdvojena je na temelju vezanja fluorescentno obilježenih protutijela na biljege CD11b (CD11b-PECy7, M1/70, eBioscience) i Gr-1 (Gr-1-PE, RB6-8C5, eBioscience). Populacija stanica limfoidne loze (crveno) izdvojena je na temelju vezanja fluorescentno obilježenih protutijela na biljege CD3 (CD3-APC, 145-2C11, eBioscience), B220 (B220-APC, eBioscience) i NK1.1 (NK1.1-APC, BD Pharmingen). Unutar svake populacije određen je udio apoptotičnih stanica, odnosno stanica obilježenih aneksinom V (aneksin V-FITC), a neobilježenih 7-amino aktinomocinom (7-AAD, jednostruko pozitivne stanice, aneksin V⁺7-AAD⁻) te udio mrtvih stanica obilježenih i aneksinom V i 7-AAD (dvostruko pozitivne stanice, aneksin V⁺7-AAD⁺).

integritet stanične membrane (Schmid *i sur.* 1992). Udio apoptotičnih (aneksin V⁺7-AAD⁻) i mrtvih (aneksin V⁺7-AAD⁺) stanica određen je protočnom citometrijom (Slika 1). Uz protočno-citometrijsku analizu, iz stanica je izolirana RNA te je određen genski izražaj proupalnih citokina i Mid 1.

Udio mijeloidnih (CD11b⁺Gr1⁺) apoptotičnih stanica bio je značajno veći u skupinama tretiranim protutijelom anti-Fas u kombinaciji s bjelančevinom G (nepotaknute 28,45±0,50%; upalno potaknute 42,85±1,06%) koja omogućuje oligomerizaciju protutijela u odnosu na stanice tretirane istom koncentracijom protutijela bez prisutnosti bjelančevine G (nepotaknute 25,10±2,26%; upalno potaknute 31,45±1,48%, Slika 2A). Udio mijeloidnih apoptotičnih stanica također je bio značajno veći u skupini tretiranoj agonističkim protutijelom bez prisutnosti bjelančevine G u odnosu na stanice tretirane izotipskim kontrolnim protutijelom (nepotaknute 8,54±0,57%; upalno potaknute 9,64±0,65%, Slika 2A), što upućuje na proapoptotsko djelovanje neoligomeriziranog oblika protutijela. Nadalje, udio apoptotičnih stanica bio je značajno veći u svim skupinama upalno potaknutih mijeloidnih stanica tretiranih protutijelom anti-Fas i/ili bjelančevinom G u odnosu na odgovarajuće skupine nepotaknutih stanica (Slika 2A). Udio mrtvih mijeloidnih stanica bio je veći u skupinama stanica tretiranih protutijelom anti-Fas u odnosu na skupine stanica tretiranih izotipskim kontrolnim protutijelom (nepotaknute: 5,49±0,74%; upalno potaknute: 6,61±0,00%) te podjednak među skupinama tretiranim samim protutijelom anti-Fas (nepotaknute 12,20±2,55%; upalno potaknute 22,60±1,56%) i protutijelom anti-Fas u kombinaciji s bjelančevinom G (nepotaknute 17,05±0,92%; upalno potaknute 24,10±1,27%, Slika 2A). Slično apoptotičnim stanicama, udio mrtvih stanica bio je značajno viši u upalno potaknutim stanicama tretiranih protutijelom anti-Fas i/ili bjelančevinom G u odnosu na odgovarajuće skupine nepotaknutih.

Udio apoptotičnih stanica limfoidne loze (CD3⁺/B220⁺/NK1.1⁺) nije se razlikovao među skupinama tretiranim izotipskim kontrolnim protutijelom (nepotaknute 14,75±0,92%; upalno potaknute 13,10±0,99%), protutijelom anti-Fas i bjelančevinom G (nepotaknute 20,00±0,28%; upalno potaknute 18,85±0,50%) te samo protutijelom anti-Fas (nepotaknute 21,65±4,31%; upalno potaknute 16,30±0,85%, Slika 2A). Nisu zabilježene ni razlike u udjelima mrtvih stanica između navedenih skupina (izotipsko kontrolno protutijelo: nepotaknute 40,75±2,47%, upalno potaknute 37,90±0,71%; anti-Fas i bjelančevina G: nepotaknute 44,25±0,07%, upalno potaknute 42,35±0,35%; anti-Fas: nepotaknute 40,35±4,45%, upalno potaknute 45,45±0,64%, Slika 2A). Za razliku od mijeloidnih stanica u kojima je udio apoptotičnih stanica bio veći od udjela mrtvih stanica, u limfoidnoj lozi udio mrtvih stanica bio je daleko veći od udjela apoptotičnih stanica te udjela mrtvih stanica mijeloidne loze (Slika 2A), što je vjerojatno posljedica odumiranja limfoidnih stanica u izostanku odgovarajućeg antigenskog podražaja za preživljenje.



Slika 2. Apoptotsko i proupalno djelovanje visokih koncentracija oligomeriziranog i neoligomeriziranog protutijela anti-Fas. (A) Udio apoptotičnih (aneksin V⁺) i mrtvih (aneksin V⁺7-AAD⁺) stanica mijeloidne (CD11b⁺Gr1⁺) i limfoidne (CD3⁺/B220⁺/NK1.1⁺) loze i (B) izražaj *IL-1β* i *Mid 1* u skupinama nepotaknutih (NS) i upalno potaknutih stanica (S) tretiranih izotipskim kontrolnim protutijelom (NI IgG) i/ili bjelančevinom G (Prot G) i/ili protutijelom anti-Fas (aFas). Po 10⁶ stanica posađeno je u zdenac pločice za kulturu s 96 zdenaca. Za upalno poticanje dodana je bakterija *M. tuberculosis* inaktivirana toplotinom u konačnoj koncentraciji 2 µg/mL, a nakon inkubacije 1h/37°C dodane su odgovarajuće kombinacije protutijela anti-Fas, izotipskog kontrolnog protutijela i bjelančevine G u koncentracijama 1 µg/ml te su stanice inkubirane 18h/37°C, nakon čega su uzete za protočnu citometriju i/ili izolaciju RNA. Stanice su uzgajane u duplikatima (n=2), koji su korišteni za analizu protočnom citometrijom i analizu genskog izražaja. Pokusi s apoptozom ponovljeni su tri puta sa sličnim rezultatima, a izolacija RNA napravljena je u jednom pokusu. Prikazane su pojedinačne vrijednosti svake skupine (crni kružići), a vodoravne crte označavaju aritmetičku sredinu ± SD, crvene linije označavaju statistički značajnu razliku unutar skupina nepotaknutih i upalno potaknutih stanica, a plave linije označavaju statistički značajnu razliku između skupina istovjetno tretiranih nepotaknutih i upalno potaknutih stanica. Za analizu razlika korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) sa Student-Neuman-Keul *post-hoc* testom za analizu razlika između skupina, a razina značajnosti postavljena je na p<0,05.

Udio mrtvih makrofaga (F4/80+) bio je izrazito visok (>70%, nije prikazano), tako da je ta populacija isključena iz analize.

Izražaj *IL-1 β* bio je značajno viši u skupinama upalno potaknutih stanica tretiranih izotipskim kontrolnim protutijelom (5,05 \pm 0,31) i protutijelom anti-Fas bez prisutnosti bjelančevine G (11,31 \pm 1,15) u odnosu na odgovarajuće skupine nepotaknutih stanica (izotipsko kontrolno protutijelo 1,77 \pm 0,36; anti-Fas 1,58 \pm 1,21, Slika 2B), a nije bilo razlike između upalno potaknute i nepotaknute skupine tretirane protutijelom anti-Fas i bjelančevinom G (upalno potaknute 3,16 \pm 0,87, nepotaknute 0,45 \pm 0,23, Slika 2B). Nadalje, skupina upalno potaknutih stanica tretiranih protutijelom anti-Fas bez prisutnosti bjelančevine G također značajno jače izražava *IL-1 β* u odnosu na skupinu upalno potaknutih stanica tretiranih izotipskim kontrolnim protutijelom i protutijelom anti-Fas uz dodanu bjelančevinu G (Slika 2B). Značajni porast izražaja *Mid 1* opažen je samo u skupini upalno potaknutih stanica tretiranih protutijelom anti-Fas bez prisutnosti bjelančevine G (202,78 \pm 45,51), i to u odnosu na skupine upalno potaknutih stanica tretiranih izotipskim kontrolnim protutijelom (64,78 \pm 19,66) i protutijelom anti-Fas i bjelančevinom G (31,97 \pm 18,59, Slika 2B). Ovaj nalaz upućuje na isključivo apoptotsko djelovanje receptora Fas uz prisutnost oligomeriziranog agonista, koje je slabije pri izostanku oligomerizacije, a u tim se uvjetima očituje proupalno djelovanje.

5.2. Niske koncentracije neoligomeriziranog protutijela anti-Fas imaju slabo apoptotsko djelovanje, a izraženo proupalno djelovanje

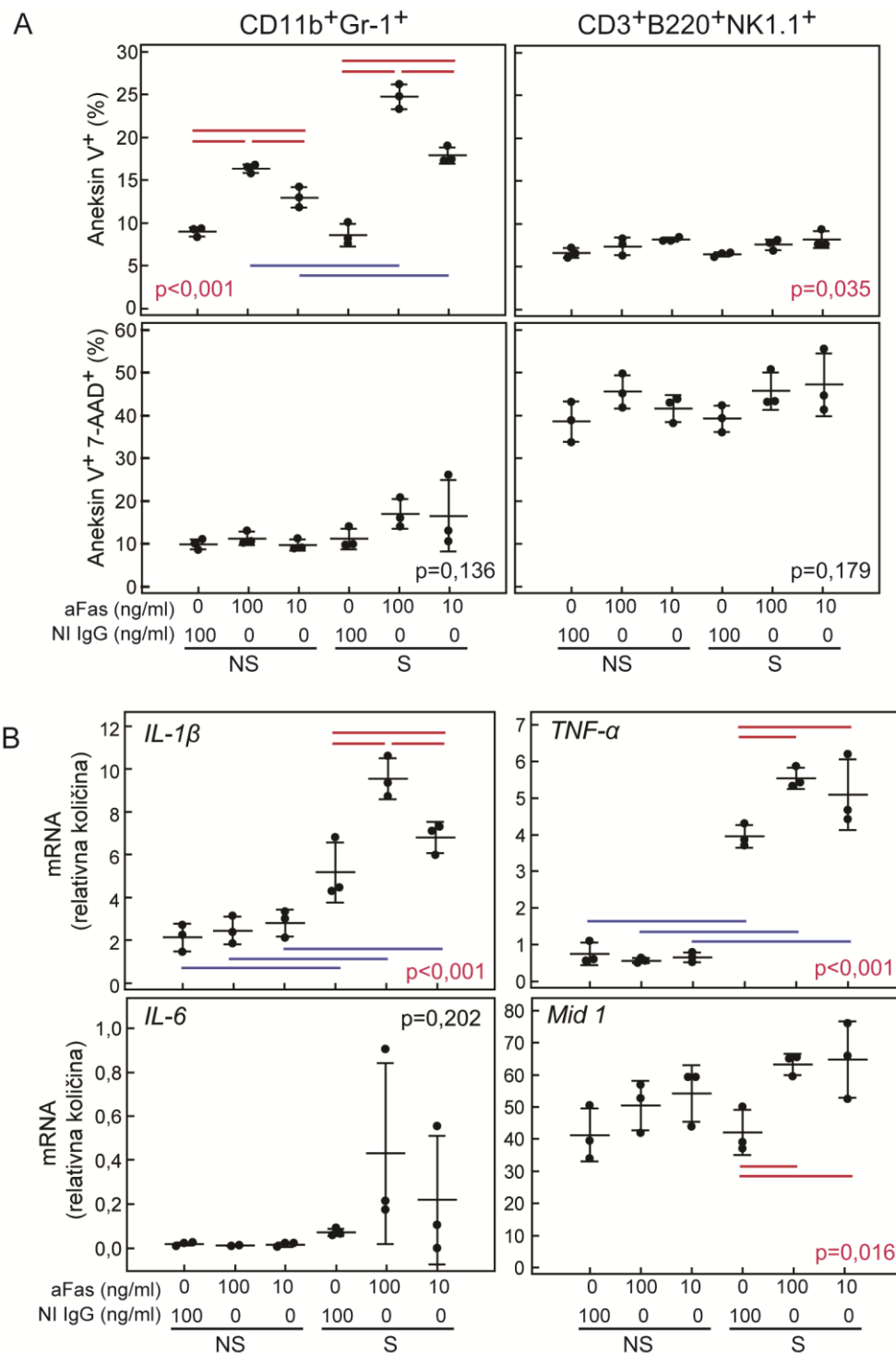
U prvom setu pokusa utvrdila sam da oligomerizirano protutijelo izaziva isključivo apoptotski učinak, a neoligomerizirano protutijelo primijenjeno u koncentraciji 1 μ g/ml još uvijek izaziva apoptozu značajnog udjela stanica. Mogući razlog za apoptotski učinak u odsutnosti bjelančevine G je spontana oligomerizacija pri visokoj koncentraciji protutijela. Stoga je sljedeći korak bio istražiti djelovanje nižih koncentracija s ciljem određivanja doze koja će imati isključivo proupalno neapoptotsko djelovanje. U ovom setu pokusa stoga nije dodavana bjelančevina G.

Udio apoptotičnih mijeloidnih (CD11b⁺Gr1⁺) stanica bio je značajno veći u skupinama tretiranim sa 100 ng/ml (nepotaknute 16,37 \pm 0,51%; upalno potaknute 24,77 \pm 1,45%) i 10ng/ml protutijela anti-Fas (nepotaknute 13,00 \pm 1,20%; upalno potaknute 17,90 \pm 0,95%) u odnosu na skupine tretirane izotipskim kontrolnim protutijelom (nepotaknute 8,99 \pm 0,53%; upalno potaknute 8,61 \pm 1,32%, Slika 3A). Udio mijeloidnih apoptotičnih stanica također je bio značajno veći u skupinama tretiranim sa 100 ng/ml u odnosu na skupine tretirane s 10ng/ml agonističkog protutijela (Slika 3A). Nadalje, udio apoptotičnih stanica bio je značajno veći u skupinama upalno potaknutih mijeloidnih stanica tretiranih protutijelom anti-Fas u odnosu na odgovarajuće skupine stanica tretiranih izotipskim kontrolnim protutijelom (Slika 3A). Udio mrtvih mijeloidnih stanica bio je podjednak u svim skupinama (izotipsko kontrolno protutijelo: nepotaknute

9,90±1,20%, upalno potaknute 11,23±2,41%; anti-Fas 100 ng/mL: nepotaknute 11,30±1,57%, upalno potaknute 17,00±3,44%; anti-Fas 10 ng/mL: nepotaknute 9,74±1,27%, upalno potaknute 16,57±8,34%, Slika 3A). Takvi podjednaki udjeli zabilježeni su i u stanicama limfoidne loze (CD3⁺/B220⁺/NK1.1⁺), ponovno uz visoke udjele (~40%) mrtvih stanica, što upućuje na prethodno opisano spontano odumiranje limfoidnih stanica (Slika 3A).

Upalni podražaj izaziva značajan porast izražaja gena za proupalne citokine *IL-1β* i *TNF-α*, u svim skupinama upalno potaknutih stanica u odnosu na istovjetno tretirane skupine nepotaknutih stanica (Slika 3B). Izražaj navedenih citokina bio je značajno viši u skupinama upalno potaknutih stanica tretiranih protutijelom anti-Fas u koncentracijama 100 ng/ml (*IL-1β* 9,56±0,96; *TNF-α* 5,54±0,29) i 10 ng/ml (*IL-1β* 6,81±0,72; *TNF-α* 5,09±0,96), u odnosu na skupinu upalno potaknutih stanica tretiranu izotipskim kontrolnim protutijelom (*IL-1β* 5,19±1,40; *TNF-α* 3,96±0,31). Izražaj gena *TNF-α* nije se značajno razlikovao između skupina upalno potaknutih stanica tretiranih agonističkim protutijelom, a izražaj *IL-1β* bio je značajno viši u stanicama tretiranim s 100 ng/ml u odnosu na stanice tretirane s 10 ng/ml protutijela anti-Fas (Slika 3B). Nije bilo razlike u izražaju *IL-1β* i *TNF-α* između skupina nepotaknutih stanica (netretirane: *IL-1β* 2,13±0,64, *TNF-α* 0,76±0,30; anti-Fas 100 ng/mL: *IL-1β* 2,46±0,66, *TNF-α* 0,57±0,07; anti-Fas 10 ng/mL: *IL-1β* 2,82±0,63, *TNF-α* 0,66±0,13, Slika 3B). Izražaj *IL-6* bio je općenito nizak u svim skupinama (Ct vrijednosti ~ 35) te iako je transkripcijska aktivnost nešto veća u skupinama upalno potaknutih stanica tretiranih protutijelom anti-Fas, razlika nije dosegla razinu statističke značajnosti (Slika 3B). Agonističko protutijelo primijenjeno u niskim dozama također je pojačalo izražaj *Mid 1* u upalno potaknutim stanicama koštane srži (izotipsko kontrolno protutijelo 42,06±7,00; anti-Fas 100 ng/ml 63,29±3,32; anti-Fas 10 ng/ml 64,75±11,91), a sama upalna stimulacija u skupinama stanica tretiranih izotipskim kontrolnim protutijelom nije izazvala značajan porast njegovog izražaja u odnosu na nepotaknute stanice (izotipsko kontrolno protutijelo 41,31±8,35, anti-Fas 100 ng/ml 54,14±8,81, anti-Fas 10 ng/ml 50,47±7,73, Slika 3B).

Iz opisanih rezultata može se zaključiti da primjena protutijela-anti Fas u koncentracijama 100 i 10 ng/ml ima slabo apoptotsko djelovanje te izraženo proupalno djelovanje kroz porast izražaja proupalnih citokina koji je praćen porastom izražaja *Mid 1*.

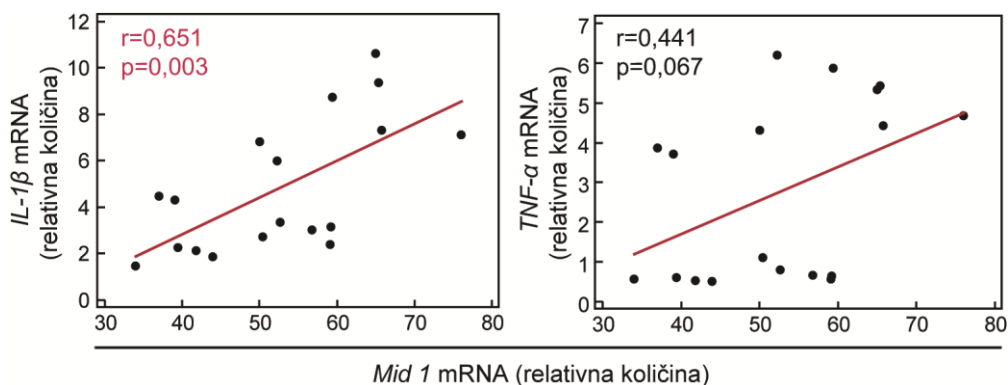


Slika 3. Apoptotsko i proupalno djelovanje niskih koncentracija neoligomeriziranog protutijela anti-Fas. (A) Udio apoptotičnih (aneksin V⁺) i mrtvih (aneksin V⁺7-AAD⁺) stanica mijeloidne (CD11b⁺Gr1⁺) i limfoidne loze (CD3⁺/B220⁺/NK1.1⁺) i **(B)** izražaj *IL-1β*, *TNF-α*, *IL-6* i *Mid 1* u skupinama nepotaknutih (NS) i upalno potaknutih stanica (S) tretiranim izotipskim kontrolnim protutijelom (NI IgG) i/ili protutijelom anti-Fas (aFas). Po 10⁶ stanica posađeno je u zdenac pločice za kulturu s 96 zdenaca. Za upalno poticanje dodana je bakterija *M. tuberculosis* inaktivirana toplinom u konačnoj koncentraciji 2 μg/mL, a nakon inkubacije 1h/37°C dodano je protutijelo anti-Fas u koncentracijama 100 ili 10 ng/ml, ili izotipsko kontrolno protutijelo u koncentraciji 100 ng/ml te su stanice inkubirane 18h/37°C, nakon čega su uzete za protočnu citometriju i/ili izolaciju RNA. Stanice su uzgajane u triplikatima (n=3), koji su korišteni za analizu protočnom citometrijom i analizu genskog izražaja. Pokusi su ponovljeni dva puta sa sličnim rezultatima. Prikazane su pojedinačne vrijednosti svake skupine (crni kružići), a vodoravne crte označavaju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija, crvene linije označavaju statistički značajnu

razliku unutar skupina nepotaknutih i upalno potaknutih stanica, a plave linije označavaju statistički značajnu razliku između odgovarajućih istovjetno tretiranih nepotaknutih i upalno potaknutih stanica. Za analizu razlika korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) sa Student-Neuman-Keul *post-hoc* testom za analizu razlika između skupina, a razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

5.3. Izražaj gena *Mid 1* potaknut neapoptotskom signalizacijom protutijela anti-Fas povezan je s izražajem gena proupalnog citokina *IL-1 β*

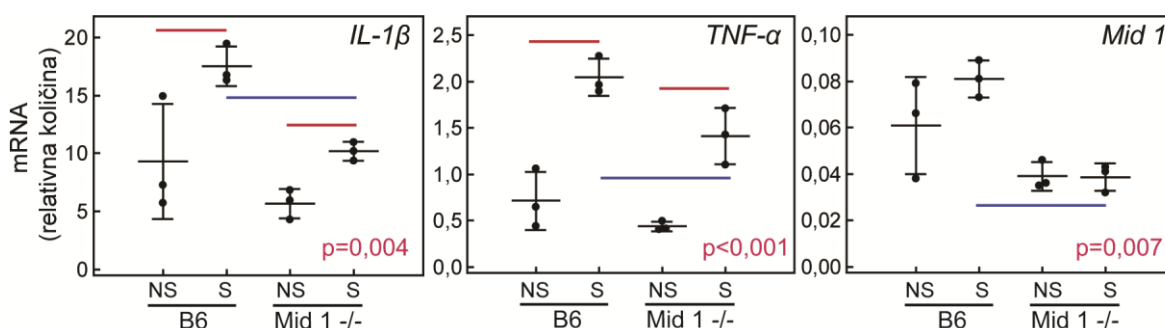
U prethodnim pokusima opažen je porast izražaja *Mid 1* u upalno potaknutim stanicama i to samo u skupinama tretiranim agonističkim protutijelom bez prisutnosti oligomerizirajuće bjelančevine G, što upućuje na važnost signalizacije putem receptora Fas za pojačanje njegovog izražaja. S obzirom na to da su promjene izražaja *Mid 1* manjeg raspona u odnosu na proupalne citokine, analizirala sam njihovu međusobnu povezanost Pearsonovim korelacijskim testom. U svim je pokusima na neapoptotskim koncentracijama izražaj *Mid 1* značajno povezan s izražajem *IL-1 β* ($r=0,651$, $p=0,003$) međutim nije utvrđena značajna povezanost s izražajem *TNF- α* ($r=0,441$, $p=0,067$, Slika 4). Značajnost povezanosti se ne mijenja ako se povezanost promatra samo unutar skupine nepotaknutih stanica (*IL-1 β* : $r=0,800$, $p=0,01$; *TNF- α* : $r=0,280$, $p=0,470$) ili skupine upalno potaknutih stanica (*IL-1 β* : $r=0,736$, $p=0,024$; *TNF- α* : $r=0,451$, $p=0,22$, nije prikazano).



Slika 4. Povezanost izražaja *Mid 1* s izražajem gena proupalnih citokina u stanicama koštane srži miševa soja B6 u svim uzorcima pokusa u kojem je procjenjivano djelovanje neapoptotskih koncentracija protutijela anti-Fas (opisano u Slici 3, $n=18$). r , Pearsonov korelacijski koeficijent; p , razina statističke značajnosti.

5.4. Upalno potaknute stanice koštane srži miševa *Mid 1* $-/-$ pojačavaju izražaj gena proupalnih citokina

S obzirom na povezanost izražaja gena *Mid 1* i *IL-1 β* , sljedeći korak bio je utvrditi je li funkcionalan *Mid 1* nužan za povećanje izražaja gena proupalnih citokina te sam usporedila izražaj *IL-1 β* i *TNF- α* u upalno potaknutim i nepotaknutim stanicama miševa s izbačenim genom *Mid 1* u odnosu na miševe divljeg tipa (soj B6). Izražaj *IL-1 β* i *TNF- α* bio je značajno veći u skupinama upalno potaknutih stanica koštane srži miševa B6 (*IL-1 β* 17,51 \pm 1,70; *TNF- α* 2,05 \pm 0,20) i *Mid 1* $-/-$ (*IL-1 β* 10,18 \pm 0,82; *TNF- α* 1,41 \pm 0,30) u odnosu na skupine nepotaknutih stanica (B6: *IL-1 β* 9,31 \pm 4,93, *TNF- α* 0,71 \pm 0,31; *Mid 1* $-/-$: *IL-1 β* 5,69 \pm 1,27, *TNF- α* 0,44 \pm 0,05, Slika 5). Iako je izražaj gena *IL-1 β* i *TNF- α* bio manji u skupini upalno potaknutih stanica koštane srži miševa *Mid 1* $-/-$ u odnosu na skupinu upalno potaknutih stanica koštane srži miševa B6, pojačanje izražaja proupalnih citokina u skupini potaknutih stanica miševa *Mid 1* $-/-$ u odnosu na kontrolnu skupinu nepotaknutih stanica upućuje na zaključak da *Mid 1* nije nužan za pojačanje izražaja proupalnih citokina potaknuto upalom. S obzirom na podjednak izražaj *Mid 1* u upalno potaknutim i nepotaknutim stanicama miševa B6, potrebne su daljnje analize s ciljem razlučivanja djelovanja *Mid 1* u kontekstu aktivacije receptora Fas.



Slika 5. Izražaj gena proupalnih citokina u nepotaknutim (NS) i upalno potaknutim (S) stanicama miševa divljega tipa (B6) i miševa bez funkcionalnog *Mid 1* (*Mid 1* $-/-$). Po 10^6 stanica posađeno je u zdenac pločice za kulturu s 96 zdenaca. Za upalno poticanje dodana je bakterija *M. tuberculosis* inaktivirana toplinom u konačnoj koncentraciji 2 μ g/mL, a nakon inkubacije 18h/37°C stanice su uzete za izolaciju RNA. Stanice su uzgajane u triplikatima (n=3), koji su korišteni za analizu genskog izražaja. Pokus je napravljen jednom. Prikazane su pojedinačne vrijednosti svake skupine (crni kružići), a vodoravne crte označavaju aritmetičku sredinu \pm standardna devijacija, crvene linije označavaju statistički značajnu razliku unutar svakog soja, a plave linije označavaju statistički značajnu razliku između odgovarajućih nepotaknutih i upalno potaknutih stanica. Za analizu razlika korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) sa Student-Neuman-Keul *post-hoc* testom za analizu razlika između skupina, a razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

6. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da niske koncentracije neoligomerizirao agonističkog protutijela anti-Fas primijenjene *in vitro* izazivaju apoptozu malog udjela mijeloidnih stanica te potiču izražaj gena proupalnih citokina i *Mid 1* u stanicama koštane srži, a oba su učinka izraženija na stanicama koje su upalno potaknute dodatkom inaktivirane bakterije *M. tuberculosis*. To je očekivan nalaz jer upalni podražaj polarizira stanice urođene imunosti prema upalnom izvršnom odgovoru aktivacijom PRR i povećava njihovu osjetljivost na apoptozu posredovanom receptorom Fas (O'Donnell *i sur.* 2015). U ovom istraživanju primijenila sam upalni podražaj inaktiviranom bakterijom *M. tuberculosis* jer je naša skupina proupalne učinke prvo opisala u modelu AIA čije poticanje zahtijeva primjenu potpunog Freundovog adjuvansa (CFA, prema engl. *complete Freund's adjuvant*) u čijem je sastavu i *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* aktivira receptor sličan Tollu (TLR, prema engl. *Toll-like receptor*) 2 iz skupine receptora PRR urođene imunosti. Zato je apoptotski učinak aktivacije receptora Fas najizraženiji na stanicama granulocitno-monocitne populacije, dok je učinak na limfoidnu populaciju bio neznatan. To je također posljedica spontanog odumiranja limfoidnih stanica bez adekvatnog podražaja antigenskog receptora ili citokina koji podržavaju njihovo preživljenje, a vidljivo je iz visokog udjela mrtvih stanica zabilježenog i u skupini kontrolnih netretiranih stanica. Osim granulocitno-monocitne populacije, pokušala sam analizirati i populaciju makrofaga, međutim oni isto zahtijevaju specifične uvjete i postupak kultivacije (Ogawa *i sur.* 2019), pa je udio mrtvih makrofaga kratkotrajnoj kulturi primijenjenoj u ovom istraživanju bio visok te su izostavljeni iz daljnjih analiza. Aktivacija receptora Fas na makrofazima predmet je budućih istraživanja u specifičnim uvjetima kulture, jer je pokazano da je izražaj receptora Fas na makrofazima važan za tijek artritisa (Huang *i sur.* 2014). S obzirom na visoko preživljenje stanica granulocitno-monocitne loze pretpostavka je da izražaj gena određen u stanicama pune koštane srži za potrebe ovog istraživanja primarno reflektira transkripcijsku aktivnost tih stanica. To bi se trebalo potvrditi analiziranjem kultura stanica koštane srži u zasebnim populacijama, uz pomoć uređaja za razvrstavanje stanica.

Koncentracija i stupanj oligomerizacije liganda odgovornih za apoptotske ili proupalne signalne puteve receptora Fas opisani su u raznim istraživanjima. Buchbinder *i sur.* pokazali su da prevaga apoptotskog puta ili aktivacije NFκB pri niskim dozama liganda Fas ovisi o stohastičkim učincima unutar signalnih puteva, prvenstveno apoptotskog (Buchbinder *i sur.* 2018). Hohlbaum *i sur.* pokazali su da oblici liganda sa sposobnošću oligomerizacije posjeduju značajno veću sposobnost indukcije apoptoze i upalne reakcije neutrofila, dok topljivi oblik liganda koji je prirodni produkt metaloproteinazne aktivnosti i ima manju sposobnost oligomerizacije blokira navedene učinke (Hohlbaum *i sur.* 2000). Seino *i sur.* pokazali su da topljivi ligand Fas i protutijelo anti-Fas potiču kemotaksiju neutrofila već u neoligomeriziranom

obliku (Seino *i sur.* 1998). Osim koncentracije i stupnja oligomerizacije liganda, na vrstu odgovora utječu i razina izražaja receptora kao i aktivnost ostalih signalnih puteva u stanici (Siegmond *i sur.* 2017). S obzirom na to da se u našem istraživanju povećanje izražaja gena proupalnih citokina i *Mid 1* pojavljuje tek u upalno potaknutim stanicama, rezultati jasno upućuju na to da je za neapoptotsku proupalnu signalizaciju putem receptora Fas, u uvjetima niske koncentracije liganda, potrebna određena razina upalne polarizacije stanica urođene imunosti. Proupalno djelovanje konzistentnije je pri višim koncentracijama neoligomeriziranog protutijela, dok je pri najnižoj koncentraciji bilo slabije i varijabilno među pokusima. Suprotno tome, oligomerizirano protutijelo imalo je isključivo apoptotski učinak čija je pojava bila neovisna o upalnoj stimulaciji.

S obzirom na povezanost izražaja *Mid 1* s izražajem *IL-1 β* i rezultate ranijih istraživanja očekivala sam da u upalno potaknutim stanicama miševa *Mid 1* $-/-$ neće biti značajnog porasta izražaja proupalnih citokina u odnosu na nepotaknute stanice, međutim taj je učinak izostao, za što postoji nekoliko mogućih razloga. Prvo, uvjeti *in vitro* ne odgovaraju u potpunosti uvjetima *in vivo*, u kojima su stanice produljeno izložene relativno niskim koncentracijama bakterije *M. tuberculosis* u odnosu na visoku koncentraciju kratkotrajno primijenjenu u pokusu prikazanom u ovom istraživanju. *In vivo* je proupalno djelovanje *Mid 1* posredovano aktivacijom smrtonosnog receptora posredstvom liganda TRAIL opisano u radovima Collisona *i sur.* u modelima astme (Collison *i sur.* 2013), eozinofilnog ezofagitisa (Collison *i sur.* 2015) i plućnoj fibrozi (Collison *i sur.* 2019), a naša istraživačka skupina opisala je protuupalno djelovanje receptora Fas na mišjem modelu artritisa potaknutog antigenom, praćeno smanjenim izražajem *Mid 1* (Lukač 2020). Preliminarni rezultati našeg laboratorija na manjem broju jedinki sa izbačenim genom *Mid 1* upućuju na učinak inaktivacije *Mid 1* u smislu ublažavanja artritisa potaknutog antigenom, a slično je primijećeno i pri tretiranju miševa metforminom koji, među ostalim učincima, inhibira vezivanje *Mid 1* na PP2A (Kickstein *i sur.* 2010). Drugi mogući razlog izostanka učinka *in vitro* je da proupalno djelovanje *Mid 1* nije izravno posredovano pojačanim lučenjem proupalnih citokina, već drugim mehanizmima poput djelovanja na migraciju ili stvaranje NETs koji su u neutrofilima vezani uz djelovanje mikrotubula (Yadav *i sur.* 2019; Neeli *i sur.* 2009), na koje se *Mid 1* veže, te su potrebna daljnja funkcijska istraživanja tih stanica u kontekstu izostanka ili inhibicije djelovanja *Mid 1*. Treća mogućnost je djelovanje bjelančevine Midline 2 (*Mid 2*), koja je po građi i staničnom smještaju slična bjelančevini *Mid 1* te također posjeduje funkciju E3 ubiktivitnske ligaze (Buchner *i sur.* 1999). Pretpostavljeno je da u uvjetima izbačenog ili nefunkcionalnog gena *Mid 1* njegovo djelovanje tijekom embrionalnog razvoja može djelomično nadomjestiti *Mid2* (Granata *i sur.* 2005), a moguće je da se to događa i u tijeku upalne aktivacije. Ovo istraživanje je bilo ograničeno u smislu mogućnosti izvedbe pokusa sa stanicama miševa *Mid 1* $-/-$ zbog tek nedavno uspostavljene kolonije i malog broja homozigotnih jedinki. Stoga u budućnosti planiramo uspostavu

dugotrajnijih kultura s blažom upalnom stimulacijom, usporedbom učinka agonističkog anti-Fas protutijela na stanicama miševa Mid 1 $-/-$ i uvođenjem funkcijskih testova.

Dosad je pokazano sudjelovanje bjelančevine Mid 1 u patogenezi malignih, neurodegenerativnih i kroničnih upalnih bolesti, koje su rastući zdravstveni problem te imaju znatan utjecaj na kvalitetu života oboljelih. Terapijske mogućnosti često su ograničenog uspjeha ili nose rizik za pacijenta, zbog čega su potrebna daljnja bazična istraživanja mehanizama ovih bolesti u smislu pronalaženja novih terapijskih ciljnih molekula. Mid 1 je novootkriveni posrednik povezan sa smrtonosnim receptorima, čija blokada ima potvrđene protuupalne učinke u modelima bolesti *in vivo*, te je važno dalje istraživati regulacijske mehanizme njegovog djelovanja i mogućnosti potencijalnog terapijskog blokiranja.

7. ZAKLJUČCI

1. Aktivacija receptora Fas izazvana oligomeriziranim i neoligomeriziranim agonističkim protutijelom uzrokuje apoptozu mijeloidnih stanica mišje koštane srži *in vitro*, a udio apoptotskih stanica pada sa smanjenjem koncentracije protutijela.
2. Aktivacija receptora Fas neoligomeriziranim agonističkim protutijelom *in vitro* potiče izražaj gena proupalnih citokina i *Mid 1* u upalno potaknutim mišjim stanicama koštane srži.
3. Inaktivacija gena *Mid 1* ne koči porast izražaja gena proupalnih citokina izazvan upalnim podražajem *in vitro*.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Nataši Kovačić na tome što sam bila dobrodošla, na savjetima i pomoći, vremenu i trudu, jer bez nje ovaj rad ne bi bio moguć.

Zahvaljujem članovima Laboratorija za molekularnu imunologiju na tome što su me naučili raditi u laboratoriju i bili tu da pomognu.

Zahvaljujem svojoj obitelji na slušanju i savjetima.

I želim zahvaliti Hanibalu na njegovom oštrom oku, na strpljenju dok je slušao priče o Fasu i njegovoj podršci.

9. POPIS LITERATURE

- Adachi M, Suematsu S, Kondo T i sur. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet.* 1995;113:294-300. doi: 10.1038/ng1195-294.
- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):745-56. doi: 10.1038/nri1184
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:459–89. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942
- Aranda-Orgilles B, Rutschow D, Zeller R, Karagiannidis AI, Kohler A, Chen C i sur. Protein phosphatase 2A (PP2A)-specific ubiquitin ligase MID1 is a sequence-dependent regulator of translation efficiency controlling 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK-1). *J Biol Chem.* 2011;286(46):39945-57. doi: 10.1074/jbc.M111.224451
- Baldini R, Mascaro M, Meroni G. The *MID1* gene product in physiology and disease. *Gene.* 2020 Jul 15;747:144655. doi: 10.1016/j.gene.2020.144655
- Boding L, Hansen AK, Nielsen MM, Meroni G, Braunstein TH, Woetmann A i sur. Midline 1 controls polarization and migration of murine cytotoxic T cells. *Immun Inflamm Dis.* 2014;2(4):262-271. doi: 10.1002/iid3.44
- Boding L, Hansen AK, Meroni G, Johansen BB, Braunstein TH, Bonefeld CM i sur. Midline 1 directs lytic granule exocytosis and cytotoxicity of mouse killer T cells. *Eur J Immunol.* 2014;44(10):3109-3118. doi: 10.1002/eji.201344388
- Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F i sur. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature.* 1995 Feb 2;373(6513):441-4. doi: 10.1038/373441a0
- Buchbinder JH, Pischel D, Sundmacher K, Flassig RJ, Lavrik IN. Quantitative single cell analysis uncovers the life/death decision in CD95 network. *PLoS Comput Biol.* 2018 Sep 26;14(9):e1006368. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006368
- Buchner G, Montini E, Andolfi G, Quaderi N, Cainarca S, Messali S i sur. MID2, a homologue of the Opitz syndrome gene MID1: similarities in subcellular localization and differences in expression during development. *Hum Mol Genet.* 1999 Aug;8(8):1397-407. doi: 10.1093/hmg/8.8.1397
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC i sur. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science.* 1994 Mar 25;263(5154):1759-62. doi: 10.1126/science.7510905
- Collison A, Hatchwell L, Verrills N, Wark PA, de Siqueira AP, Tooze M i sur. The E3 ubiquitin ligase midline 1 promotes allergen and rhinovirus-induced asthma by inhibiting protein phosphatase 2A activity. *Nat Med.* 2013;19:232-7. doi: 10.1038/nm.3049

- Collison A, Li J, Pereira de Siqueira A, Zhang J, Toop HD, Morris JC i sur. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand regulates hallmark features of airways remodeling in allergic airways disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;51(1):86-93. doi: 10.1165/rcmb.2013-0490OC
- Collison AM, Sokulsky LA, Sherrill JD, Nightingale S, Hatchwell L, Talley NJ i sur. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) regulates midline-1, thymic stromal lymphopoietin, inflammation, and remodeling in experimental eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136:971-82. doi: 10.1016/j.jaci.2015.03.031
- Collison AM, Li J, de Siqueira AP, Lv X, Toop HD, Morris JC i sur. TRAIL signals through the ubiquitin ligase MID1 to promote pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2019;19(1):31. doi: 10.1186/s12890-019-0786-x
- Cuda CM, Agrawal H, Misharin AV, Haines GK, 3rd, Hutcheson J, Weber E i sur. Requirement of myeloid cell-specific Fas expression for prevention of systemic autoimmunity in mice. *Arthritis Rheum.* 2012;64(3):808-20. 2012. doi:10.1002/art.34317
- 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. doi: 10.1016/s1359-6101(03)00021-2
- Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005 Jun;4(3):281-6. doi: 10.2174/1568010054022024
- Granata A, Savery D, Hazan J, Cheung BMF, Lumsden A, Quaderi NA. Evidence of functional redundancy between MID proteins: implications for the presentation of Opitz syndrome. *Dev Biol.* 2005 Jan 15;277(2):417-24. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.09.036
- 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. doi: 10.1126/science.270.5239.1189
- Han X, Du H, Massiah MA. Detection and characterization of the *in vitro* E3 ligase activity of the human MID1 protein. *J Mol Biol.* 2011 Apr 8;407(4):505-20. doi: 10.1016/j.jmb.2011.01.048.
- Hohlbaum A, Moe S, Marshak-Rothstein A. Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J Exp Med.* 2000 Apr 3;191(7):1209-20. doi: 10.1084/jem.191.7.1209
- Holler N, Tardivel A, Kovacsovics-Bankowski M, Hertig S, Gaide O, Martinon F i sur. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol.* 2003 Feb;23(4):1428-40. doi: 10.1128/MCB.23.4.1428-1440.2003
- Huang QQ, Birkett E, Koessler RE, Cuda CM, Haines KG 3rd, Jin JP i sur. Fas signaling in macrophages promotes chronicity in K/BxN serum-induced arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014 Jan;66(1):68-77. doi: 10.1002/art.38198

- Igney FH, Krammer PH. Tumor counterattack: fact of fiction? *Cancer Immunol Immunother.* 2005 Nov;54(11):1127–1136. doi: 10.1007/s00262-005-0680-7
- Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, Rutschow D, Zeller R, Sharkey J i sur. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Dec 14;107(50):21830-5. doi: 10.1073/pnas.0912793107
- Krauss S, Griesche N, Jastrzebska E, Chen C, Rutschow D, Achmüller C i sur. Translation of HTT mRNA with expanded CAG repeats is regulated by the MID1-PP2A protein complex. *Nat Commun.* 2013;4:1511. doi: 10.1038/ncomms2514.
- Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Nov;65(22):3525-44. doi: 10.1007/s00018-008-8170-7
- Lazić Mosler E, Lukač N, Flegar D, Fadljević M, Radanović I, Cvija H i sur. Fas receptor induces apoptosis of synovial bone and cartilage progenitor populations and promotes bone loss in antigen-induced arthritis. *FASEB J.* 2019;33:3330-3342. doi: 10.1096/fj.201801426R
- Liu E, Knutzen CA, Krauss S, Schweiger S, Chiang GG. Control of mTORC1 signaling by the Opitz syndrome protein MID1. *Proc Natl Acad U S A.* 2011 May 24;108(21):8680-5. doi: 10.1073/pnas.1100131108
- Lukač N. Stanični i molekularni posrednici subhondralnoga koštanoga razaranja u artritisu [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2020.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM i sur. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;182(5):1545-56. doi: 10.1084/jem.182.5.1545
- Matthes F, Hettich MM, Schilling J, Flores-Dominguez D, Blank N, Wiglenda T i sur. Inhibition of the MID1 protein complex: a novel approach targeting APP protein synthesis. *Cell Death Discov.* 2018 Jan 29;4:4. doi: 10.1038/s41420-017-0003-8
- Morell M, Varela N, Marañón C. Myeloid populations in systemic autoimmune diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017 Oct;53(2):198-218. doi: 10.1007/s12016-017-8606-7
- Neeli I, Dwivedi N, Khan S, Radic M. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun.* 2009;1(3):194-201. doi: 10.1159/000206974
- Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Mar 1;4(3):a006049. doi: 10.1101/cshperspect.a006049
- O'Donnell JA, Kennedy CL, Pellegrini M, Nowell CJ, Zhang JG, O'Reilly LA i sur. Fas regulates neutrophil lifespan during viral and bacterial infection. *J Leukoc Biol.* 2015;97:321-6. doi: 10.1189/jlb.3AB1113-594RR

- Ogawa K, Tsurutani M, Hashimoto A, Soeda M. Simple propagation method for resident macrophages by co-culture and subculture, and their isolation from various organs. *BMC Immunol.* 2019 Sep 18;20(1):34. doi: 10.1186/s12865-019-0314-z
- Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EI, Berger W i sur. Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet.* 1997 Nov;17(3):285-91. doi: 10.1038/ng1197-285
- Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Tough TW, Alderson MR, Lynch DH. *gld/gld* mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur J Immunol.* 1994 Apr;24(4):928-33. doi: 10.1002/eji.1830240422
- Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-aminocoumarin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry.* 1992;13(2):204-8. doi: 10.1002/cyto.990130216
- Schweiger S, Dorn S, Fuchs M, Köhler A, Matthes F, Müller EC i sur. The E3 ubiquitin ligase MID1 catalyzes ubiquitination and cleavage of Fu. *J Biol Chem.* 2014 Nov 14;289(46):31805-31817. doi: 10.1074/jbc.M113.541219
- Seino K, Iwabuchi K, Kayagaki N, Miyata R, Nagaoka I, Matsuzawa A i sur. Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *J Immunol.* 1998 Nov 1;161(9):4484-8
- Siegmund D, Lang I, Wajant H. Cell death-independent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2. *FEBS J.* 2017;284(8):1131-59. doi: 10.1111/febs.13968
- Sun L, Pham TT, Cornell TT, McDonough KL, McHugh WM, Blatt NB i sur. Myeloid-specific gene deletion of protein phosphatase 2A magnifies MyD88- and TRIF-dependent inflammation following endotoxin challenge. *J Immunol.* 2017;198:404-416. doi: 10.4049/jimmunol.1600221
- Sun M, Ames KT, Suzuki I, Fink PJ. The cytoplasmic domain of Fas ligand costimulates TCR signals. *J Immunol.* 2006;177(3):1481-91. doi: 10.4049/jimmunol.177.3.1481
- Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, Winter J, Krauss S, Ropers HH i sur. MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet.* 2001 Nov;29(3):287-94. doi: 10.1038/ng762
- Tu-Rapp H, Hammermüller A, Mix E, Kreutzer HJ, Goerlich R, Köhler H i sur. A proinflammatory role for Fas in joints of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(5):R404-14. doi: 10.1186/ar1205
- Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:693-733. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641
- Yadav SK, Stojkov D, Feigelson SW, Roncato F, Simon HU, Yousefi S i sur. Chemokine-triggered microtubule polymerization promotes neutrophil chemotaxis and invasion but not transendothelial migration. *J Leukoc Biol.* 2019 Apr;105(4):755-766. doi: 10.1002/JLB.3A1118-437RR

10. SAŽETAK

Midline 1 kao posrednik proupalne signalizacije receptora Fas u mijeloidnim stanicama mišje koštane srži

Sara Priselac

Mijeloidne stanice pridonose pokretanju i održavanju upalnog odgovora, što uz nedostatnu regulaciju rezultira oštećenjem tkiva koje prati mnoge autoimunosne bolesti. Sustav Fas/ligand Fas može ograničiti upalni odgovor apoptozom imunskih stanica, a može ga i potaknuti slabio istraženim proupalnim mehanizmima. Nedavno smo u mišjem modelu artritisa opisali proupalnu signalnu os receptora Fas putem bjelančevine Mid 1 u mijeloidnim stanicama. Cilj rada bio je istražiti učinak neapoptotske signalizacije receptora Fas na izražaj gena *Mid 1* i proupalnih citokina u upalno potaknutim stanicama koštane srži, te važnost Mid 1 u njihovoj upalnoj aktivaciji.

Stanice su inkubirane *in vitro* s oligomeriziranim i različitim dozama neoligomeriziranog agonističkog protutijela anti-Fas, sa i bez upalnog podražaja inaktiviranom bakterijom *M. tuberculosis*. Udio apoptotičnih stanica određen je protočnom citometrijom na temelju vezanja aneksina V. Izražaj gena proupalnih citokina *IL 1-β* i *TNF-α* te gena *Mid 1* određen je postupkom kvantitativne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

Rezultati su pokazali da oligomerizirano agonističko protutijelo djeluje isključivo apoptotski, a neoligomerizirano agonističko protutijelo anti-Fas izaziva apoptozu malog udjela mijeloidnih stanica te u upalno potaknutim stanicama dodatno potiče izražaj gena proupalnih citokina i *Mid 1*. Inaktivacija gena *Mid 1* nije u potpunosti zakočila porast izražaja gena proupalnih citokina u upalno potaknutim stanicama koštane srži.

Ključne riječi: Fas, Mid 1, apoptoza, upala, mijeloidne stanice

11. SUMMARY

Midline 1 as a mediator of inflammatory signaling of Fas receptor in murine myeloid bone marrow cells

Sara Priselac

Myeloid cells initiate and support inflammation, which damages tissues in the course of autoimmune diseases. Fas/Fas ligand system hamper the inflammatory response via immune cell apoptosis, but can also enhance it via less understood proinflammatory mechanisms. We recently described a proinflammatory Fas-Mid 1 signaling axis in myeloid cells during murine arthritis. The aim of this study was to investigate the effect of non-apoptotic Fas signaling on the expression of *Mid 1* and proinflammatory cytokine genes in murine bone marrow cells, and the role of Mid 1 in their inflammatory response.

Cells were treated *in vitro* with oligomerized and various concentrations of non-oligomerized agonistic anti-Fas antibody, in the presence or absence of inactivated *M. tuberculosis*. The proportion of apoptotic cells was determined by annexin V binding using flow cytometry. Gene expression of *IL1-β*, *TNF-α*, and *Mid 1* was assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction.

Results revealed a sole apoptotic effect of the oligomerized agonistic antibody, while the non-oligomerized antibody had a weak apoptotic effect on myeloid cells, but upregulated *Mid 1* and proinflammatory cytokine genes in inflammatory stimulated cells. Inactivation of *Mid 1* gene did not completely abolish the upregulation of proinflammatory cytokine genes in inflammatory stimulated bone marrow cells.

Key words: Fas, Mid 1, apoptosis, inflammation, myeloid cells