Uloga neuropeptida Y (NPY) u diferencijaciji osteoblasta

Matić, Igor

Doctoral thesis / Disertacija

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:954162

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Igor Matić

ULOGA NEUROPEPTIDA Y (NPY) U DIFERENCIJACIJI OSTEOBLASTA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2013.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Igor Matić

THE ROLE OF NEUROPEPTIDE Y (NPY) IN THE OSTEOGENIC DIFFERENTIATION

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013

Ovaj je doktorski rad izrađen na Sveučilištu u Zagrebu, Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Biološkom odsjeku, Zavodu za molekularnu biologiju, pod vodstvom doc. dr. sc. Inge Marijanović i na University of Connecticut Health Center, School of Dental Medicine, Department of Reconstructive Sciences, pod vodstvom prof. dr. sc. Ive Kalajzića, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem dragoj mentorici doc. dr. sc. Ingi Marijanović na prijateljstvu, strpljenju, uloženoj energiji i vrijednim savjetima tijekom novačkog statusa te posebno za vrijeme pisanja i izrade doktorskog rada.

Veliko hvala prof. dr. sc. Ivi Kalajziću na ukazanoj mogućnosti rada na University of Connecticut Health Center, na njegovoj nesebičnoj prijateljskoj i mentorskoj pomoći i podršci.

Hvala prof. dr. sc. Biserki Nagy na pruženoj prilici znanstvenog obrazovanja i usavršavanja na Zavodu za molekularnu biologiju.

Hvala mojim kolegama dr. sc. Katarini Mihalić-Caput, dipl. ing. Maji Antunović i prof. biol. Pavlu Josipoviću koji su svojim savjetima, druženjima i podrškom učinili moje novaštvo jedim od najljepših perioda u životu.

Hvala mom velikom učitelju dr. sc. Marku Kronenbergu.

Mnogi prijatelji u Hrvatskoj i SAD-u doprinijeli su direktno ili indirektno ovome radu i zbog toga im veliko hvala.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, svojim roditeljima i sestri na neizmjernoj ljubavi, podršci i odricanju.

Posvećeno mojim roditeljima Marijanu i Željki

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Doktorska disertacija

ULOGA NEUROPEPTIDA Y (NPY) U DIFERENCIJACIJI OSTEOBLASTA

IGOR MATIĆ

Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zavod za molekularnu biologiju
University of Connecticut Health Center, School of Dental Medicine, Department of Reconstructive Sciences

Neuropeptid Y (NPY) izražavaju stanice iz loze osteoblasta. *In vitro* studije su pokazale da NPY ima negativan učinak na diferencijaciju osteoblasta. Vođeni pretpostavkom da NPY izražen u stanicama loze zrelih osteoblasta može kontrolirati diferencijaciju mezenhimskih progenitorskih stanica istražili smo *in vivo* ulogu neuropeptida Y kao regulatora osteogeneze. U tu svrhu uzgojili smo transgeničnog miša (Col2.3NPY-ires GFPtopaz). Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR) i NPY EIA analiza pokazali su pojačani izražaj NPY-a u transgeničnim miševima. Col2.3NPY miševi imali su 25% smanjen udio trabekularne kosti i 7-10% tanje trabekule. Analiza genske ekspresije nije pokazala nikakve razlike u ekspresiji OC, BSP i DMP-1 kod transgeničnih životinja. Col2.3NPY mCOB kulture imale su 6 puta manju površinu mineralizacije te smanjeni izražaj markera osteogeneze. Ovaj mišji model pokazao je da lokalno izražen NPY ima važnu ulogu u regulaciji koštane mase te regulira promjene u koštanoj masi. Svi ovi rezultati pokazali su da periferni signalni put NPY-a ima bitnu ulogu u koštanoj pregradnji.

(96 stranica/ 30 slika/284 literaturnih navoda/jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: kost/koštana pregradnja/osteoblasti/neuropeptid Y

Mentor: Inga Marijanović, doc. dr. sc.; Ivo Kalajzić, prof. dr. sc.

Ocjenjivači: Gordana Lacković-Venturin, prof.dr.sc.; Inga Marijanović, doc.dr.sc.;
Alan Ivković, doc.dr.sc.

University of Zagreb Doctoral Thesis

Faculty of Science

Division of Biology

ENGLESKI: THE ROLE OF NEUROPEPTIDE Y (NPY) IN THE OSTEOGENIC DIFFERENTIATION

IGOR MATIĆ

Faculty of Science, Division of Biology, Department of Molecular Biology
University of Connecticut Health Center, School of Dental Medicine, Department of Reconstructive Sciences

Neuropeptide Y is expressed by osteoblast lineage cells and when administered *in vitro* can inhibit osteoblast lineage differentiation. We hypothesize that NPY, generated by mature osteoblast lineage cells, can control and modulate differentiation of osteoprogenitor cells. In this study we have evaluated the effects of bone-specific overexpression by generating Col2.3NPY-ires GFPtopaz transgenic mice. RT-qPCR and NPY EIA analysis showed increased expression of NPY in transgenic mice. Col2.3NPY mice had 25% lower trabecular volume and 7-10% lower trabecular thickness. Gene expression analysis in Col2.3NPY mice did not show any changes in expression levels of OC, BSP and DMP-1. Terminal osteoblast differentiation was impaired in Col2.3NPY mCOB cultures as indicated by a 6-fold decrease in mineralized area and decreased expression of all osteogenic markers. Our model has shown that locally expressed NPY plays an important role in regulation of bone mass. All these findings suggest that peripheral mechanism of the NPY signaling is important in bone remodeling.

(96 pages/30 figures/284 references/original in Croatian)

Keywords: bone/bone remodeling/osteoblasts/neuropeptide Y

Supervisor: Inga Marijanović, doc. dr. sc.; Ivo Kalajzić, prof. dr. sc.

Reviewers: Gordana Lacković-Venturin, prof.dr.sc.; Inga Marijanović, doc.dr.sc.;
Alan Ivković, doc.dr.sc.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 2
   2.1. Koštano tkivo 2
      2.1.1. Osteoblasti 2
         2.1.1.1. Porijeklo i diferencijacija osteoblasta 3
         2.1.1.2. Utjecaj transkripcijskih faktora, faktora rasta i citokina na diferencijaciju osteoblasta 5
      2.1.2. Osteociti 6
      2.1.3. Osteoklasti 9
         2.1.3.1. Porijeklo i diferencijacija osteoklasta 10
         2.1.3.2. Vanjski signali diferencijacije osteoklasta 11
   2.2. Građa i razvoj kostiju 13
   2.3. Koštana pregradnja 15
   2.4. Neuropeptid Y 16
      2.4.1. Biosinteza NPY-a 17
      2.4.2. NPY signalni put 19
   2.5. NPY receptori 20
      2.5.1. Y1 receptor 22
      2.5.2. Y2 receptor 23
      2.5.3. Y4 receptor 24
      2.5.4. Y5 receptor 24
   2.6. NPY regulacija koštanog metabolizma 25
      2.6.1. Centralna uloga NPY-a u koštanom metabolizmu 25
      2.6.2. Lokalna uloga NPY-a u koštanoj pregradnji 28
   2.7. Odnos signalnog puta NPY-a i leptina 28
3. MATERIJALI I METODE 31
   3.1. Kloniranje Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa 31
   3.2. Genotipizacija 31
   3.3. Kultura stanica strome koštane srži (BMSC) 32
   3.4. Kultura mišjih kalvarijskih stanica (mCOB) 32
   3.5. Mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze i stupnja mineralizacije 33
   3.6. Mjerenje koncentracije NPY proteina 33

3.7. Imunocito/histokemijske metode 34
3.8. Histološka analiza ekspresije transgena 35
3.9. Histomorfometrijska analiza 36
3.10. Detekcija GFP-a u primarnim kulturama 36
3.11. Izolacija RNA i analiza genske ekspresije 37
3.12. Analiza promjene genske ekspresije prilikom *in vivo* mehaničkog opterećenja lakatne kosti 38
3.13. Analiza koštanog metabolizma mikro-kompjuteriziranom tomografijom 39
4. REZULTATI 41
4.1. Pojačana ekspresija NPY proteina u koštanom tkivu 41
4.2. Posljedice povećane ekspresije NPY proteina u koštanom tkivu *in vivo* 48
4.3. Smanjen udio trabekularne kosti u Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa 51
4.4. Parametri morfometrijskih promjena čvrste kosti nisu značajno promijenjeni u transgeničnih miševa 54
4.5. Povećana ekspresija NPY proteina u Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševima rezultira smanjenom mineralizacijom i smanjenom ekspresijom markera osteogeneze u kulturi mišjih kalvarijskih stanica 56
4.6. Relativna ekspresija NPY-a, Y1 receptora i markera osteogeneze u osteoblastima 61
4.7. NPY nije uključen u regulaciju Wnt signalnog puta 65
5. RASPRAVA 67
5.1. Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševi imaju pojačanu ekspresiju NPY proteina u koštanom tkivu 67
5.2. Pojačana ekspresija NPY proteina u koštanom tkivu mijenja koštanu masu trabekularne i čvrste kosti 68
5.3. Kulture mišjih kalvarijskih stanica dobivenih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa imaju smanjenu mineralizaciju i smanjenu ekspresiju markera osteogeneze 70
5.4. Pojačana ekspresija NPY proteina u kulturama stanica strome koštane srži ne mijenja diferencijaciju osteoblasta 72
5.5. NPY nije modulator Wnt signalnog puta 74
6. ZAKLJUČCI 77
7. LITERATURA 78
8. POPIS KRATICA 92

1. UVOD

Cilj ovog doktorskog rada je pobliže istražiti ulogu neuropeptida Y (NPY) u procesu osteogeneze. NPY se veže na Y2 receptore u hipotalamusu te se signal prenosi preko simpatičkog živčanog sustava do koštanog tkiva, gdje se NPY veže na lokalno izražene Y1 receptore (centralna uloga NPY-a) [1]. Lokalno izražen NPY potencijalno se veže na Y1 receptore te na taj način inhibira koštani metabolizam (lokalna uloga NPY-a) [1]. U ovom istraživanju korišteni su Col2.3NPY-ires-GFPtopaz transgenični miševi, gdje su NPY i zeleni fluorescentni protein (eng. green fluorescent protein, GFP) pod kontrolom 2.3 kb fragmenta promotora kolagena tipa I. Kod takvih miševa osim endogenog javlja se i pojačan izražaj NPY-a u osteoblastima i osteocitima zbog aktivnosti Col2.3 promotora. Vođeni pretpostavkom da NPY izražen u zrelim stanicama osteoblastične loze (osteoblasti i osteociti) može kontrolirati diferencijaciju stanica osteoblastne loze istražili smo *in vivo* ulogu neuropeptida Y kao regulatora osteogeneze.

<u>Specifični ciljevi predloženog istraživanja su:</u>

1) Napraviti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz transgenične miševe.
2) Utvrditi postoji li razlika u izražaju markera osteogeneze (BSP, OC, DMP-1), neuropeptida Y i Y1 receptora u koštanom tkivu Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa u odnosu na divlji tip.
3) Utvrditi razlike izražaja markera osteogeneze, neuropeptida Y i Y1 receptora u kulturi stanica strome koštane srži i mišjih kalvarijskih stanica izoliranih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa u odnosu na divlji tip.
4) Utvrditi razlike u stupnju mineralizacije i aktivnosti alkalne fosfataze u kulturi stanica strome koštane srži i mišjih kalvarijskih stanica izoliranih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa u odnosu na divlji tip.
5) Usporediti koštanu masu i brzinu mineralizacije novonastale kosti između Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Koštano tkivo

Koštano tkivo građeno je od različitih tipova stanica porijeklom iz mezenhima, kao što su osteoblasti, hondrociti, stromalne stanice koštane srži i adipociti. Svi navedeni tipovi stanica porijeklom su od zajedničkih mezenhimskih progenitora [2] koji su kasnije nazvani multipotentnim matičnim mezenhimskim progenitorima [3]. Druga komponenta koštanog tkiva je izvanstanični matriks. Kost, zajedno s hrskavicom ima tri osnovne funkcije: mehaničku, služi kao hvatište mišića kod pokretanja; zaštitnu, štiti vitalne organe i koštanu srž; metaboličku, djeluje kao rezerva iona, osobito kalcija i fosfata, s ciljem održavanja ravnoteže njihove koncentracije u serumu.

2.1.1. Osteoblasti

Osteoblasti su stanice mezenhimskog porijekla čija je osnovna funkcija stvaranje i održavanje koštanog tkiva. Osteoblasti tijekom diferencijacije i sazrijevanja stvaraju proteine koštanog matriksa. Jedan od najznačajnijih graditelja koštanog matriksa je kolagen tipa I, koji je zaslužan za specifičnu strukturu, elastičnost i snagu kosti, a čini gotovo 90 % organske komponente kosti [4]. Kolagena vlakna građena su od dva α1 i jednog α2 lanca. Osteokalcin, osteopontin, osteonektin te koštani sijaloprotein neki su od proteina koji čine nekolagenu komponentu kosti. Značajnu ulogu u organskoj građi kosti imaju i proteoglikan dekorin te biglikan. Svi ovi proteini imaju sposobnost vezivanja kalcija, koji je zaslužan za nakupljanje kristala hidroksiapatita ($3Ca_3(PO_4)_2 \cdot (OH)_2$) te njihovu orijentaciju i veličinu [4]. Tijekom sazrijevanja matriksa najprije se luče nekolagenski koštani proteini u koji se kasnije talože minerali. Sam proces mineralizacije započinje nakupljanjem minerala hidroksiapatita i anorganskih fosfatnih iona u vezikulama hondrocita i osteoblasta [5]. Kako vremenom kristali u vezikulama rastu, dolazi do njihovog pucanja i doticaja s izvanstaničnim okolišem, što omogućava njihov daljnji rast [5-7]. Pojedini proteini, poput koštanog sijaloproteina i osteopontina sudjeluju u staničnoj organizaciji koštanog matriksa jer sadrže vezujući Arg-Gly-Asp slijed kojeg prepoznaju osteoblasti i osteoklasti. Smatra se da je osteokalcin najspecifičniji koštani marker jer je njegov izražaj kod odraslih organizama ograničen na koštano tkivo, dentin i cementum. Poznato je da osteokalcin regulira sveobuhvatnu kontrolu

koštane mase, tako da se povećana koštana masa i poboljšana funkcija u modelu „knockout“ miša manifestira kao jedna od glavnih fenotipskih promjena [8].

Jedna od još nedovoljno istraženih funkcija osteoblasta je da oni u koštanoj srži pospješuju hematopoezu, točnije diferencijaciju limfocita B [9]. Unutar koštane srži pronađena je populacija stanica strome koja izražava citokine CXCL12 (prema engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 12*) i interleukin 7 (IL-7) koji imaju bitnu ulogu u procesu sazrijevanja limfocita B [10]. Naime prepro stanice B su u interakciji sa stanicama strome koje izražavaju CXCL12, dok jače diferencirane pro stanice B su u doticaju sa stanicama koje izražavaju IL-7. Oba citokina su izražena u stanicama loze osteoblasta što sugerira da su upravo osteoblasti uključeni u usmjeravanje diferencijacije hematopoetskih matičnih stanica prema limfocitima B [11-13].

Karakteristika membrana osteoblasta je da one obiluju alkalnom fosfatazom (AP, prema engl. *alkaline phosphatase*) i da sadrže receptore za tiroidni hormon, paratiroidni hormon kao i mnoge druge hormone [14]. Upravo vezivanjem ovakvih hormona javlja se tipični odgovor cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP, prema engl. *cyclic adenosine monophosphate*).

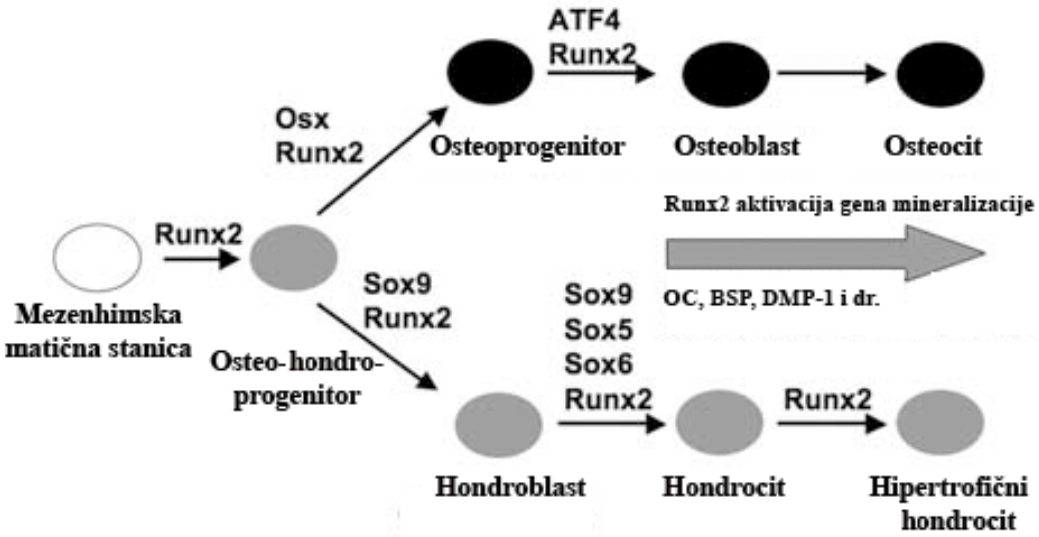
2.1.1.1 Porijeklo i diferencijacija osteoblasta

Osteoblasti su porijeklom od multipotentnih mezenhimskih matičnih stanica, koje postaju progenitori loze osteoblasta. Takvi progenitori proliferiraju i konačno diferenciraju kada su prepoznatljivi po izražaju specifičnih markera osteoblasta [4]. Diferencijacija osteoblasta kontrolirana je i vođena različitim faktorima rasta čiji se izražaj mijenja tijekom samog procesa diferencijacije (Slika 1). Na samom početku dolazi do nakupljanja mezenhimskih stanica i povećanog izražaja proteina „runt“ (Runx2, prema engl. *runt related transcription factor 2*) na područjima gdje će se formirati koštano tkivo [15]. Runx2 je dobro karakteriziran rani marker osteogeneze, koji usmjerava mezenhimske stanice ka osteoblastičnoj lozi. Izražavaju ga hondrociti i osteoblasti te ima bitnu ulogu u hondrogenezi i osteogenezi [15, 16]. Miševi sa izbačenim genom Runx2 (Runx2-/-) pokazuju potpuni nedostatak intramembranske i endohondralne osifikacije zbog nemogućnosti diferencijacije osteoblasta [17]. Poznato je da osim transkripcijskog faktora Runx2, u proces usmjeravanja diferencijacije prema osteoblastima i hondrocitima, uključena nekolicina drugih transkripcijskih faktora. Jedan od važnih faktora koji diferencijaciju osteohondroprogenitora

usmjerava prema osteoblastima je osterix (Osx) te „knockout“ mišji model posjeduje hipertrofičnu hrskavicu i normalnu razinu Runx2 proteina što ukazuje da je Osx nizvodno od Runx2 [18]. Transkripciju zrelih osteoblasta kontrolira transkripcijski faktor ATF4, koji posttranslacijski regulira sintezu kolagena tipa I [19]. Sinteza kolagena tipa I posljedica je pojačane proliferacije osteoblasta (aktivacija izražaja gena c-myc, c-fos i c-jun) koja je popraćena pojačanim izražajem gena koji kodiraju adhezijske proteine kao sto je fibronektin [20]. Nakon početne proliferacije dolazi do pojačanog izražaja gena koji su uključeni u organizaciju i pripremu za mineralizaciju koštanog izvanstaničnog matriksa, kao što je alkalna fosfataza, nakon čega slijedi mineralizacija i taloženje hidroksiapatita [20]. Zbog procesa mineralizacije dolazi do programirane stanične smrti osteoblasta (apoptoza) [21].

Runx2 ima važnu ulogu u procesu hondrogeneze. U procesu diferencijacije hondrocita faktori Sox9/10 suprimiraju njegov izražaj [22]. Kasnije dolazi do utišavanja njihovog izražaja što dovodi do pojačane transkripcije Runx2 gena kako bi koordinirao hipertrofiju hondrocita [23].

Dakle osteoblasti, neposredno prije konačnog formiranja kosti, odabiru jedan od tri moguća puta: 1. Zaostaju uklopljeni u mineraliziranom matriksu i postaju osteociti, 2. Preobraze se u neaktivne osteoblaste i postanu stanice koje oblažu koštanu površinu, 3. Odumiru programiranom staničnom smrću, apoptozom [24-27].



Slika 1. Transkripcijski faktori uključeni u proces diferencijacije osteoblasta i hondrocita. Prikazan je vremenski slijed transkripcije faktora koji usmjeravaju i kontroliraju osteogenezu i hondrogenezu. Aktivacijom Runx2 transkripcijskog faktora dolazi do kondenzacije mezenhima na mjestima gdje će formirati nova kost. Osterix (Osx) zajedno s Runx2 usmjerava osteohondroprogenitore prema lozi osteoblasta, dok je transkripcijska aktivnost zrelih osteoblasta kontrolirana faktorom ATF4. Runx2 uključen je u kontrolu razvoja hipertrofične hrskavice. U ranim stadijima diferencijacije hondrocita, Runx2 je zakočen hondrocitno-specifičnim faktorima Sox8 i Sox9. Kako diferencijacija napreduje, transkripcija Sox8/Sox9 gena je zakočena, kako bi Runx2 mogao regulirati i kontrolirati hipertrofiju hondrocita. Runx2 direktno aktivira transkripciju gena mineralizacije OC, BSP, DMP-1 i druge. Preuzeto i modificirano iz Franceschi i suradnici [23].

2.1.1.2 Utjecaj transkripcijskih faktora, faktora rasta i citokina na diferencijaciju osteoblasta

Osteogeneza je strogo reguliran i koordiniran proces koji uključuje interakciju različitih molekula kao što su faktori rasta, koštani morfogenetski proteini (BMP, prema engl. *bone morphogenetic proteins*) te specifičnih transkripcijskih faktora.

Najvažniju ulogu u kontroli izražaja gena bilo koje loze imaju transkripcijski faktori. Prvi takav koji ima najvažniju ulogu u diferencijaciji osteoblasta je Runx2 [15, 17]. Runx2 se veže na promotor osteokalcina (OC, prema engl. *osteocalcin*) te pospješuje njegovu transkripciju [15]. Osteokalcin jedan je od proteina koji sudjeluju u diferencijaciji osteoblasta. Poznato je da postoje transkripcijski faktori koji reguliraju izražaj gena Runx2. TAZ (prema engl. *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*) transkripcijski faktor povećava izražaj gena Runx2 te simultano inhibira transkripcijski faktor adipocita, PPAR-δ (prema engl. *peroxisome proliferator-activated receptor delta*) te na taj način usmjerava bipotentne progenitore osteoblasta/adipocita prema lozi osteoblasta [28].

Faktori rasta su topivi proteini koji se vežu na svoje receptore i na taj način sudjeluju u staničnom signaliziranju. Neki od njih pronađeni u lozi osteoblasta su transformacijski faktor rasta-β (TGF-β, prema engl. *transforming growth factor- β*), BMP, faktori rasta fibroblasta (FGF, prema engl. *fibroblast growth factor*), faktor rasta trombocita (PDGF, prema engl. *platelet-derived growth factor*) i inzulinu sličan faktor rasta (IGF, prema engl. *insulin-like*

growth factors). U ranim stadijima stvaranja koštanog tkiva TGF-β stimulira proliferaciju osteoprogenitora dok za vrijeme kasne diferencijacije osteoblasta ima inhibicijski učinak na diferencijaciju i mineralizaciju [29]. BMP usmjerava pluripotentne stanice prema lozi osteoblasta i pospješuje njihovu diferencijaciju [30]. Neki od ciljnih gena čiji je izražaj povećan zbog vezivanja BMP-a na njihove promotore su Runx2 [15], osterix [18] i TAZ [28]. Iako je FGF izražen u osteoblastima [31], mutirani mišji model nije objasnio ulogu FGF-a u skeletogenezi [32]. U *in vitro* uvjetima FGF stimulira proliferaciju osteoblasta [33]. PDGF je pronađen u osteoblastima i mezenhimskim stanicama [34] i ima jaki kemotaktički utjecaj na osteoblaste [35]. Kada govorimo o skeletogenezi, najznačajniju ulogu, uz hormone rasta, ima IGF. Hormoni rasta reguliraju rast kostiju te potiču stanice na otpuštanje IGF-a. IGF stimulira proliferaciju i zaslužan je za funkcioniranje zrelih osteoblasta [4].

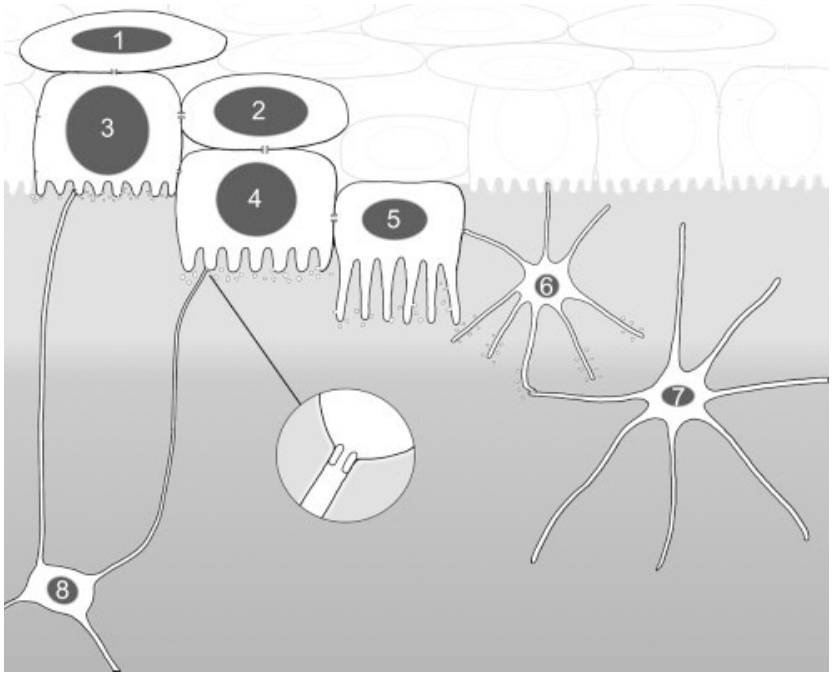
Osteoblasti su osjetljivi na lokalno izražene citokine prilikom infekcija, upala i cijeljenja rana. Rezultat staničnog odgovora na ove molekule može biti kako anabolički tako i katabolički. Poznato je da interleukin 1 (IL-1) regulira resorpciju [36] i stvaranje kosti [37]. Interleukin 6 (IL-6) inhibira proliferaciju osteoblasta i potiče njihovu diferencijaciju [38]. Još jedan dobro poznati inhibitor funkcije i diferencijacije osteoblasta je TNF-α (prema engl. *tumor necrosis factor- α*). TNF-α djeluje tako što inhibira proliferaciju te smanjuje izražaj gena proteina izvanstaničnog matriksa [39, 40].

Osteoblasti posjeduju i citoplazmatske receptore za steroidne hormone kao što su estrogeni [41], androgeni [42], vitamin D3 [43] i retinoidi [44].

2.1.2. Osteociti

Osteociti nastaju diferencijacijom osteoblasta. Osteoblasti proizvode nemineralizirajući koštani matriks i kada se u potpunosti okruže mineraliziranim matriksom, postaju osteociti. Njihova glavna funkcija je da održavaju strukturu kosti i ostvaruju prijenos mehaničkog opterećenja. Osteociti čine 95% stanične mase kosti sisavaca [45, 46] te svaka kost zasebno ima gotovo deset puta više osteocita od osteoblasta. Različiti autori daju različite postotke osteoblasta koji diferenciraju u osteocite, od 10 pa sve do 30 posto, ovisno o tipu kosti i vrsti promatrane životinje [47, 48]. Transformacija preosteoblasta do osteocita praćena je različitim morfološkim promjenama, kao što je promjena veličine stanica te promjene u unutarstaničnim organelima [49]. Za vrijeme mineralizacije dolazi do smanjenja endoplazmatskog retikuluma i

Golgijevog aparata koje je praćeno smanjenom sintezom i sekrecijom proteina [50]. Bazirano na morfološkim i molekularnim karakteristikama Palumbo [51] razlikuje tri stanična tipa koja se javljaju u tranziciji osteoblasta do osteocita (Slika 2). Preosteocit tipa I, koji je poznat i kao osteoblastični osteocit nezreli je tip osteocita. Preosteociti tipa II su osteoidni osteociti koji na kraju diferencijacije postaju osteociti tipa III. Osteociti tipa III su djelomično okruženi mineraliziranim matriksom.



Slika 2. Dijagram prikazuje sve stanične tipove koji se pojavljuju u procesu diferencijacije od preosteoblasta do zrelog osteocita. Preosteoblasti čine proliferirajući sloj stanica (1). Tijesi spojevi (engl. gap junction) su prisutni između svih staničnih tipova te omogućuju njihovu međusobnu komunikaciju. Povećanje prikazuje jedan tijesni spoj između osteocita i osteoblasta koji se okružuje koštanim matriksom. Za vrijeme diferencijacije smanjuje se volumen stanice od preosteoblasta (1), preko preosteoblastnog osteoblasta (2), osteoblasta (3), preosteocita tipa I (4), preosteocita tipa II (5), osteocita tipa III (6), mladog osteocita (7) pa sve do zrelog osteocita (8). Preuzeto i modificirano od Franz-Odendaal i suradnici [52].

Diferencirane stanice više nemaju aktivnu alkalnu fosfatazu, no u njima dolazi do jakog izražaja Phex, E11, Sost, i dentin-matrix proteina-1 (DMP-1, prema engl. *dentin matrix protein-1*). Istovremeno, prestaje izražaj nekih markera osteoblasta poput koštanog sijaloproteina i drugih [52]. Upravo ovi proteini služe kao markeri identifikacije osteocita. Inhibirajući Wnt signalni put visokim izražajem gena za sclerostin i „Dickkopfu“ srodnog proteina 1 (Dkk1, prema. engl *Dickkopf-related protein 1*) gena, osteociti kontroliraju količinu novonastale kosti [53, 54]. Sclerostin se veže na LRP5/6 (lipoprotein 4, 5 i 6) receptore i djeluje kao antagonist nastanku kosti [54, 55].

Osteociti su, kako međusobno, tako i s osteoblastima (stvaranje kosti) i osteoklastima (resorpcija kosti) [56] povezani na površini kosti preko tijesnih spojeva (Slika 2) građenih od koneksina 43 [53, 57]. Upravo takvi spojevi bitni su za sazrijevanje, aktivnost i preživljenje osteocita [58, 59].

Još jedna od bitnih karakteristika osteocita jest osteolitička osteoliza. Naime oni mogu odlaganjem i resorpcijom kosti mijenjati oblik i veličinu svojih lakuna. Ovaj proces nije zamijećen kod ljudi, no prisutan je kod nekih drugih sisavaca [60-62]. Vjeruje se da se osteolitička osteoliza javlja za vrijeme laktacije, hibernacije ili trudnoće, kada postoji povećana potreba za mobilizacijom minerala iz kostiju [61, 63].

Osteociti mogu živjeti desetljećima, zarobljeni u koštanom matriksu kosti kod koje ne dolazi do pregradnje. Frost je još 1963. godine pretpostavio da je prosječan poluživot ljudskog osteocita 25 godina [64]. Gubitkom spolnih hormona osteociti odumiru procesom apoptoze [65-67]. Uz prisustvo glukokortikoida javlja se proces pojačane apoptoze osteocita [68]. Stanični sadržaj koji izlazi u lakunu nakon apoptoze nije dostupan stanicama koje imaju mogućnost fagocitoze, tako da se degradirana DNA nalazi u lakunama dugo nakon same apoptoze [69]. Smatra se da glavni uzrok apoptoze osteocita leži u greškama i promjenama međustanične komunikacijske mreže [70]. Mišji model, gdje je osteopenija inducirana ovariektomijom ili tretmanom glukokortikoidima, dokazuje da apoptoza sudjeluje u procesu gubitka kosti [71]. Danas postoje lijekovi koji inhibiraju proces odumiranja osteoblasta i osteocita, a koriste se u liječenju osteoporoze. Najpoznatiji takav lijek su bifosfonati, koji se vežu za mineralnu tvar u kosti, inhibiraju apoptozu osteoblasta i osteocita te na taj način sprečavaju njezinu razgradnju [72].

2.1.3. Osteoklasti

Osteoklasti su osteolitičke stanice hematopoetskog porijekla [73, 74], s 3 do 100 jezgara po stanici, a prosječan broj je između 10 i 20 jezgara. Osteoklasti su stanice koje isključivo sudjeluju u resorpciji kosti te je njihova morfologija prilagođena njihovoj funkciji. Transkripcijski profil osteoklasta također odgovara njihovoj funkciji. Glavni biljeg diferenciranih osteoklasta je kisela fosfataza otporna na tartarat (TRAP, prema engl. *tartarate-resistent acid phosphatase*) koja je potrebna za resorpciju koštanog matriksa [75].

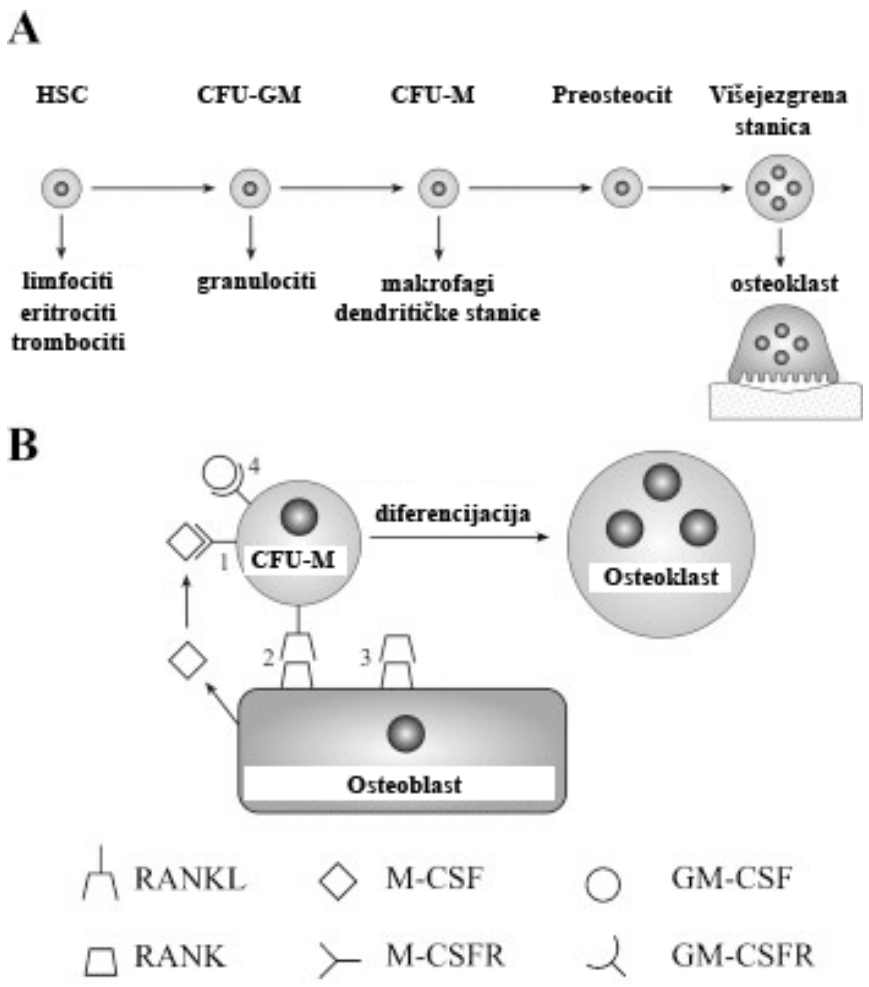
Zbog svoje veličine (*in vitro* mogu imati promjer do 300 µm) mogu prekrivati veliku površinu koštanog matriksa. Smatra se da je kemotaksija odgovorna za migraciju i agregaciju monocita prema mjestu koštane pregradnje. Molekule uključene u ovaj fenomen porijeklom su iz koštanog matriksa ili direktno potječu od osteoblasta, a to su kolagen [76], osteokalcin [76] i čimbenik stromalnih stanica-1 (SDF-1, prema engl. *stromal cell-derived factor-1*) [77]. Bitnu ulogu u migraciji prekursora ima i metaloproteinaza matriksa (MMP14) koja omogućuje kretanje osteoklasta kroz nemineralizirani koštani matriks tako što uslijed njenog djelovanja dolazi do otpuštanja vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF, prema engl. *vascular endothelial growth factor*) [78]. Integrin $\alpha_V\beta_3$ pomaže u prihvaćanju osteoklasta na površinu kosti jer prepoznaje Arg-Gly-Asp aminokiselinski slijed prisutan u proteinima, kao što su osteopontin i koštani sijaloprotein [79]. Prianjanjem na površinu kosti, osteoklasti postaju morfološki polarizirani. Imaju bazolateralnu stranu okrenutu od kosti i resorptivnu površinu koja je nabrana i stvara polarizirajući krug F-aktina [80]. Za stvaranje nabrane membrane odgovorna je Src kinaza, koja je u velikim količinama prisutna u osteoklastima [81]. Iz te nabrane površine citoplazmatske membrane otpuštaju se kisele vezikule i proteolitički enzimi koji razgrađuju mineralnu i organsku komponentu koštanog tkiva [82-86]. pH prostora između nabrane membrane i površine kosti je oko 4.5, zbog otpuštanja kiselih vezikula i postojanja vakuolske protonske pumpe (H-ATPaza) [87]. Naime, u citoplazmi osteoklasta dolazi do kemijske reakcije ugljičnog dioksida i vode pri čemu nastaje ugljična kiselina. Ova reakcija katalizirana je enzimom karboanhidrazom II. Disocijacijom ugljične kiseline nastaju ioni bikarbonata i vodika, koji se pumpom izbacuju izvan stanice. Kako bi se održao stalni pH citoplazme osteoklasta, kloridni kanal 7 (ClC-7) izbacuje kloridne ione u resorpcijsku jamicu koji se pomoću $Cl^-/HCO3^-$ anionskog izmjenjivača vraćaju natrag u stanicu, u zamjenu za bikarbonatne ione. Većina razgrađenog matriksa endocitozom se zatvara unutar vezikula koje putuju prema apikalnoj membrani, gdje se sadržaj vezikula ispušta u izvanstanični prostor [88].

U prilog hipotezi da višejezgrenost povećava resorpcijsku moć osteoklasta idu istraživanja provedena na ptičjim osteoklastima koji imaju više jezgara od osteoklasta sisavaca te je njihova apsorpcijska moć puno veća [80].

2.1.3.1.Porijeklo i diferencijacija osteoklasta

Diferencijacijom hematopoetskih matičnih stanica preko granulocitno-makrofagnih kolonija (CFU-GM, prema engl. *colony-forming unit for granulocytes and macrophages*) te makrofagnih kolonija (CFU-M, prema engl. *colony-forming unit for macrophages*) nastaju osteoklastni progenitori te njihovom fuzijom zreli mnogojezgreni osteoklast (Slika 3A) [87]. Tinker i suradnici [89] pokazali su da osteoklasti nastaju fuzijom monocita iz periferne krvi. Glavnu ulogu u prijelazu CFU-M prema formiranju osteoklasta ima ligand poticatelja receptora NF-kB (RANKL, prema engl. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*). Aktivacijom RANK-a (receptora za RANKL) uz prisustvo makrofagnog čimbenika rasta kolonija (M-CSF, prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*) i nedostatak granulocitno-makrofagnog čimbenika rasta kolonija (GM-CSF, prema engl. *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*), CFU-M diferencira u osteoklastne prekursore (Slika 3B) [90]. Ukoliko RANK nije aktiviran, CFU-M diferencira progenitore u makrofage. Dendritičke stanice nastaju uz prisustvo GM-CSF-a [90].

Osteoblasti luče M-CSF, dok je RANKL prezentiran na membranama osteoblasta [87]. M-CSF potiče proliferaciju i preživljenje osteoklastnih prekursora te pojačava izražaj poticatelja receptora NF-kB (RANK, prema engl. *activator of nuclear factor kappa-B*) [79, 91]. Mišji model koji ima točkastu mutaciju u genu Csf1, koji kodira za M-CSF, razvija osteopetrozu [92]. Kao posljedica mutacije je nastanak krnjeg nefunkcionalnog proteina, što dovodi do nedostatka makrofaga i osteoklasta u takvom mišu [93]. OPG (osteoprotegerin) je protein kojeg luče osteoblasti (ali i neke druge stanice) i kompetitivno se veže na RANKL te na taj način inhibira osteoklastogenezu [94, 95].



Slika 3. Shematski prikaz diferencijacije. A: Diferencijacijom HSC mogu nastati limfociti, eritrociti, trombociti i granulociti. Diferencijacijom CFU-GM mogu nastati granulociti ili preko CFU-M makrofagi, dendritičke stanice ili osteoklastni progenitori. Njihovom fuzijom nastaju višejezgrene stanice, koje konačno diferenciraju u zrele osteoklaste. **B:** U osteoblastima aktivacija RANKL-a putem RANK-a, uz prisustvo M-CSF-a i odsustvo GM-CSF-a dovodi do osteoklastogeneze. Preuzeto i modificirano od Bar-Shavit [87].

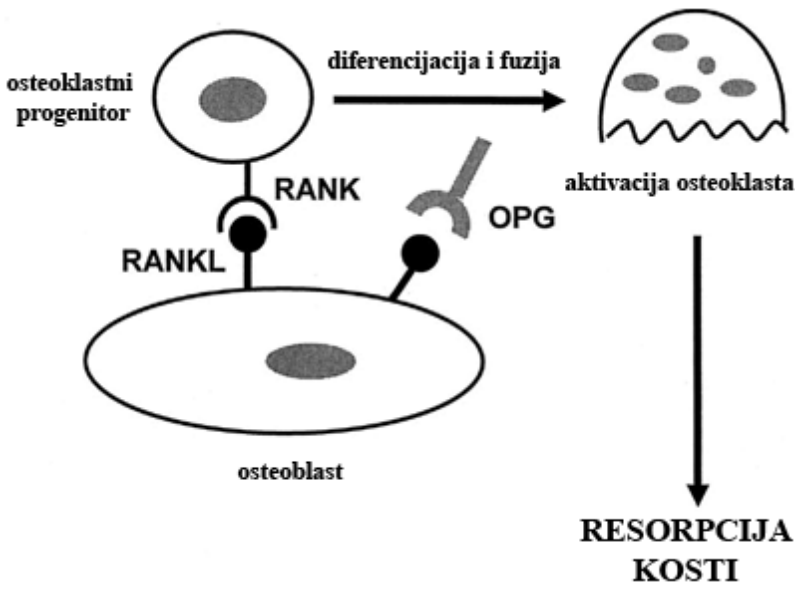
2.1.3.2.Vanjski signali diferencijacije osteoklasta

Veliki je spektar citokina i faktora rasta koji kontroliraju i usmjeravaju osteoklastogenezu. U čitav proces kontrole uključen je veliki broj citokina porijeklom iz stanica imunog sustava i jedan od prvih otkrivenih citokina uključen u aktivaciju resorpcije kosti je interleukin-1 (IL-1) [96]. Do danas je pronađen veliki broj citokina koji potiču resorpciju, kao što je TNF-α,

interleukin-6, interleukin-11, interleukin-15 i mnogi drugi [87]. Interleukin-4, interleukin-10, interleukin-12, interleukin-13, interleukin-18, GM-CSF i interferon-γ (IFN-γ) poznati su citokini imunog porijekla, koji imaju inhibirajući učinak na resorpciju kosti [97].

Najpoznatiji, a ujedno i najbitniji fiziološki faktor diferencijacije osteoklasta je RANKL. RANKL je transmembranski glikoprotein i spada u porodicu čimbenika tumorske nekroze (TNF, prema engl. *tumor necrosis factor*) te je izražen kao trimer od stanica osteoblastne loze, ali i od strane aktiviranih T limfocita [98]. RANKL se veže na svoj receptor na površini osteoklasta, poticatelj receptora jezgrinog čimbenika kB(RANK, prema engl. *receptor activator of nuclear factor kB*), koji ne posjeduje enzimatsku unutarstaničnu aktivnost, ali je pokazano da se veže na TNF udružene receptorske čimbenike (TRAF, prema engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor*) [99-102]. RANK posjeduje tri citoplazmatske vezujuće domene za TRAF-6. [103, 104]. Kasnije je potvrđeno da je TRAF-6 bitan u procesu diferencijacije osteoklasta [105-108]. Vezivanjem TRAF-6 na RANK ,TRAF-6 se trimerizira te aktivira jezgrin čimbenik kB (NF-kB, prema engl. *nuclear factor kB*) i protein kinaze aktivirane mitogenom (MAPK, prema engl. *mitogen-activated kinases*), uključujući N-terminalnu kinazu Jun (JNK, prema engl. *Jun N-terminal kinase*) i p38 [101, 103, 104, 107]. Ovakva kaskada signala uzrokuje izražaj aktivacijskog proteina 1 (AP1) i jezgrinog čimbenika aktiviranih limfocita T (NFATc1, prema engl. *nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin depended 1*) što omogućuje fuziju preosteoklasta i njihovu diferencijaciju [107, 109, 110].

Osteoblasti također izražavaju topivi homodimerni mamac-receptor za RANKL, osteoprotegerin (OPG), koji je član porodice TNF-receptora. Građen je od četiri N-terminalne cisteinom bogate domene, nakon čega slijede dva vanstanična dijela, koja su homologna domenama smrti TNF receptora, bez transmembranske domene [111]. OPG ometa komunikaciju osteoblasta i osteoklasta (RANKL-RANK veza) tako što se visokim afinitetom veže na RANKL i inhibira osteoklastogenezu (Slika 4). Wnt signalni put inhibira degradaciju ß-katenina u citoplazmi što omogućuje njegovu interakciju s faktorom stanica T (TCF, prema eng. T-cell faktor) i faktorom pojačivačem limfocita (LEF, prema engl. *lymphocyte enhancer factor*). Takav kompleks se veže na promotorsku regiju OPG-a i pojačava njegov izražaj [112, 113]. Osteoblasti izražavaju rani faktor stanica B (EBF2, prema engl. *early B-cell factor 2*) koji zajedno s ß-katenin/ TCF/LEF proteinskim kompleksom aktivira OPG promotor[114].



Slika 4. Shematski prikaz RANKL/RANK/OPG sustava. Osteoblasti izražavaju RANKL na površini stanične membrane te njegovom aktivacijom putem RANK-a izraženog na membrani osteoklastnih progenitora potiče se osteoklastogeneza. Osteoblasti također izražavaju OPG, koji kao topivi homodimerni mamac-receptor za RANKL inhibira ovaj proces diferencijacije osteoklasta. Preuzeto i modificirano od Coetzee i Kruger [115].

Konačno zaključujemo da omjer RANKL/OPG određuje i kontrolira stupanj diferencijacije, aktivacije i apoptoze osteoklasta [116].

2.2. Građa i razvoj kostiju

Koštano tkivo jedno je od najdinamičnijih tkiva i razvojno ga čine dva tkiva, hrskavica i kost te samo tri tipova stanica, hondrociti, osteoblasti i osteoklasti [117-119]. Rani kostur nastaje iz mezoderma [120]. Kost se može formirati ili intramembranskom osifikacijom ili endohondralnom osifikacijom i to neovisno o embrionalnom porijeklu [121]. U procesu intramembranske osifikacije dolazi do diferencijacije kondenziranih mezenhimskih stanica u progenitore osteoblastične loze. Upravo ovim procesom nastaju plošne kosti lubanje, dio ključne kosti te dodatne kosti na površini periosta dugih kostiju. Kod endohondralne osifikacije iz mezenhimskih stanica najprije dolazi do hipertrofije hondrocita koju kontroliraju

faktori rasta [122, 123] čime se formira hrskavica. Hipertrofični hondrociti su okruženi kalcificiranim izvanstaničnim matriksom koji je bogat kolagenom X. Upravo takva struktura dovodi do vaskularizacije hrskavice iz koštanog oboda [124], što omogućuje migraciju mezenhimskih stanica iz koštanog oboda koje će se zatim diferencirati u osteoblaste. Novonastali osteoblasti započinju lučiti kolagen tipa I te slijedi proces stvaranja kosti na hrskavičnim epifizalnim pločama rasta. Konačno, hondrociti odumiru apoptozom, a istovremeno dolazi do diferencijacije osteoblasta, njihove proliferacije i stvaranja koštanog matriksa. Kao konačni rezultat je da se hrskavica u potpunosti zamjenjuje koštanim tkivom. Ovim procesom nastaju gotovo sve kosti osovinskog (lat. *skeleton axiale*) i kostura udova (lat. *skeleton appendiculare*). Stanice koje imaju potencijal diferencijacije u stanice osteoblastične loze pronađene su u koštanoj srži [3, 125] kao i u području periosta [126, 127]. Osteogeni potencijal takvih pluripotentnih stanica izoliranih iz koštane srži i periosta dokazan je *in vitro* kao i *in vivo*. Unos koštanih oblikotvornih proteina (BMP) u mišićno tkivo uzrokuje ektopično stvaranje koštanog tkiva [128] što dokazuje postojanje osteoprogenitora u nekoštanim tkivima.

Zrela endohondralna kost građena je od više različitih tkiva koje zajedno doprinose mehaničkoj i organskoj funkciji kosti. Kost je odvojena od mišića membranama vezivnog tkiva. Periost oblaže kost, dok perihondrij prekriva hrskavicu. Endoost je stanični sloj (uz prostor koštane srži) kojeg čine fibroblasti zajedno s mezenhimskim matičnim stanicama i usmjerenim osteoprogenitorima. U smjeru kosti nalazi se sloj preosteoblasta kojeg slijedi sloj zrelih osteoblasta zaduženih za stvaranje nove kosti. Kost koja se ne mijenja prekrivena je obložnim stanicama na periostalnoj i endoostalnoj površini.

Građa kosti može biti kompaktna (čvrsta) ili spužvasta (trabekularna). Kompaktna kost (korteks) sastoji se od osteona kroz čije središte prolaze longitudinalni vaskularni kanali koji se nazivaju Haversovim kanalima. U takvim kanalima nalaze se krvne žile i živčane stanice. Svaki od tih kanala okružen je slojevima koštanog matriksa u kojem se nalaze pojedinačni osteociti u šupljinama koštanog matriksa, lakunama. Lakune su međusobno povezane uskim kanalićima, kanalikulima, u kojima se nalaze citoplazmatski izdanci osteocita te kapilare koje opskrbljuju osteocite kisikom i hranjivim tvarima. Nutritivne žile ulaze u kost poprečnim Volkmannovim kanalima i dalje sve do manjih žila Haversovih kanala. Trabekularna kost građena je od trabekula različitog oblika i debljine između kojih se nalazi koštana srž kao izvor prekursora hematopoetske loze. Trabekule čine pločaste, šiljaste i štapićaste koštane strukture. Upravo trabekularna kost u metafizi daje unutrašnju stabilnost kosti te je zadužena

za metaboličku funkciju kosti. Čitava medularna šupljina ispunjena je koštanom srži koju čini stroma. U stromi se nalaze mezenhimske matične stanice koje mogu diferencirati u stanice koštanog tkiva i krvnih žila. Osim mezenhimskih matičnih stanica, koštana srž bogata je i krvotvornim stanicama koje, nakon što dozriju, odlaze u cirkulaciju.

Epifize dugih kostiju krajnja su proširenja koja su građena od spužvaste kosti prekrivene tankim slojem kompaktne kosti. Srednji cilindrični dio kosti zove se dijafiza i građen je od kompaktne kosti i spužvaste s unutrašnje strane, oko šupljine koštane srži.

2.3. Koštana pregradnja

Kostur je metabolički aktivan organ koji cijelo vrijeme prolazi kroz proces pregradnje. Koštana pregradnja je složeni proces zamijene stare kosti novim koštanim tkivom, uključuje interakciju različitih staničnih tipova te je ovisan o različitim biokemijskim i mehaničkim faktorima. Pregradnja omogućuje održavanje oblika, kvalitete i veličine kostura zbog sposobnosti cijeljenja mikrofraktura nastalih prilikom naprezanja te promjene strukture kao odgovor na stres i biomehaničke sile.

Koštana pregradnja započinje aktivacijom osteoklasta, koju slijede osteoblasti, tvoreći organizacijsku i funkcionalnu jedinicu, tzv. temeljnu višestaničnu jedinicu (BMU, prema engl. *basic multicellular unit*). Organizacija jedne takve jedinice se morfološki, ali ne i biološki razlikuje kod spužvaste i kompaktne kosti. U kompaktnoj kosti BMU stvara cilindrični kanal (duljine 2000 µm, promjera 150-200 µm) te stvara rupu u kosti brzinom 20-40 µm po danu [14]. Osteoklasti razgrađuju kost u smjeru dominantnog mehaničkog opterećenja [129] nakon čega osteoblasti ispunjuju nastale šupljine [130]. Na ovaj način pregradi se 2-5% kompaktne kosti [14]. Pregradnja spužvaste kosti je mnogo aktivnija od pregradnje kompaktne kosti zbog većeg omjera površine prema volumenu.

Proces pregradnje ide kroz tri uzastopna koraka: resorpcija, obrat i stvaranje. Resorpcija započinje migriranjem djelomično diferenciranih mononuklearnih preosteoklasta prema površini kosti gdje se formiraju višejezgreni osteoklasti. Nakon što je kost razgrađena započinje korak obrata kada mononuklearne stanice pripremaju površinu te šalju signale za migraciju i diferencijaciju osteoblasta. Korak stvaranja traje sve dok novonastala kost ne zamijeni prethodno razgrađenu. Proces resorpcije je puno brži od procesa stvaranja kostiju,

tako da količina kosti koja se razgradi osteoklastima kroz 2-3 tjedna, osteoblasti nadomjeste najbrže za 3 mjeseca [131].

Koštana pregradnja posredovana je promjenama i aktivacijom raznih skupina stanica kao, što su osteociti, obložne stanice, koje prekrivaju površinu metabolički neaktivne kosti te preosteoblasti iz srži.

Ukupni integritet kosti kontroliran je kako hormonima, tako i raznim drugim proteinima koje luče hematopoetske stanice koštane srži i stanice koštanog tkiva. Razlikujemo sistemsku i lokalnu regulaciju koštane homeostaze.

Jedan od najvažnijih hormona uključenih u sistemsku regulaciju je paratiroidni hormon (PTH, prema engl. *parathyroid hormone*). Kao odgovor na podražaje PTH-a, koštani matriks se razgrađuje [132], povećava se bubrežna resorpcija kalcija te se potiče bubrežno lučenje aktivnog oblika vitamina D, kalcitriola, [14] što dovodi do povećanja koncentracije iona kalcija i fosfata u serumu. Kalcitriol povećava apsorpciju kalcija i fosfata iz želučano-crijevnog trakta, no može imati i anabolički učinak na kost [133]. Oprečno PTH-u, kalcitonin u uvjetima povišene koncentracije kalcija u serumu, koči razgradnju kosti negativno djelujući na osteoklaste [132]. Glukokortikoidi mogu djelovati i inhibirajuće, ali i stimulirajuće na stanice koštanog tkiva. Oni potiču diferencijaciju mezenhimskih matičnih stanica prema osteoblastima, ali u isto vrijeme smanjuju aktivnost osteoblasta [68]. Tiroidni hormoni generalno potiču koštanu pregradnju, tako da se u patološkim uvjetima hipertireoze javlja gubitak kosti [134]. Estrogeni, kao važan faktor sistemske kontrole koštane pregradnje, smanjuju osjetljivost osteoklastnih progenitora na RANKL [135], potiču proliferaciju osteoblasta te koče njihovu apoptozu [24].

Lokalna kontrola koštane pregradnje odnosi se na OPG/RANKL/RANK sustav, što uključuje i cijeli niz citokina i hormona koji utječu na izražaj gena uključenih u ovaj sustav.

2.4. Neuropeptid Y

Neuropeptid Y (NPY) je neuropeptid građen od 36 aminokiselina, koji ima amid na karboksilnom kraju, što ga svrstava u porodicu pankreasnih polipeptida te je prvi put pronađen u mozgu svinja [136, 137]. Uz NPY, ovu porodicu čine još dva hormona, peptid YY (PYY) [137] i pankreasni polipeptid (PP) [138]. PP je uglavnom pronađen u endokrinim

stanicama gušterače, PYY nalazimo u stanicama endokrinog sustava, ali i u neuronima [139]. NPY, PYY i PP dijele zajedničku trodimenzionalnu strukturu sličnu ukosnici koja se zove PP-fold [140]. Kristalografija X zrakama pokazala je da prvih osam aminokiselina formira prolinsku spiralu tipa II, slijedi omča, aminokiseline od 15-32 formiraju α spiralu te posljednje 4 aminokiseline na karboksilnom kraju formiraju fleksibilnu omču [141]. Smatra se da je NPY jedan od evolucijski najkonzerviranijih peptida, jer kada uspoređujemo aminokiselinske sekvence različitih sisavaca, samo dvije od 36 aminokiselina se mijenjaju od vrste do vrste [139]. Uspoređujući sekvence PPY-a pronađeno je osam aminokiselinskih ostataka koji su varijabilni dok je PP, kao evolucijski najmlađi član ove obitelji, ujedno i najmanje konzerviran [142, 143].

NPY je uglavnom izražen u živčanom sustavu. U centralnom živčanom sustavu najveći izvor NPY-a je hipotalamus [144, 145]. Među ostale regije mozga bogate NPY-om ubrajamo amigdalu, hipokampus, locus coeruleus, nucleus accumbens i koru velikog mozga [146, 147]. Periferija je također bogati izvor NPY-a. Srž nadbubrežne žlijezde primarni je izvor cirkulirajućeg NPY-a [148], iako ga nalazimo i u jetri, srcu, slezeni, endotelnim stanicama krvnih žila i megakariocitima [139, 149]. U simpatičkom živčanom sustavu NPY se pohranjuje i otpušta simultano s noradrenalinom [150]. Nedavno je otkriveno da su osteoblasti, osteociti i hondrociti stanice koje izražavaju NPY [151, 152].

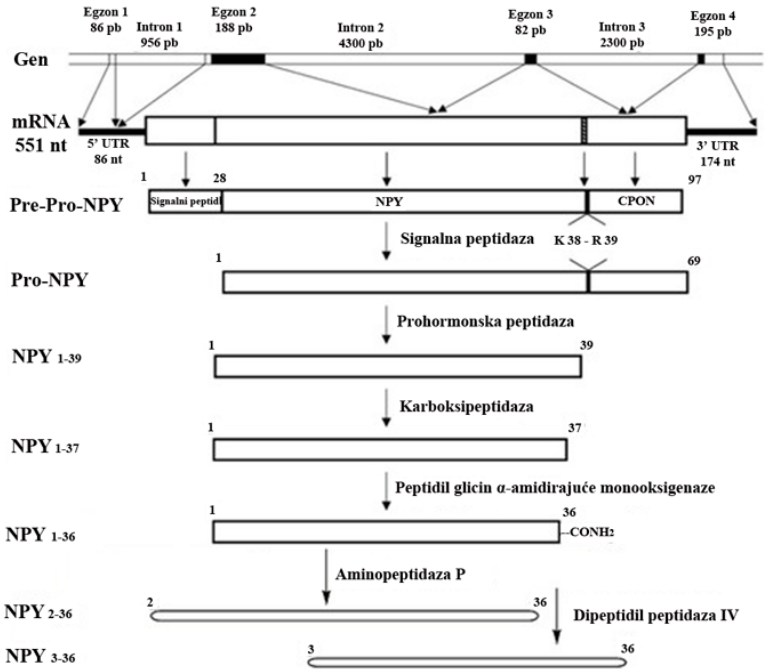
NPY ima važnu ulogu u mnogim biološkim procesima kao što je regulacija koštane pregradnje, hranjenje, učenje, pamćenje, kretanje, regulacija tjelesne temperature, seksualno i emocijonalno ponašanje, regulacija krvnog tlaka, bol i mnogi drugi [153]. Uključen je i u patološka stanja kao što su pretilost, depresija, anksioznost, epilepsija, problemi s pamćenjem i alkoholizam [154].

2.4.1. Biosinteza NPY-a

NPY je kod ljudi kodiran genom na sedmom kromosomu, koji se nalazi na lokusu 7p15.1 [155] i čine ga četiri egzona. Prvi egzon kodira za 5' netranslatiranu regiju (5'-UTR, prema engl. *5'untranslated region*). Drugi egzon kodira za signalni peptid i glavni dio sekvence zrelog NPY-a. Treći sadrži sekvencu koja kodira za NPY tirozin[36], glicin[37] kao donor amida, lizin[38] i arginin[39] polarne aminokiseline koje prepoznaje prohormonska konvertaza (PC, prema engl. *prohormone convertase*) te glavni dio C-terminalnog peptida NPY proteina

(CPON, prema engl. *C-terminal flanking peptide of neuropeptide Y*). Posljednji četvrti egzon kodira za kraj CPON-a i 3' netranslatiranu regiju (3'-UTR).

Translacijom NPY mRNA (551 nukleotid) nastaje pre-pro-NPY, koji uz pomoć signalnog peptida putuje prema endoplazmatskom retikulumu. Na endoplazmatskom retikulumu signalna peptitaza odcjepljuje signalni peptid i nastaje pro-NPY. Slijedeći korak posttranslacijske modifikacije NPY-a je cijepanje pro-NPY-a prohormonskom konvertazom, koja prepoznaje lizin[38] i arginin[39] polarne aminokoiseline, pri čemu se NPY_{1-39} odvaja od CPON-a. Posljednja dva aminokiselinska ostatka na C kraju NPY_{1-39} proteina se tada cijepaju djelovanjem karboksipeptidaze. Sada, uz pomoć peptidil glicin α-amidirajuće monooksigenaze, amid se premješta sa glicina[37] na C kraj tirozina[36] pri čemu nastaje biološki aktivni amidirani NPY. Amid je neophodan za biološku aktivnost NPY-a te ga štiti od degradacije karboksipeptidazama [150]. Zreli NPY može se dodatno cijepati pomoću dipeptidil peptidaze IV i aminopeptidaze P. Kao rezultat ovih enzimatskih reakcija je NPY_{3-36} odnosno NPY_{2-36} (Slika 5) [139].

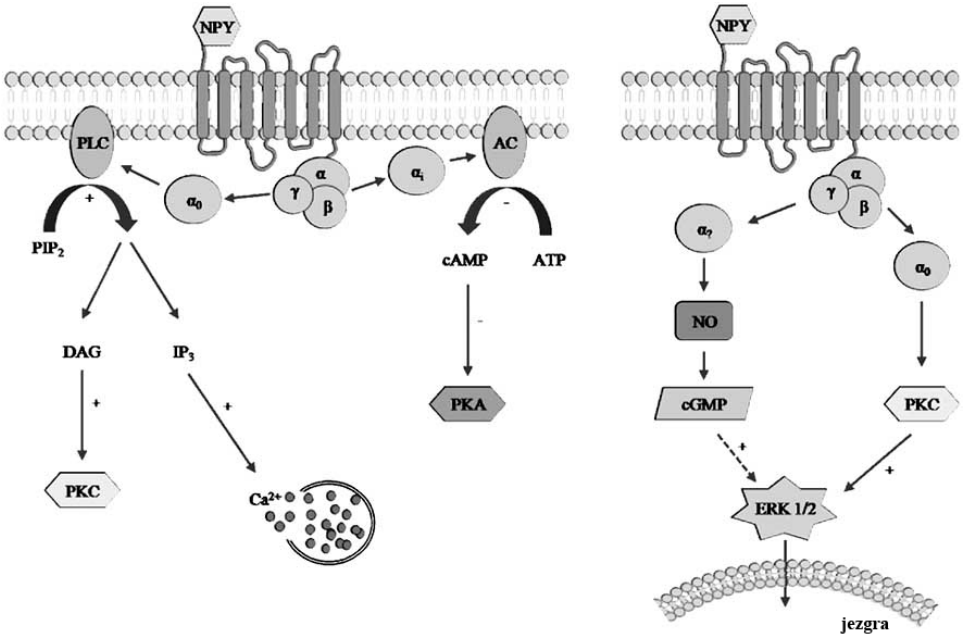


Slika 5. Biosinteza neuropeptida Y. (pb: parovi baza, mRNA: glasnička RNA, nt: nukleotidi, UTR: netranslatirana regija, CPON: C-terminalni peptid NPY proteina, K38: lizin[38], R39: arginin[39]) Preuzeto i modificirano iz Silva i suradnici [150].

2.4.2. NPY signalni put

NPY, PPY i PP vežu se na svoje receptore, koji su dio porodice G-protein vezujućih receptora (Slika 6). Inhibirajući G-protein je sastavljen iz 3 podjedinice α, β i γ (G_i/Go). U neaktivnom stanju receptora, guanozin difosfat (GDP, prema engl. *guanosine diphosphate*) je vezan na α podjedinicu G-proteina. Aktivacijom receptora dolazi do odcjepljenja GDP-a i vezanje guanozin trifosfat (GTP, prema engl. *guanosine triphosphate*) na upražnjeno vezno mjesto. Kompleks GTP-G_α se odcjepljuje od ostalog dijela G-proteina te inhibira adenil ciklazu (AC) [156, 157], što neposredno rezultira inhibicijom protein kinaze A (PKA) [153]. Pokazano je da NPY smanjuje froskolinom stimulirano nakupljanje cAMP-a, no nema nikakav utjecaj na bazičnu koncentraciju cAMP-a. Kompleks GTP-G_α može aktivirati fosfolipazu C (PLC, prema engl. *phospholipase C*) koja hidrolizira fosfatidil-inozitol 4,5-difosfat (PIP_2, prema engl. *phosphatidyl inositol-4, 5-bisphosphate*) i nastaje diacilglicerol (DAG) i inozitol 3,4,5-trifosfat (IP_3, prema engl. *inositol trisphosphate*). DAG aktivira protein kinazu C (PKC), a IP_3 uzrokuje povišenu koncentraciju kalcijevih iona u citosolu [142, 158]. NPY osim preko IP_3 djeluje i direktno, aktivirajući ili blokirajući, kalcijeve kanale na plazmatskoj membrani [159, 160]. Djeluje i na receptorima upravljane kalcijeve kanale (ROCC, prema engl. *receptor-operated calcium channel*) pojačavajući otpuštanje kalcijevih iona u citosol [161]. Osim na kalcijeve kanale, isti učinak nakon vezivanja na receptor ima i na kalijeve kanale [162, 163].

Mehanizam koji objašnjava proliferativni učinak NPY-a je aktivacija MAP (mitogenom aktivirane proteine) kinaznog signalnog puta [164], tako što jednom aktivirana protein kinaza C fosforilira kinaze regulirane izvanstaničnim signalima 1/2 (ERK, prema engl. *extracellular signal-regulated kinases*) [165-167]. Proliferativni učinak NPY-a može biti i rezultat aktivacije sintetaza dušikovog monoksida/topljiva gvanil-ciklaza (NOS/sGC , prema engl. *nitric oxide synthase/ soluble guanylyl cyclase*) signalnog puta, koji kad je aktiviran, rezultira fosforilacijom ERK1/2 [168, 169].



Slika 6. Shematski prikaz NPY-Y1 signalnog puta. Vezivanjem NPY-a na Y1 receptor dolazi do aktivacije G-proteina koje može rezultirati: a) inhibicijom adenil ciklaze (AC), koja uzrokuje inhibiciju protein kinaze A (PKA); b) aktivacijom fosfolipaze C (PLC) koja hidrolizira fosfatidil-inozitol 4,5-difosfat (PIP_2), pri čemu nastaje diacilglicerol (DAG) i inozitol 3,4,5-trifosfat (IP_3). DAG aktivira protein kinazu C (PKC), a IP_3 povećava koncentraciju kalcijevih iona u citosolu; c) aktivacijom MAP (mitogenom aktivirane protein) kinaznog signalnog puta, tako što PKC fosforilira kinaze regulirane izvanstaničnim signalima 1/2 (ERK). Proliferativni učinak NPY-a može biti i rezultat sinteze dušikovog monoksida (NO) koji generira ciklički guanozin monofosfat (cGMP). Preuzeto i modificirano iz Sousa i suradnici [153].

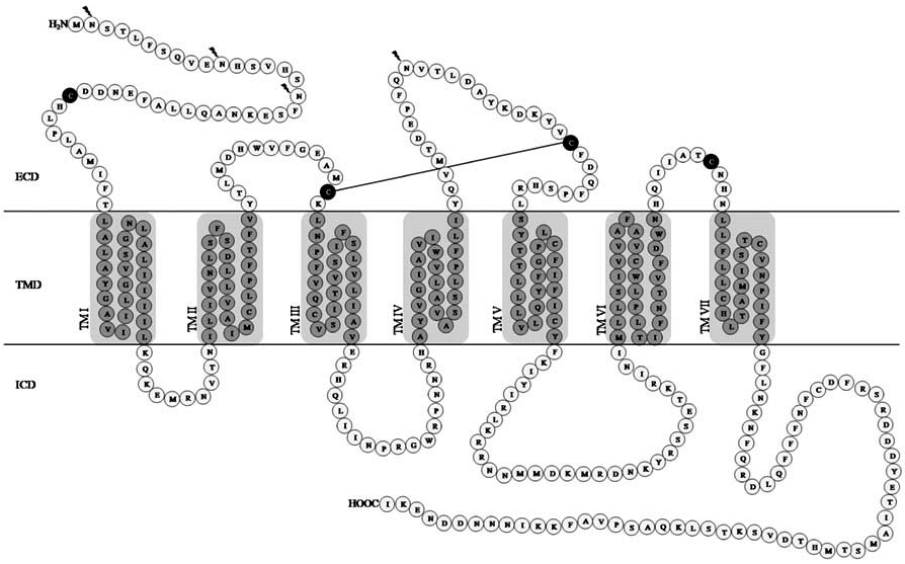
2.5. NPY receptori

Svi NPY receptori su transmembranski proteini te je njih pet pronađeno u sisavaca (Y1, Y2, Y4, Y5 i y6). y6 receptor je kao mutirani krnji protein nefunkcionalan u većini sisavaca, no dokazana je njegova funkcija u nekih sisavaca kao što su miševi i zečevi [170, 171]. Tijekom evolucije gen za ovaj receptor je nakupio mutacije te se upravo zbog toga javlja kao krnji protein u većini sisavaca uključujući i ljude [170, 172]. y6 mRNA detektirana je u mišjim testisima, bubregu i hipotalamusu [171, 173].

NPY receptori međusobno se razlikuju prema različitim afinitetima za NPY, PPY i PP. NPY i PPY pokazuju jaki afinitet vezanja na Y1, Y2 i Y5 receptore dok Y4 ima najveći afinitet za PP [153]. Svaki od receptora zadužen je za određene funkcije NPY proteina. Kod ljudi Y1, Y2 i Y5 geni se nalaze na lokusu 4q31-32, dok se Y4 i Y6 nalaze na odvojenim kromosomima, lokus 10q11.2 odnosno 5q23.5 [174, 175].

Svi Y receptori prisutni su u živčanom tkivu, ali i u cijelom nizu drugih tkiva. Vezivanjem liganda aktivira se inhibirajući G-protein (G_i/Go), što rezultira inhibicijom adenil ciklaze [142, 158, 176]. Y1, Y2, Y4 i Y5 receptori uključeni su u put aktivacije PKC-a [177] te mogu stimulirati unutarstanično otpuštanje kalcijevih iona [142, 158, 178, 179].

NPY receptori pripadaju porodici rodopsinu-sličnih receptora te je kristalografija X zrakama pokazala da dva izvanstanična cisteina formiraju disulfidni most između izvanstanične omče (EL, prema engl. *extracellular loop*) I i EL II (Slika 7) [180]. Y1, Y4 i y6 receptori sadrže još dva dodatna cisteina, jedan na amino kraju i jedan u području EL III, koji potencijalno ima mogućnost stvaranja trećeg disulfidnog mosta. Svi receptori imaju Asn-X-Ser/Thr motiv za N-veznu glikolizaciju. Regija sedam transmembranskih domena je evolucijski najočuvanije područje receptora i građeno je od α heliksa [180].



Slika 7. Shematski prikaz sekundarne strukture i sekvence humanog Y1 receptora. Humani Y1 receptor je građen od 384 aminokiseline i sastavljen je od izvanstanične domene

(ECD, prema engl. *extracellular domain*), sedam transmembranskih domena (TM1-TM7) te unutarstanične domene (ICD, prema engl. *intracellular domain*). Strelice pokazuju aminokiseline koje potencijalno mogu biti N-glikozilirane. Izvanstanična domena sadrži četiri cisteina (označena crnom bojom), koja mogu sudjelovati u stvaranju disulfidnih mostova. Preuzeto iz Sousa i suradnici [153].

Razvoj i analiza različitih "knockout" modela te korištenje agonista i antagonista raznih receptora omogućilo je otkrivanje uloge NPY-a i Y receptora u raznim fiziološkim procesima i bolestima.

2.5.1. Y1 receptor

Y1 receptor je prvi karakterizirani NPY receptor, koji je na početku bio nazvan „orfan“ receptorom štakora [181], no kasnije je klasificiran kao Y1 receptor na osnovi njegove distribucije u mozgu štakora [142, 158]. Njegova struktura je gotovo 96% identična među sisavcima [143, 174] te je njegova tkivno specifična aktivnost regulirana alternativnim prekrajanjem [182]. Y1 gen jedini je od svih gena koji kodiraju za NPY receptore, koji sadrži intron [183, 184]. Poznato je najmanje 3 različita egzona, koja kodiraju za 5' netranslatiranu regiju, čiju doradu kontroliraju različiti dijelovi promotora, tkivno specifično kontrolirajući njegov izražaj [182].

Y1 receptor obilno je prisutan u većini regija mozga (kora velikog mozga, hipokampus, talamus) ljudi i štakora [185], uključujući centre u hipotalamusu, koji kontroliraju energetsku homeostazu preko kontrole hranjenja [186]. U periferiji, kod ljudi, Y1 mRNA pronađena je u tkivu bubrega, srcu, plućima, debelom crijevu, testisima, placenti, koštanoj srži te vaskularnim glatkim mišićima [187]. Kod glodavaca, Y1 izražen je u bubregu, srcu, slezeni, mišićima, plućima, probavnom sustavu, adipocitima [188, 189], u bedrenoj kosti i kalvariji [152] te u lozi osteoblasta [190]. Vazokonstrikcija je jedan od glavnih efekata aktivacije Y1 receptora [191-193]. Uključen je u kontrolu svojevoljne konzumacije alkohola [194] te u imunološkom sustavu negativno utječe na aktivaciju limfocita T i ometa funkciju antigen prezentirajućih stanica [195]. NPY, vezujući se na Y1 receptor, potiče proliferaciju raznih tipova stanica [196-200], no poznato je da u stanicama karcinoma prostate ima antiproliferativni učinak [167]. Aktivacija Y1 receptora stimulira hranjenje [201] i na taj način regulira energetsku homeostazu. Stanice strome koštane srži (BMSC, prema engl. *bone*

marrow stromal cells) izolirane iz miševa s izbačenim genom za Y1 stvaraju veći broj adipocita u uvjetima adipogeneze, što dokazuje inhibitorni efekt NPY-a preko Y1 receptora na adipogenezu [202].

Njegov afinitet vezivanja za NPY i biološka aktivnost opada skraćivanjem N kraja NPY proteina (NPY_{2-36}, NPY_{3-36}, NPY_{13-36}) [203]. Poznato je da uslijed duge stimulacije rodopsinu-sličnih receptora dolazi do desenzibilizacije, tj. do smanjenog odgovora receptora na ligande jer dolazi do nakupljanja receptora na površini stanice, fosforilacije serina/treonina na C kraju te njihovog ulazaka u stanicu (internalizacija) ili putem klatrinom obloženih membranskih invaginacija ili putem malih invaginacija membrana, zvanih kaveole [204, 205]. Konačno, takve membranske invaginacije se spajaju s endosomima, ligandi se odvajaju od receptora, receptori se defosforiliraju te mogu biti ili reciklirani ili razgrađeni u lizosomu [153]. Pretjerana stimulacija SK-N-MC stanične linije (ljudske stanice neuroblastoma) i CHO stanične linije uzrokuje internalizaciju 20-30% Y1 receptora [206, 207].

2.5.2. Y2 receptor

Gen Y2 nalazi se vrlo blizu gena Y1 na kromosomu 4 i kodira za protein građen od 381 aminokiseline [208]. Evolucijski je jako sačuvan tako da se njegova sekvenca razlikuje jedva 10% među sisavcima.

Y2 receptor je većinom presinaptički receptor te inhibira otpuštanje neurotransmitera [209, 210]. Prisutan je u centralnom i perifernom živčanom sustavu, crijevima i krvnim žilama [211-213]. Izražen je u hipotalamusu gdje je uključen u regulaciju energetske homeostaze [189]. Inhibirajući aktivnost osteoblasta bitan je u regulaciji koštanog metabolizma kod miševa [214]. Zamijećeno je da u mozgu neuroni koji izražavaju NPY na svojim membranama imaju Y2 receptor, sugerirajući da je Y2 receptor uključen u proces autostimulacije neurona [215]. Y2 receptori djeluju kao inhibitorni autoreceptori [216] te njihova aktivacija inhibira oslobađanje NPY-a u hipotalamusu [217]. Iako njegova prisutnost nije detektirana u kalvariji i bedrenoj kosti [152], Y2 receptor je detektiran u membranama preosteoblastne stanične linije MC3T3-E1 [218].

Za razliku od Y1 receptora, jačina vezivanja NPY-a na Y2 receptor neovisna je o N kraju NPY-a, tako da je pokazano da se Y2 jednakim afinitetom veže na NPY_{2-36}, NPY_{3-36}, NPY_{13-36} i NPY_{18-36} [150, 191]. C kraj NPY-a važan je za vezivanje na Y2 receptor, a dokaz je

smanjeni afinitet vezivanja mutiranog [Pro^{34}]NPY-a na Y2 u usporedbi s vezivanjem na Y1 receptor. Za razliku od Y1 receptora, pretjerana stimulacija Y2 receptora ne dovodi do njegove desenzibilizacije i internalizacije [207, 219].

2.5.3. Y4 receptor

Gen ljudskog receptora Y4 nalazi se na lokusu 10q24 [220] i udaljen je od lokusa gena za Y1 i Y2. Samo 75% aminokiselina je identično u štakora i čovjeka, tako da je Y4 jedan od G-protein vezujućih receptora koji najbrže evoluira [221, 222].

Y4 receptor prisutan je u mozgu (hipotalamus, hipokampus), mišićima skeleta, tiroidnoj žlijezdi, srčanom tkivu, prostati, gušterači, mukoznom sloju nosne šupljine te u tankom i debelom crijevu [179, 221, 222]. Farmakološka karakteristika ovog receptora je visoki afinitet vezanja PP-a, niži afinitet za PYY i gotovo izostanak afiniteta za NPY [209, 221, 223-225].

Oprečne rezultate dobile su dvije grupe, gdje jedna dokazuje internalizaciju receptora nakon stimulacije agonistom [207], dok druga tvrdi da Y4 ne podliježe internalizaciji [226].

2.5.4. Y5 receptor

Gen koji kodira za receptor Y5 se kod ljudi nalazi na četvrtom kromosomu i preklapa se sa genom za Y1, no prepisuje se u suprotnom pravcu. Jedan od alternativnih promotora Y1 gena te 5' egzon nalaze se unutar kodirajuće regije gena Y5 otvarajući mogućnost koordinirane regulacije transkripcije [227].

Y5 receptor je prvi put izoliran iz cDNA knjižnice mišjeg hipotalamusa i kodira protein od 446 aminokiselina [228, 229]. Razlikuje se od ostalih Y receptora zato što ima dodatni citoplazmatski luk od 100 aminokiselinskih ostataka te je rep C-kraja kraći od repa Y1, Y2 i Y4 receptora. Među sisavcima aminokiselinska struktura se vrlo malo razlikuje (88-90% identična). Najvarijabilniji dio je područje treće unutarstanične omče.

Ovaj receptor je izražen u hipotalamusu [230] te nakon aktivacije vezivanjem NPY-a, stimulira apetit [228]. Periferno, izražen je u probavnom sustavu, jajnicima, testisima, prostati, slezeni, gušterači, bubrezima, mišićima skeleta, jetri, placenti i srcu [228]. U neuronima, Y5 receptor je gotovo uvijek izražen zajedno s Y1 receptorima [231]. Y5 visokim

afinitetom veže i ljudski PP, no zamijećeno je da je taj afinitet značajno niži za PP štakora. U štakora, NPY, vezujući se na Y5 receptor, kontrolira količinu izlučene mokraće (diureza), količinu izlučenog natrija (natriureza) te količinu glukoze u krvnoj plazmi [232].

2.6. NPY regulacija koštanog metabolizma

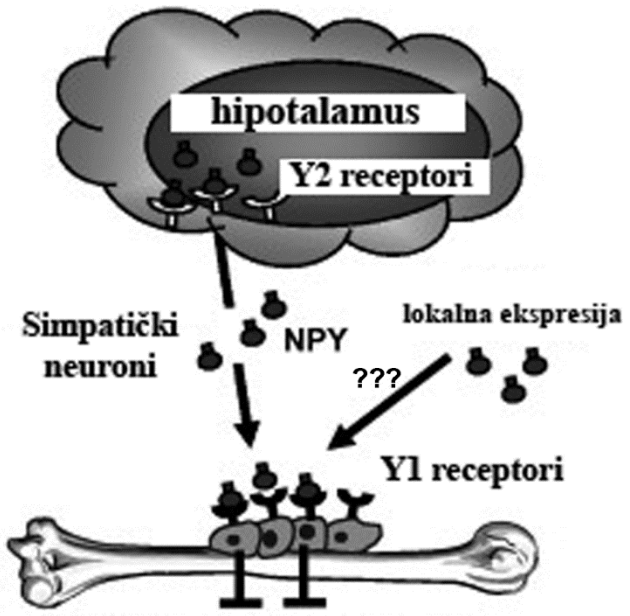
Koštana pregradnja proces je uzajamnog djelovanja koštane razgradnje (resorpcije) i stvaranja kosti te je fini balans između ova dva procesa neophodan za koštanu homeostazu. Neravnoteža ovih procesa dovodi do promjena u koštanoj masi i integritetu koštanog tkiva. Pojačana resorpcija kosti na račun njihova stvaranja rezultira pojavom osteoporoze. Takve kosti su više lomljive i često dolazi do njihovih fraktura [233]. Nasuprot osteoporozi, osteopetroza ili mramorne kosti (Albers-Schonberg sindrom) predstavlja nasljedno oboljenje koje je karakterizirano nesposobnošću osteoklasta u obavljanju njihove funkcije, čime je poremećena normalna ravnoteža u kostima. Poznato je da su ovi procesi koštanog metabolizma rezultat komunikacije stanica koštanog tkiva, ali i komunikacije mozga i stanica kosti. NPY, za kojeg se zna da je uključen u regulaciju apetita i energetske homeostaze, ima važnu ulogu i u regulaciji koštanog metabolizma. Y receptori su izraženi u neuronima hipotalamusa zajedno s receptorima za leptin, te zajedno sudjeluju u regulaciji energetske homeostaze. Novija istraživanja su pokazala da ova dva signalna puta djeluju neovisno jedan o drugome u regulaciji koštanog metabolizma [234, 235]. Leptin se veže na svoje receptore u hipotalamusu [236] te se signal simpatičkim neuronima prenosi sve do osteoblasta, inhibirajući njihovu aktivnost [237].

2.6.1. Centralna uloga NPY-a u koštanom metabolizmu

Koštano tkivo inervirano je senzornim i vegetativnim živčanim vlaknima [238]. Mnogi su neurotransmiteri, neuropeptidi te njihovi receptori, kao što su adrenalin, noradrenalin, supstanca P (SP), peptid vezan za gen kalcitonina (CGRP, prema engl. *calcitonin-gene related peptide*), vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP) i NPY pronađeni u koštanom tkivu [152, 239, 240]. Neki su od navedenih receptora isključivo prisutni u koštanom tkivu (receptori za CGRP, SP, VIP) te njihovom aktivacijom *in vitro* mijenja se aktivnost koštanih stanica [241-243]. Sva ova otkrića podržala su teoriju centralne uloge mozga u regulaciji koštanog metabolizma.

Ducy i suradnici su još 2000. godine pokazali da intracerebroventrikularna injekcija NPY-a uzrokuje smanjenje volumena kompaktne kosti kod divljih miševa [236]. Slični rezultati smanjene aktivnosti osteoblasta dobiveni su kada je NPY bio pojačano izražen specifično u hipotalamusu miša [244]. Ova istraživanja dokazala su bitnu ulogu NPY-a u regulaciji koštanog metabolizma, što je kasnije potvrđeno fenotipizacijom miša sa izbačenim NPY genom ($NPY^{-/-}$). Takvi miševi pokazuju povećanu aktivnost osteoblasta, povećanje koštane mase kompaktne i spužvaste kosti te pojačanu adipogenezu [244]. Sve ovo pokazalo je da NPY ima bitnu ulogu, kako u regulaciji koštanog metabolizma, tako i u regulaciji adipogeneze.

Postavlja se pitanje koji su to receptori uključeni u proces regulacije koštanog metabolizma iz hipotalamusa. Kako je Y2 receptor najviše izražen Y receptor u središnjem živčanom sustavu [245], stvoren je mišji model s izbačenim genom za Y2 (ciljano u tkivu hipotalamusa), koji je imao povećanu aktivnost osteoblasta, dok promjene u površini osteoklasta nisu zamijećene [214]. Gotovo identični fenotip imali su miševi s izbačenim genom za Y2 u zametnoj lozi [246]. Promjene u koštanom metabolizmu nisu bile povezane s promjenama u koncentracijama hormona (leptin, tiroidni hormoni, steroidi) uključenih u koštanu fiziologiju [214, 246], tako da su ovi rezultati dokazali centralnu ulogu Y2 signalnog puta u regulaciji koštane mase (Slika 8), koji je neovisan o endokrinim mehanizmima. Prisutnost Y2 receptora u neuronima koji ne izražavaju NPY te prisustvo Y5 receptora na neuronima koji izražavaju NPY, može biti razlog vrlo malih razlika u fenotipovima ova dva modela [247].



Slika 8. Y1 i Y2 signalni putovi NPY regulacije koštanog metabolizma. NPY se veže na Y2 receptore u hipotalamusu te se signal prenosi preko simpatičkog živčanog sustava do koštanog tkiva, gdje se NPY veže na lokalno izražen Y1 receptor (centralna uloga NPY-a). Lokalno izražen NPY potencijalno se veže na Y1 receptore te na taj način inhibira koštani metabolizam (lokalna uloga NPY-a). Preuzeto i modificirano iz Lee i Herzog [1].

Y1 receptor je prisutan u hipotalamusu, ponajviše u području paraventrikularne jezgre, gdje se nalazi i veliki broj neurona koji izražavaju NPY [248, 249]. Delecija Y1 receptora u zametnoj lozi kod miševa uzrokuje povećanje koštane mase te takvi miševi imaju identičan fenotip kao mišji model sa ciljanom delecijom Y2 receptora u hipotalamusu [190, 214]. Nasuprot tome, ciljana delecija Y1 receptora u hipotalamusu nije imala nikakav učinak na koštanu masu u miševa [190]. Prema tome, Y1 receptori u hipotalamusu nemaju nikakvu ulogu u regulaciji koštanog metabolizma.

Delecija Y4 receptora u zametnoj lozi ($Y4^{-/-}$) nema nikakav učinak na koštani metabolizam, no dvostruka delecija Y4 i Y2 receptora ($Y4^{-/-}$ $Y2^{-/-}$) rezultira većim volumenom kompaktne kosti od onog koji je zamijećen kod $Y2^{-/-}$ muških miševa [217]. Smanjena razina leptina, vjerojatno je uzrok sinergičnog djelovanja ova dva receptora [217].

2.6.2. Lokalna uloga NPY-a u koštanoj pregradnji

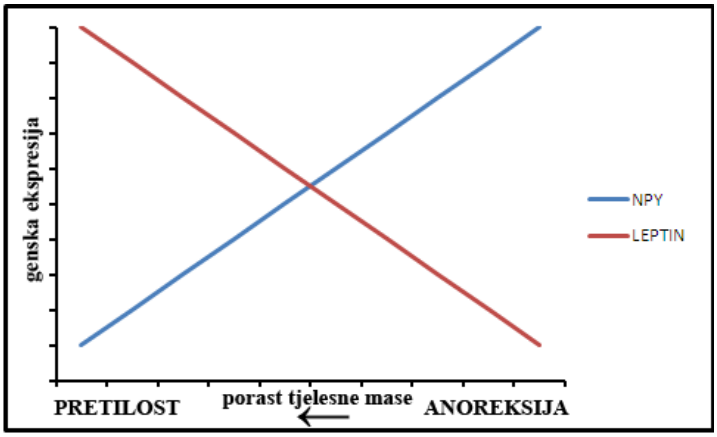
Kako su Y1 receptori pronađeni u stanicama koštanog tkiva [152, 202], a nemaju potvrđenu ulogu u centralnoj kontroli koštanog metabolizma putem NPY signalnog puta mnogo je učinjeno kako bi se objasnila uloga Y1 receptora u perifernoj kontroli koštanog metabolizma. Injekcija NPY-a u hipotalamus miševa s izbačenim genom za NPY nije u potpunosti normaliziralala povećanu aktivnost osteoblasta [244]. To je otvorilo pitanje postoji li signalni put NPY-a koji nije izražen u hipotalamusu, a ima utjecaj na anabolički fenotip takvih miševa. Nedavno je pokazano da su osteoblasti i osteociti izvor NPY-a [151, 152] te da Y2 receptor nije izražen u koštanom tkivu [152]. Takva otkrića sugeriraju mogućnost postojanja lokalnog NPY-Y1 signalnog puta u koštanom metabolizmu. Tretman kalvarijskih osteoblasta NPY-om *in vitro* rezultira smanjenom razinom unutarstaničnog cAMP-a, smanjenim izražajem markera diferencijacije osteoblasta (OC, BSP, DMP-1) te oslabljenom mineralizacijom [152]. NPY pokazuje inhibirajući učinak na kulturu stanica strome koštane srži te taj fenomen nije zamijećen kod kultura dobivenih iz miševa s izbačenim genom za Y1 receptor [190]. Takve kulture dobivene iz miševa s izbačenim genom za Y1 receptor imaju pojačanu mineralizaciju *in vitro* kada ih uspoređujemo s kulturama stanica divljeg tipa [202]. To je dokaz da NPY inhibira diferencijaciju mezenhimskih stanica i aktivnost zrelih osteoblasta djelujući preko Y1 receptora (Slika 8) te da je nefunkcionalnost NPY-Y1 signalnog puta odgovorno za povećanje koštane mase miševa s izbačenim Y1 genom u zametnoj lozi.

Kultura stanica strome koštane srži izolirana iz miševa s izbačenim genom za Y2 receptor u zametnoj lozi pokazuje povećanu mineralizaciju [250]. Kako Y2 receptor nije izražen u stanicama loze osteoblasta, analizom mezenhimskih matičnih stanica ovih miševa otkriven je povećan broj osteoprogenitora te smanjen izražaj Y1 receptora [250].

2.7. Odnos signalnog puta NPY-a i leptina

NPY je primjer prototipa hormona koji stimulira apetit, osobito za ugljikohidratima [251, 252]. Intercerebroventrikularna (ICV) injekcija NPY-a dovodi do pretilosti sitih štakora i miševa te inhibicije razgradnje lipida [186, 253-258]. Tijekom gladovanja pojačan je izražaj NPY-a u hipotalamusu [259, 260]. Već dulje vrijeme postoji hipoteza sustava negativne povratne sprege koja regulira jedenje i odlaganje masti. Osim NPY-a, druga komponenta tog sustava je leptin, koji iz masnog tkiva prelazi u krv i tako dospijeva u mozak, gdje djeluje kao

signal za prestanak jedenja te inhibira izražaj NPY-a u hipotalamusu (Slika 9) [261]. Slični, ali puno manjeg intenziteta, utjecaj na NPY izražaj u mozgu ima inzulin [262-264]. Miševi s izbačenim genom za leptin (ob/ob miševi) kao i štakori, koji su razvili dijabetes zbog nedostatka inzulina, imaju povećan izražaj NPY-a [265, 266].



Slika 9. Shematski prikaz ovisnosti izražaja NPY-a i leptina o tjelesnoj masi. Tijekom gladovanja dolazi do pojačanog izražaja NPY-a u hipotalamusu. Kako tjelesna masa i odlaganje masti raste, raste i razina NPY-a koji potiče izražaj leptina. Leptin djeluje kao središnji regulator apetita (signal sitosti), a izražavaju ga stanice masnog tkiva. Porastom njegove koncentracije u hipotalamusu, dolazi do kočenja NPY izražaja.

Y1 i Y5 receptori uključeni su u proces kontrole hranjenja putem NPY proteina [267] te su oba izražena u hipotalamusu [268]. Mišji Y1 „knockout“ model nije pokazao nikakve promjene u hranidbenim navikama, no nakon stimulacije hranjenja ICV injekcijom NPY-a, miševi divljeg tipa imali su povećani apetit, dok takav efekt nije zamijećen u miševa sa izbačenim genom za Y1 [269, 270]. Miševi sa izbačenim genom za Y5 su pretili zbog prekomjernog apetita (hiperfagije), a miševi sa izbačenim Y1 genom vremenom se debljaju zbog smanjene lokomotorne aktivnosti [269, 271].

$Y2^{-/-}$ i ob/ob miševi imaju identični anabolički fenotip trabekularne kosti [235]. $Y2^{-/-}$ miševi imaju povećanu aktivnost osteoblasta u periostu i endoostu, koja rezultira povećanom masom čvrste kosti [234]. Nasuprot tome ob/ob mišji model pokazao je smanjenu masu i gustoću

kompaktne kosti [234]. Ovi rezultati pokazali su suprotno djelovanje Y2 i leptin signalnog puta u metabolizmu kompaktne kosti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kloniranje Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa

Gen od 300 parova baza koji kodira za preproNPY izrezan je iz plazmida [272] pomoću NsiI restrikcijske endonukleaze. Vektor (pLITIMUS 29) koji sadrži IRES (prema engl. *internal ribosomal entry site*) sekvencu od 580 parova baza, topaz inačicu GFP-a te sekvencu poliadenilacije goveđeg hormona rasta (bGHpolyA, prema engl. *bovine growth hormone polyadenylation sequence*) bio je izrezan istim enzimom te je preproNPY slijed ubačen ispred IRES slijeda. Nakon što je uklonjeno jedinstveno SalI restrikcijsko mjesto u pLITIMUS 29, orijentacija NPY cDNA je bila provjerena pomoću restrikcije KpnI endonukleazom. Nakon što je pravilna orijentacija potvrđena, bicistronski konstrukt NPY-IRES-TpzGFP-bHGpolyA je izrezan pomoću NheI i XhoI restrikcijskih endonukleaza. Koristeći isti par enzima taj fragment je ubačen u plazmid pUC18 iza 2,3 kilobaznog proksimalnog dijela promotora alfa 1 lanca kolagena tipa 1 (Col1A1). U takvom konstruktu 2.3 kilobazni promotor kontrolira izražaj NPY-a i GFPtopaz gena te se GFP koristi kao indikator pojačanog izražaja NPY-a (Slika 11A). Krajnji konstrukt je izrezan kao 5.4 kilobazni SalI slijed te je injiciran mikrotehnologijom u jezgru oplođene jajne stanice (tzv. pronuklearna mikroinjekcija) u UCHC Institutional Gene Targeting and Transgenic facility [273]. Oocite su implantirane u lažno trudne C57BL6 ženke (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA). Dobivene su dvije transgenične linije. Heterozigotni Col2.3NPY-ires-GFPtopaz mužjaci su križani sa C57BL6 ženkama divljeg tipa (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA). Sve pokuse na životinjama odobrilo je etičko povjerenstvo University of Connecticut Medical Center.

3.2. Genotipizacija

Svi miševi su tri tjedna od okota odvojeni od roditelja i genotipizirani. Distalni komadić repa (2-3mm) je odrezan kod svih miševa, uklonjena je koža te su genotipizirani fluorescentnim mikroskopiranjem kralježnice distalnog repa. Heterozigoti su izražavali GFPtopaz transgen dok kod miševa divljeg tipa nije detektirana fluorescencija. Ostatak tkiva korišten je za izolaciju genomske DNA te je genotip svakog miša potvrđen lančanom reakcijom polimeraze. Korištene početnice (5'GFP 5'-TCA TCT GCA CCA CCG GCA AGC-3' i 3'GFP 5'-AGC AGG ACC ATG TGA TCG CGC-3') amplificiraju fragment GFPtopaz gena (525 pb). PCR umnažanje provedeno je pod slijedećim uvjetima: početna faza od 5 minuta na 95 °C, tada 35

ciklusa od 95°C kroz 30 sekunda, 65 °C kroz 30 sekundi, 72°C kroz 40 sekundi, potom konačna faza ekstenzije kod 72°C kroz 7 minuta. Rezultati PCR reakcije analizirani su na 2%-tnom agaroznom gelu obojanom etidij-bromidom. Za eksperimente su korišteni transgenični miševi i miševi divljeg tipa iz istog legla koji su žrtvovani gušenjem pomoću CO_2.

3.3. Kultura stanica strome koštane srži (BMSC)

Mjesec dana stari miševi su žrtvovani pomoću CO_2. Femuri i tibije su izdvojene od okolnog tkiva te su odstranjene epifizne ploče rasta. Koštana srž je skupljena ispuhivanjem medijem za staničnu kulturu αMEM (engl. *minimum essential medium alpha*), koji sadržava 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina i 10% goveđeg fetalnog seruma (GIBCO BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Za ispuhivanje korištena je igla provrta 25G. Stanice su resuspendirane pomoću igle provrta 18G te filtrirane kroz stanični filter kako bi se dobila jednostanična suspenzija. Stanice su izbrojene u 0.04% tripanskom modrilu koristeći Burker-Turk brojač stanica. 5 x 10^6 živih stanica je zasađeno po jažici pločice za staničnu kulturu promjera zdenca 35 mm (Falcon, #3046; Fisher Scientific). Nakon četiri dana polovica volumena medija je zamijenjena sa svježim αMEM medijem. Medij je u potpunosti izmijenjen diferencirajućim medijem sedmoga dana kulture. Diferencirajući medij je sadržavao 50 µg/mL askorbinske kiseline i 8 mM ß-glicerolfosfat (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Ovaj osteogeni medij mijenjan je svaki drugi dan tijekom slijedećih 14 dana kako bi se potaknula diferencijacija osteoblasta i mineralizacija kolonija.

3.4. Kultura mišjih kalvarijskih stanica (mCOB)

Kalvarijske stanice su izolirane iz 5 dana starih miševa. Nakon što su uklonjeni šavovi tjemenih kostiju, kalvarije su isjeckane na više komada te digestirane četiri puta po 30 minuta u puferu koji je sadržavao 0.05% tripsina (GIBCO BRL, Life Technologies, Inc.) i 0.5 mg/ml kolagenaze P (Boehringer Mannheim, Mannheim, Njemačka) na 37 °C uz stalno miješanje. Stanične frakcije 2-4 su skupljane, a enzimatska aktivnost je blokirana dodatkom istog volumena DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) medija koji sadrži 10% fetalnog seruma (FCS, prema engl. *fetal calf serum*), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina. Frakcije 2-4 su spojene i resuspendirane u hranjivom mediju DMEM te filtrirane kroz stanični filter. 30 X 10^4 stanica je zasađeno po zdencu pločice za staničnu kulturu promjera zdenca 35

mm u mediju DMEM. Sljedećeg dana medij je promijenjen te su stanice ponovno nahranjene četvrtog dana kulture. Nakon sedam dana stanicama je dodan diferencirajući medijαMEM koji je sadržavao 10% FCS-a, 50 µg/mL askorbinske kiseline i 4 mM ß-glicerofosfat. Nakon sedmog dana, medij je mijenjan svaka dva dana tijekom trajanja cijelog pokusa.

3.5. Mjerenje aktivnosti alkalne fosfataze i stupnja mineralizacije

Kulture stanica strome koštane srži i kulture mišjih kalvarijskih stanica nakon četrnaestog dana diferencijacije su isprane PBS-om (prema engl. *phosphate buffered saline*) te je izmjerena aktivnost alkalne fosfataze pomoću komercijalno dostupnog kita (86-R Akalaline Phosphatase kit; Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) prema uputama proizvođača. Nakon što su stanice obojane na aktivnost alkalne fosfataze, pločice za staničnu kulturu su skenirane pomoću skenera (UMax Astra 4000). Stupanj mineralizacije procijenjen je metodom von Kossa bojanja. Iste pločice su inkubirane pod UV svijetlom u 5% srebro nitratu. Kao izvor UV svijetla korišten je ultraljubičasti crosslinker. Nakon 30 sekundi stanice su isprane destiliranom vodom te su rezultati zabilježeni skenerom (UMax Astra 4000) i obrađeni pomoću Adobe Photoshop-a. Postotak mineralizirane površine izračunat je pomoću ImageJ software-a (NIH).

3.6. Mjerenje koncentracije NPY proteina

Kako bi se provjerila razina cirkulirajućeg NPY-a, skupljena je krv 3 mjeseca starih muških i ženskih Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa iz istog legla. Uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi kao bi došlo do koagulacije krvi. Nakon što je krv koagulirala, uzorci su centrifugirani te je skupljen serum svakog od uzoraka.

Nakon što su miševi starosti 1 mjesec bili žrtvovani, izrezane su im bedrene i goljenične kosti. Svaka kost je očišćena od mišićnog i vezivnog tkiva te je koštana srž isprana pomoću igle i PBS-a. Takve očišćene kosti su nakon toga zaleđene u tekućem dušiku i usitnjene do finog praha u RIPA puferu (Tris 50mM, pH=7.8; NaCl 150 mM; SDS 0.1 %; Natrij-deoksikolat 0.5 %; Triton X 100 1%) pomoću keramičkog tarionika s tučkom. RIPA puferu je dodan i koktel proteaznih inhibitora (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Uzorci su nakon toga dodatno usitnjeni pomoću homogenizatora, držani na tresilici

kroz 45 minuta na 4°C te centrifugirani na 14000 g kroz 10 minuta. Supernatant s proteinima je skupljen te su koncentracije proteina izmjerene kolorimetrijskom metodom pomoću komercijalno dostupnog kita Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) prema uputama proizvođača.

Medij mCOB kultura je skupljen tako što je na 19. dan kulture diferencijacijski medij zamijenjen novim koji je 2 dana kasnije skupljen i korišten za mjerenje koncentracije NPY proteina.

Koncentracije proteina NPY su mjerene pomoću RayBio Neuropeptide Y Enzyme Immunoassay kita (RayBiotech, Inc., Norcross , Georgia, USA) prema uputama proizvođača. Uzorci seruma su razrijeđeni 1:2 u puferu iz kita prije samog mjerenja, dok medij mCOB kultura nije razrijeđen. Za mjerenje proteina NPY u proteinskim izolatima iz kostiju, 85 µg proteina nanešeno je po svakoj jažici. Rezultati su analizirani pomoću SigmaPlot software-a (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

3.7. Imunocito/histokemijske metode

Femuri su izolirani iz transgeničnih Col2.3NPY-ires-GFP topaz miševa i miševa divljeg tipa u dobi od 3 mjeseca te su fiksirani u otopini 4% paraformaldehida na 4°C u trajanju 1-2 dana. Nakon fiksacije kosti su dekalcificirane kroz 5-7 dana koristeći 15% otopinu EDTA (prema engl. *etilen-diaminotetra-octena kiselina*), te potopljene u 30% saharozi 1 dan. Nakon toga uzorci su uklopljeni u smrzavajući medij (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA) i izrezani na debljinu reza od 7 µm. Tako pripremljeni rezovi inkubirani su sa poliklonalnim zečjim (ab10980) anti-mišjim (1:6000) NPY primarnim antitijelom (Abcam, Cambrige, UK) preko noći na 4°C. Slijedeći dan rezovi su inkubirani sa Cy3-konjugiranim sekundarnim antitijelom, 1:200, magarećim anti-zečjim IgG-om. Cy3 je žuto-zelena fluorescentna boja cijanina (ekscitacija 550 nm, emisija 570 nm). Nakon inkubacije od 2 sata preparati su isprani u PBS-u te su pregledani pod fluorescencijskim mikroskopom koristeći filter za Cy3. Koštano tkivo inkubirano bez primarnog antitijela korišteno je kao negativna kontrola.

Neonatalne kalvarije su izolirane iz miševa starih 5 dana nakon čega su genotipizirane fluorescentnim mikroskopiranjem pri čemu su kalvarije transgeničnih životinja izražavale GFPtopaz transgen dok kod kalvarija miševa divljeg tipa nije detektirana fluorescencija. Cjelovito tkivo kalvarije uzgajano je 24 sata u DMEM mediju koji sadrži 10% fetalnog

seruma, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina i 1% goveđi serumski albumin (BSA, prema engl. *bovine serum albumin*). Slijedeći dan su organi, prije fiksacije u 4% paraformaldehidu, kultivirani kroz 2 sata na sobnoj temperaturi kako bi se usporio metabolizam. Nakon dvodnevne fiksacije, kalvarije su potopljene u 30% saharozi 1 dan nakon čega su uklopljene u smrzavajući medij (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA). Tako pripremljeni uzorci izrezani su na debljinu reza od 6 µm nakon čega je uslijedilo postupak prethodno opisanog postupka imunohistokemijskog bojanja na NPY protein. Prerezi kalvarije inkubirani bez primarnog antitijela korišteni su kao negativna kontrola.

mCOB kulture transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa su 21. dana od uspostavljanja kulture fiksirane u 4% paraformaldehidu kroz 2 minute. Takve kulture podvrgnute su imunocitokemijskom bojanju na protein NPY. Protokol imunocitokemijskog bojanja identičan je onome koji se koristio kod imunohistokemijskog bojanja prereza femura i kalvarija. Kulture netretirane primarnim antitijelom poslužile su kao negativna kontrola.

3.8. Histološka analiza izražaja transgena

Histološki su analizirana meka tkiva (mozak, jetra, slezena, bubreg, pluća, mokraćni mjehur i koža), kalvarija i bedrene kosti izolirane iz jednomjesečnih Col2.3NPY-ires-GFPtopaz transgeničnih muških i ženskih miševa. Sva tkiva su fiksirana u 4% paraformaldehidu na $4^{O}C$ kroz 2 dana. Koštana tkiva su dekalcificirana u 14% otopini EDTA u trajanju od 5 dana. Fiksirana meka tkiva i dekalcificirana koštana tkiva su potopljena preko noći u 30% saharozi te uklopljena u smrzavajući medij (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA). Uklopljene kosti su longitudinalno izrezane na debljinu prereza od 7 µm koristeći ljepljivu traku (Finetec Ltd, Japan). Meka tkiva su rezana na debljinu prereza od 5 µm koristeći CryoJane sistem traka (Instrumedics, Ann Arbor, MI, USA). Na histološke rezove je nakapan 50% glicerol u PBS-u te su prekriveni pokrovnicama. Izražaj GFPtopaz transgena zabilježena je pomoću Zeiss Observer.Z1 invertnog mikroskopa (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY, USA) s filter kockom optimiziranom za GFPtopaz (ekscitacija 470/10 nm, emisija 510/15 nm; Chroma). Uzorci su cijelo vrijeme bili zaštićeni od izlaganja svjetlosti.

3.9. Histomorfometrijska analiza

Femuri su izolirani iz Col2.3NPY-ires-GFP topaz transgeničnih i miševa divljeg tipa u dobi od 3 mjeseca te fiksirani u otopini 4% paraformaldehida na 4°C u trajanju 1-2 dana. Nakon fiksacije kosti su dekalcificirane kroz 5-7 dana koristeći 15% otopinu EDTA te potopljene u 30% saharozi 1 dan. Uzorci su nakon toga bili uklopljeni u smrzavajući medij (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA) i izrezani na debljinu reza od 7 µm.

Col2.3NPY-ires-GFP miševi i miševi divljeg tipa koji su korišteni za procjenu brzine mineralizacije kostiju su bili iz istog legla te su bili stari 3 mjeseca. Sve životinje su intraperitonealno injicirane kalceinom (10 mg po kilogramu tjelesne mase) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) 7 dana prije žrtvovanja. Novu intraperitonealnu injekciju ksilenol crvenila (90 mg po kilogramu tjelesne mase) (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) životinje su primile 2 dana prije žrtvovanja. Nedekalcificirani preparati za histološku analizu dobiveni su na isti prethodno opisan način uz iznimku dekalcificirajućeg koraka. Dinamička histomorfometrija bedrenih kostiju je analizirana pomoću Osteomeasure sustava (OsteoMetrics, Inc., Atlanta, GA, USA). Mjerenja čvrste i trabekularne kosti napravljena su na udaljenosti od 400 µm od ploče rasta. Mjerena je brzina odlaganja minerala (MAR, prema engl. *mineral apposition rate*) (µm/day) kao udaljenost dviju tetraciklinskih linija (kalcein i ksilenol crvenila) mineralizacije u odnosu na vrijeme između dvije primjene tetraciklinskog biljega (2 dana) te brzina stvaranja kosti (BFR, prema engl. *bone formation rate*) kao količina novonastale kosti u određenom vremenskom intervalu. BFR definiran je brzinom odlaganja minerala (brzina kojom osteoblasti stvaraju i mineraliziraju kost) i mineralizirajućom površinom (postotak površine kosti koja gdje se stvara kost).

3.10. Detekcija GFP-a u primarnim kulturama

Izražaj GFPtopaz transgena praćena je u primarnim mCOB i BMSC kulturama izoliranim iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa. Slike su dobivene pomoću Zeiss Observer.Z1 invertnog mikroskopa (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY, USA) s filter kockom optimiziranom za GFPtopaz.

3.11. Izolacija RNA i analiza genskog izražaja

Ukupna stanična RNA primarnih kultura starih 21 dan, izolirana je pomoću TRIzol reagenta (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) prema uputama proizvođača. Ukratko, nakon što su stanice isprane u PBS-u, dodano je 1 ml TRIzol reagenta te su stanice skupljene u eppendorf tube. Kako bi se razbili mineralizirani noduli, takva suspenzija je homogenizirana ULTRA-TURRAX T 10 Basic homogenizatorom (IKA, Wilmington, NC, USA) te je dodano 200 µl kloroforma. Nakon što su uzorci dobro promiješani, centrifugirani su 5 minuta na 12000 g pri 4°C. Gornja vodena faza prenešena je u novu tubicu te je dodan isti volumen izopropanola. RNA je precipitirana preko noći na -20°C nakon čega su uzorci centrifugirani 15 minuta na 12000 g. Precipitat je opran u 70%-tnom etanolu, centrifugiran 5 minuta na 12000 g te otopljen u destiliranoj vodi tretiranoj s dietil-pirokarbonatom (DEPC voda). Koncentracija i čistoća RNA određena je spektrofotometrijskom metodom koristeći NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Mjerena je apsorbancija pri 260 i 280 nm uz korekcije na 320 i 230 nm.
Skupljene su goljenične i bedrene kosti 3 mjeseca starih ženskih i 2 mjeseca starih muških miševa. Nakon što su očišćene od vezivnog i mišićnog tkiva te nakon što je ispuhana koštana srž, sve kosti su zaleđene u tekućem dušiku. Nakon što je dodano 2 ml TRIzol reagenta (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), kosti su homogenizirane uređajem za homogenizaciju tvrdih tkiva ULTRA-TURRAX T 10 Basic Homogenizer (IKA, Wilmington, NC, USA). Daljnji postupak izolacije ukupne stanične RNA identičan je prethodno opisanom protokolu za izolaciju RNA iz primarnih staničnih kultura.

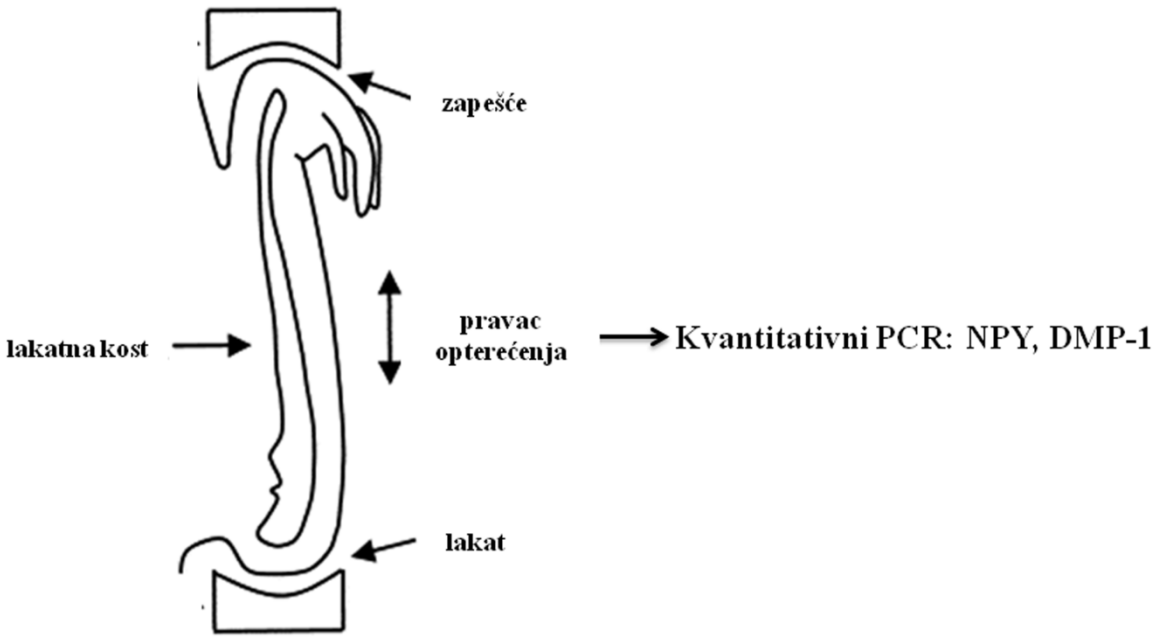
Ukupna stanična RNA obrnuto je prepisana u komplementarnu DNA (cDNA, prema engl. *complementary DNA*) postupkom reverznog prepisivanja (RT, prema engl. *reverse transcription*) prema uputi proizvođača za Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) i to za 1 µg RNA po uzorku. Prije samog reverznog prepisivanja, DNA iz uzoraka je digestirana pomoću enzima DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) prema uputi proizvođača kako bi se eliminirala genomska DNA. Kvaliteta cDNA određena je lančanom reakcijom polimeraze 18S ribosomske RNA.

Kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze na stroju 7900HT fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) izmjerena je relativni izražaj NPY-a, Y1 receptora, Y2 receptora te osteogenetskih markera BSP, OC, DMP-1 koristeći komercijalno

dostupne TaqMan® Gene expression probe (identifikacijski brojevi proba: NPY, Mm00445771_m1; Y1, Mm00650798_g1; Y2, Mm00435350_m1; OC, Mm03413826_mH; DMP-1, Mm00803833_g1; BSP, Mm00492355_m1) u kostima, stanicama strome koštane srži te u mišjim kalvarijskim stanicama Col2.3NPY miševa i miševa divljeg tipa. Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH, prema engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) korišten je kao kontrolni gen za normalizaciju (Mm99999915_g1). Svaka reakcija sastojala se od duplikata u pločicama s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate; Applied Biosystems). Relativni izražaj gena izračunat je iz Ct vrijednosti promatranih gena i Ct vrijednosti GAPDH gena uporabom standardne krivulje (RQ manager 1.2, Applied Biosystems). Izražaj svakog gena standardiziran je u odnosu na unutarnju kontrolu GAPDH za svaki uzorak. Izražaj gena u uzorcima porijeklom iz miševa divljeg tipa normaliziran je na vrijednost 1. Student t-test korišten je kako bi se dobili rezultati genskog izražaja uzoraka iz transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa.

3.12. Analiza promjene genskog izražaja prilikom *in vivo* mehaničkog opterećenja lakatne kosti

Col2.3NPY-ires-GFP topaz transgenični miševi i miševi divljeg tipa u dobi od 3 mjeseca starosti korišteni su za pokus mehaničkog opterećenja lakatne kosti. Središnji dio dijafize mehanički je opterećen i savijen. Miševi su bili anestezirani općim inhalacijskim anestetikom isofluranom te položeni na sredinu okvira EnduraTec sustava za testiranje (Slika 10). Lakatna kost je mehanički opterećena po 30 sekundi kroz 60 ciklusa silom od 2.4 Newtona. Životinje su eutanizirane 24 sata nakon mehaničkog opterećenja. Nakon eutanazije RNA je izolirana pomoću TRIzol reagenta (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Kao negativna kontrola korištena je lakatna kost koja nije bila mehanički opterećena. Analiziran je izražaj NPY-a Y1 receptora i DMP-1 gena.



Slika 10. Shematski prikaz mehaničkog opterećenja lakatne kosti. Lakatne kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa položene su u EnduraTec sustav za testiranje. 24 sata nakon mehaničkog opterećenja životinje su žrtvovane te je izolirana ukupna RNA, koja se koristila za kvantitativnu analizu promjene izražaja NPY-a i DMP-1 gena.

3.13. Analiza koštanog metabolizma mikro-kompjuteriziranom tomografijom

Promjene koštanog metabolizma Col2.3NPY-ires-GFPtopaz transgeničnih miševa analizirane su pomoću mikro-kompjuterizirane tomografije bedrenih kostiju. Morfometrija bedrene kosti miševa starih 3 mjeseca (10-11 miševa po grupi) provedena je s pomoću „cone beam“ mikrofokusne kompjutorske tomografije X zrakama (µCT40, Scanco Medical AG). Serijske tomografske slike dobivene su pri 55 kV struje jačine 145µA. Prikupljeno je 1000 projekcija po rotaciji u trajanju od 300 ms. Trodimenzionalne 16-bitne sive slike rekonstruirane su metodom povratne projekcije pri čemu su korišteni Shepp-Logan filteri. Slike su uzete u 12,3 mm vidnom polju pri gustoći od 578.704 voxels/mm^3 (izometrički 12-µm voxeli). Razlika čvrste i trabekularne kosti od koštane srži i mekih tkiva dobivena je pomoću Gaussovog filtera za smanjenje šuma te kalibracijom praga gustoće od 495 i 740 mg/cm^3 koji odgovara gustoći hidroksiapatita. Morfometrija trabekularne kosti mjerena je u području distalnih metafiza bedrene kosti. Morfometrirano je područje unutar endokortikalne površine veličine 1mm, koje je udaljeno 1 mm od ploče rasta. Kompaktna kost morfometrirana je unutar

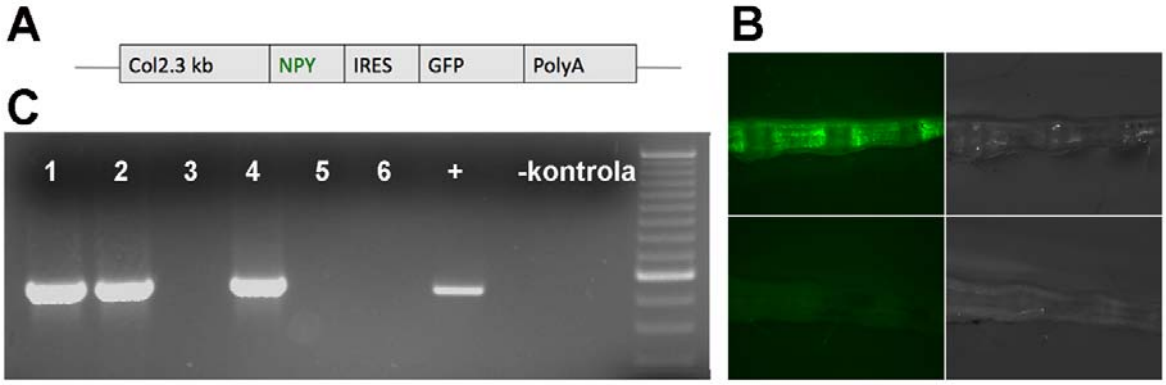
područja od 600 µm, koje se nalazi 5,1 mm udaljeno od ploče rasta, u području distalnog ili srednjeg djela dijafize.

Promjene koštane građe transgeničnih miševa definirane su uporabom sljedećih koštanih morfoloških parametra: udio trabekularne kosti (volumen kosti/volumen trabekula, %), broj trabekula (1/mm), debljina trabekula (µm), razmak između trabekula (µm), moment inercije (mm^4) i debljina korteksa (µm).

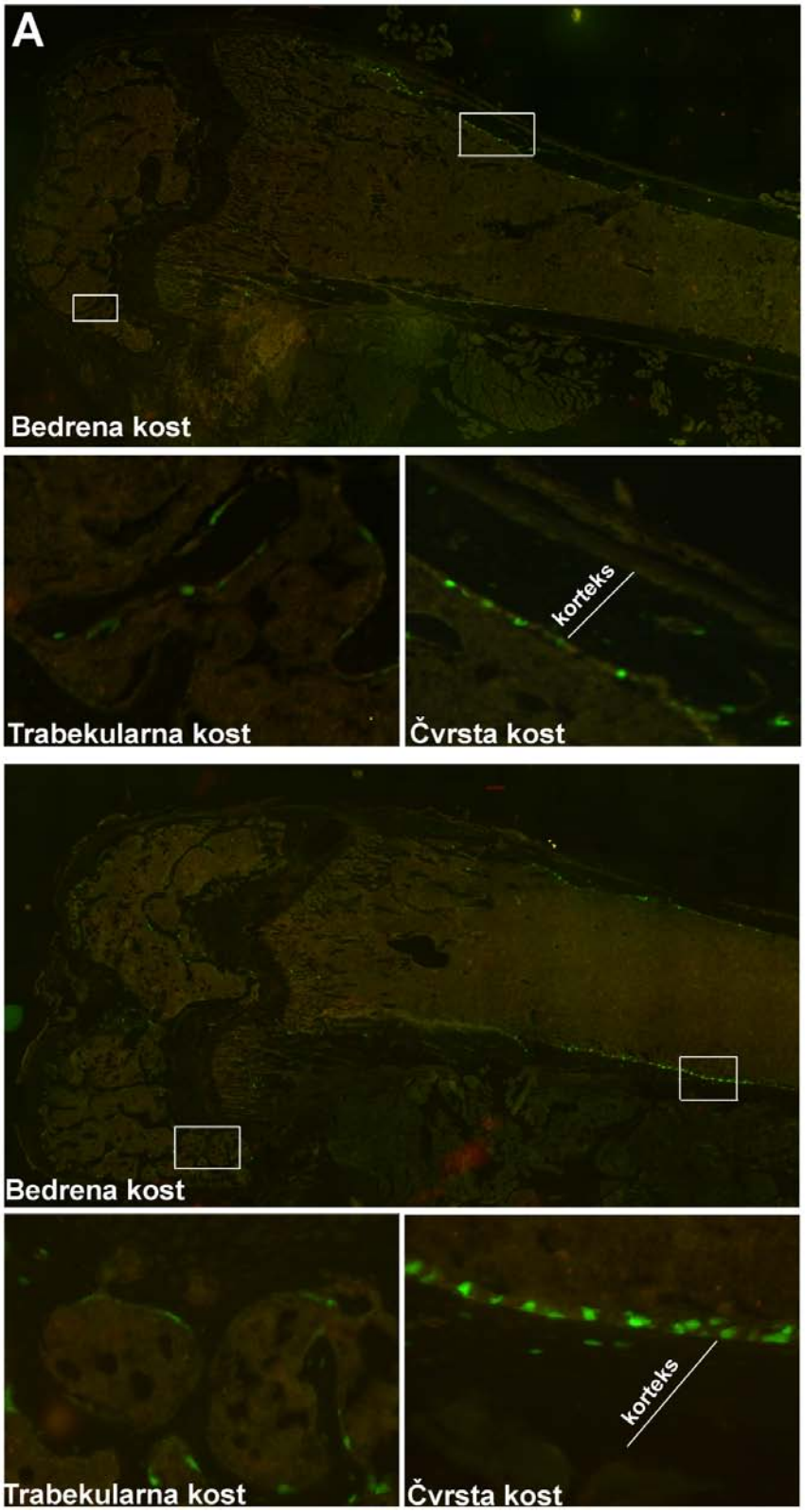
4. REZULTATI

4.1. Pojačan izražaj NPY proteina u koštanom tkivu

U ovom radu uzgojeni su transgenični miševi u kojima je NPY pojačano izražen pod kontrolom 2,3 kilobaznog proksimalnog dijela promotora alfa 1 lanca kolagena tipa 1. Takvi miševi osim NPY cDNA, u svom genomu imaju i ugrađen gen za topaz inačicu GFP-a. Oba gena nalaze se pod kontrolom istog promotora, međusobno su odvojena IRES slijedom, tako da se iz iste mRNA prevode dva proteina, NPY i GFPtopaz (Slika 11A). Dobivene su dvije transgenične linije C57Bl6 naslijeđa. Heterozigotni mužjaci su križani sa C57Bl6 ženkama čime su dobivene transgenične heterozigotne životinje u očekivanom omjeru. Svi miševi su genotipizirani tako što je utvrđen izražaj GFPtopaz transgena u repnoj kralježnici (Slika11B). Genotipovi su potvrđeni lančanom reakcijom polimeraze GFP transgena (Slika 11C). Prijašnja istraživanja pokazala su da je Col2.3 promotor aktivan u stanicama osteoblasta i osteocita [152]. Histološka analiza različitih tkiva transgeničnih jednomjesečnih miševa potvrdila je GFP izražaj unutar koštanog tkiva trabekularne kosti, čvrste kosti i kalvarije kod mužjaka (Slika 12A) i ženki (Slika 12B). Zelena fluorescencija uočena je u većini osteocita i osteoblasta koštanog tkiva trabekularne kosti, čvrste kosti (Slika 12A-B) i kalvarije mužjaka (Slika 13) i ženki (Slika 14). Izražaj transgena nije zamijećen u nekoštanim tkivima kao što su mozak, slezena, bubreg, jetra, koža, mokraćni mjehur i pluća (Slika 13-14).

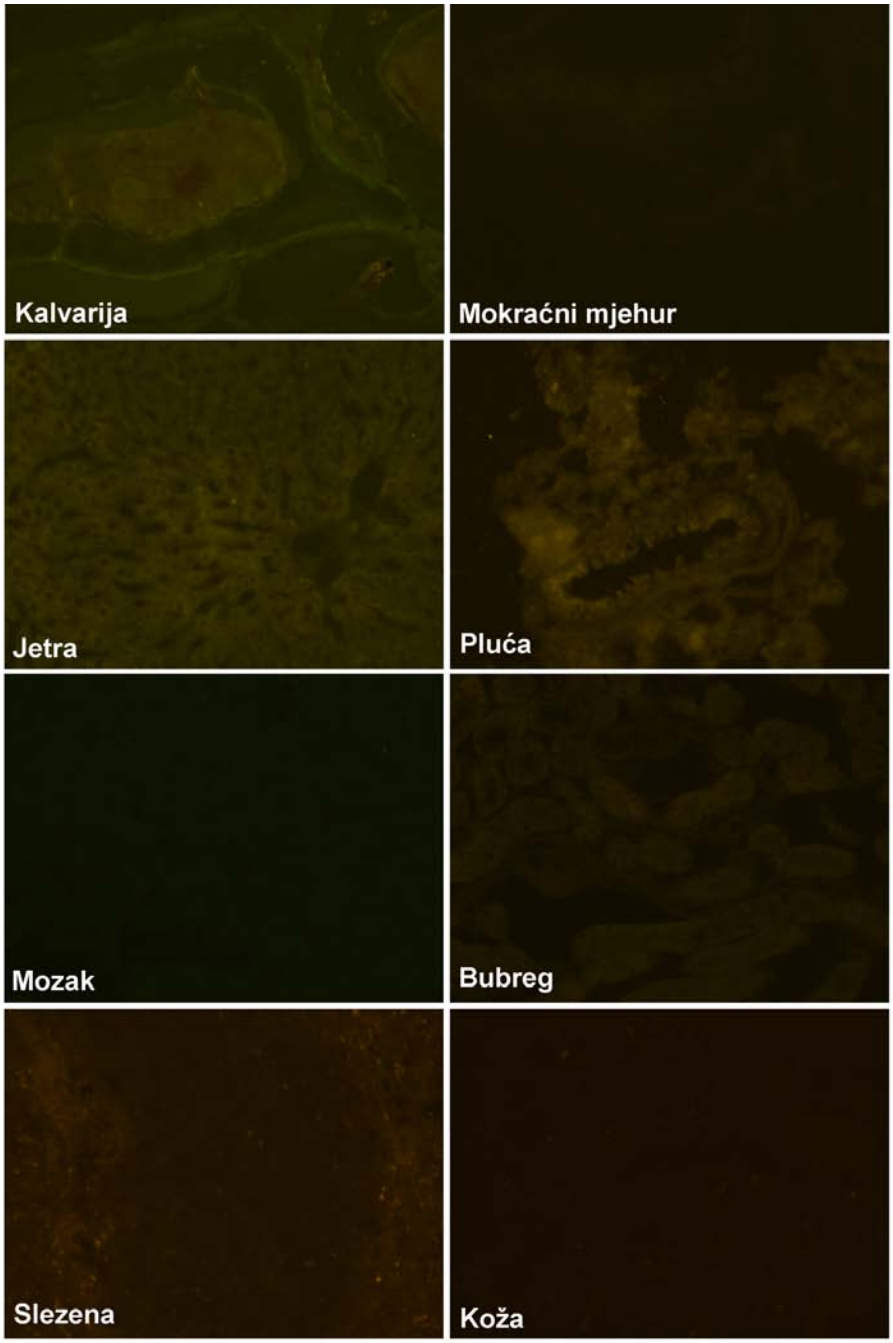


Slika 11. Genotipizacija. A. Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševi sadrže transgeni konstrukt u kojemu je NPY i GFPtopaz geni pod kontrolom 2.3 kilobaznog proksimalnog dijela promotora alfa 1 lanca kolagena tipa 1. IRES slijed odvaja ova dva gena, dok cijeli konstrukt završava sekvencom poliadenilacije goveđeg hormona rasta. **B.** Fluorescentnim mikroskopom promatrana je fluorescencija Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. **C.** Col2.3NPY-ires-GFPtopaz genotipovi su potvrđeni PCR-om. Korišteni su GFP specifični primeri 5'-TCA TCT GCA CCA CCG GCA AGC-3' i 5'-AGC AGG ACC ATG TGA TCG CGC-3' koji amplificiraju fragment GFP gena od 525 parova baza.



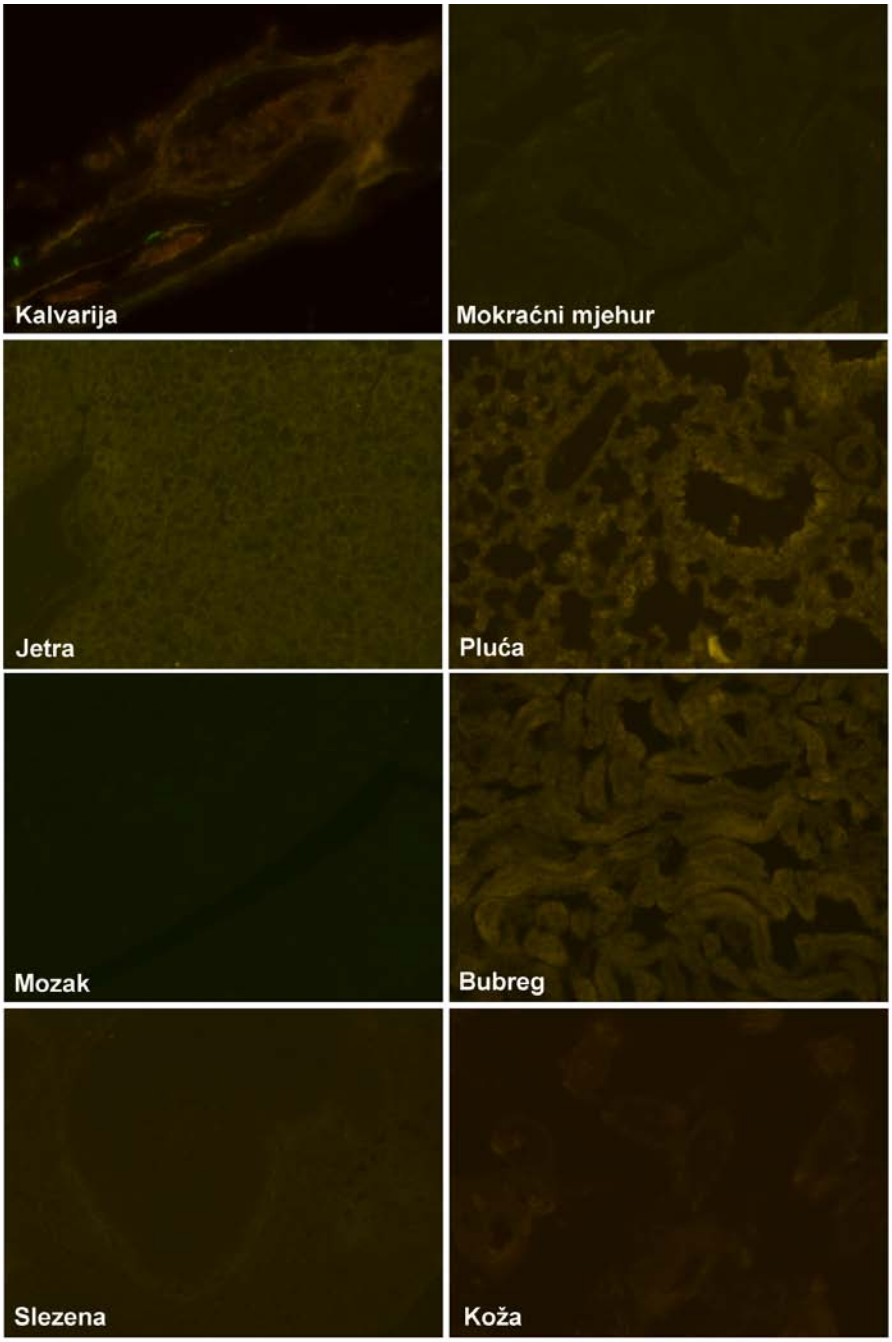
Slika 12. Detekcija GFP izražaja na histološkim prerezima bedrene kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševima. A. Fluorescentnim mikroskopom detektiran je izražaj GFP transgena u osteocitima i osteoblastima trabekularne i čvrste kosti mužjaka. **B.** Histološki

prerezi trabekularne i čvrste kosti transgeničnih ženki pokazali su prisutnost transgena u osteocitima i osteoblastima.



Slika 13. Detekcija GFP izražaja na različitim histološkim prerezima muških Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa. Zelene fluorescentne stanice detektirane su u tkivu

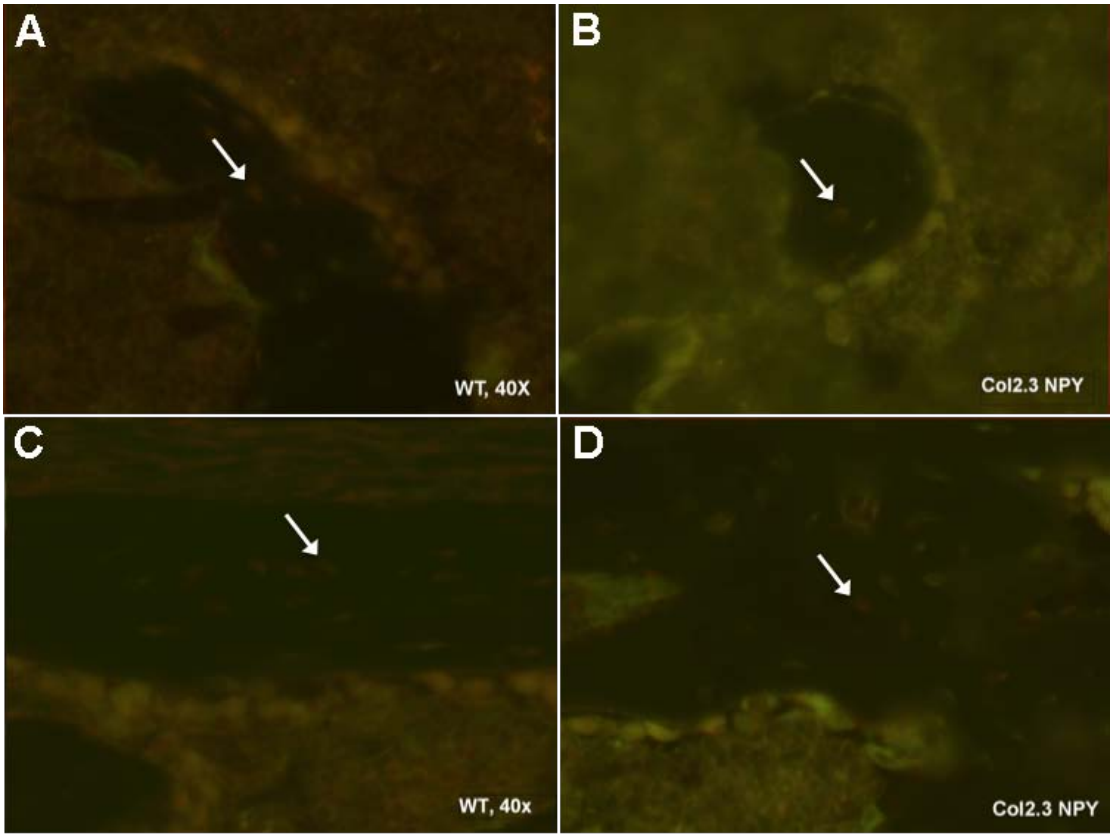
kalvarije, dok kod ostalih organa (mokraćni mjehur, mozak, bubreg, jetra, pluća, slezena, koža) nije zamijećen izražaj GFP transgena.



Slika 14. Detekcija GFP izražaja na različitim histološkim prerezima ženskih Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa. Tkivni prerezi kalvarije sadrže stanice koje izražavaju

GFPtopaz transgen. Prerezi svih ostalih tkiva (mokraćni mjehur, mozak, bubreg, jetra, pluća, slezena, koža) bili su negativni na GFP izražaj.

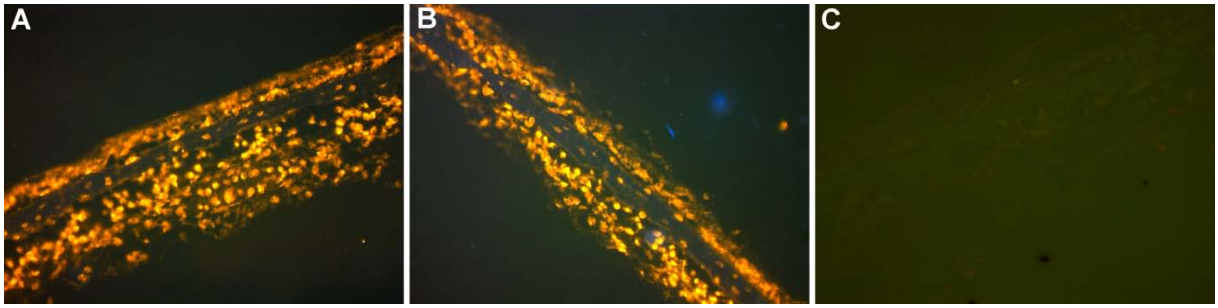
Imunohistokemijsko bojanje prereza bedrene kosti transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa pokazalo je prisutnost NPY proteina u osteocitima trabekularne kosti (Slika 15A-B). Bojanje čvrste kosti dokazalo je NPY protein u osteocitima transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa (Slika 15C-D). Imunohistokemijskim metodama nije dokazana razlika u razini NPY proteina između Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa.



Slika 15. Imunohistokemijska detekcija NPY proteina na histološkim prerezima bedrene kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševima i miševa divljeg tipa. Imunohistokemijska analiza pokazala je prisutnost NPY proteina u osteocitima trabekularne kosti miševa divljeg tipa (**A**) i osteocitima trabekularne kosti transgeničnih miševa (**B**). Imunohistokemijskim bojanjem čvrste kosti dokazana je prisutnost NPY proteina u osteocitima oba genotipa (**C-D**).

korišteno je sekundarno antitijelo konjugirano Cy3 fluorescentnom bojom. Prerezi su mikroskopirani koristeći filter za Cy3.

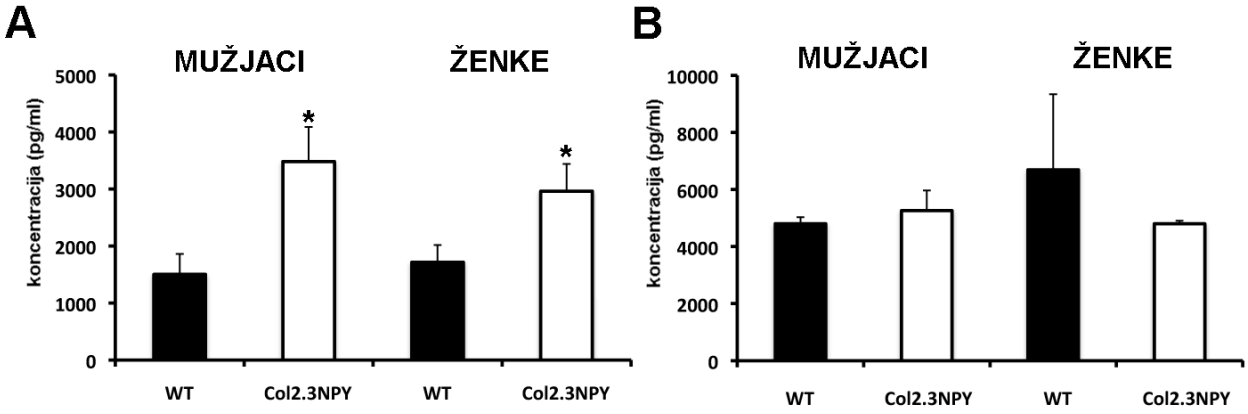
Neonatalne kalvarije su izolirane iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz mladunaca i mladunaca divljeg tipa. Nakon što su genotipizirane pomoću fluorescentnog mikroskopa, kultivirane su na 37°C u DMEM mediju, koji je sadržavao 1% albumin goveđeg seruma (BSA, prema engl. *bovine serum albumin*). Nakon 24 sata organi su kultivirani 2 sata na sobnoj temperaturi nakon čega je uslijedila fiksacija. Imunohistokemijskim bojanjem potvrđena je prisutnost NPY proteina u kalvarijama transgeničnih životinja (Slika 16B) i životinja divljeg tipa (Slika 16A). Ovom metodom nije utvrđena razlika u prisutnosti NPY proteina među ova dva genotipa.



Slika 16. Imunohistokemijska detekcija NPY proteina na histološkim prerezima kultiviranih kalvarija Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. Imunohistokemijskim bojanjem dokazan je izražaj NPY-a u osteoblastima i osteocitima tkiva kalvarije miševa divljeg tipa (**A**) i transgeničnih miševa (**B**). Kao negativna kontrola korišteni su histološki preparati koji nisu bili tretirani primarnim antitijelom (**C**). Prerezi su mikroskopirani fluorescencijskim mikroskopom koristeći filter za Cy3.

Kako bi se potvrdila razlika u izražaju NPY proteina, mjerena je razina NPY proteina u koštanom tkivu i serumu transgeničnih i divljih životinja pomoću RayBio Neuropeptide Y Enzyme Immunoassay kita (RayBiotech, Inc., Norcross , Georgia, USA). Proteinski izolati iz koštanog tkiva transgeničnih Col2.3NPY-ires-GFPtopaz mužjaka i ženki imaju značajno

povišenu koncentraciju NPY proteina u usporedbi s miševima divljeg tipa iz istog legla (Slika 17A). Kod transgeničnih mužjaka NPY je 1.5 puta više izražen nego kod mužjaka divljeg tipa iz istog legla. NPY je bio 2 puta više izražen u kostima transgeničnih ženki u odnosu na izražaj u kostima ženki divljeg tipa. Razina NPY proteina u serumu transgeničnih mužjaka i ženki se ne razlikuje od razine NPY proteina u serumima miševa divljeg tipa (Slika 17B). Ovakvi rezultati ukazuju da ciljan pojačan izražaj NPY proteina u koštanom tkivu ne mijenja razinu cirkulirajućeg NPY proteina te sve razlike između genotipova su posljedica lokalnog prekomjernog izražaja NPY-a.

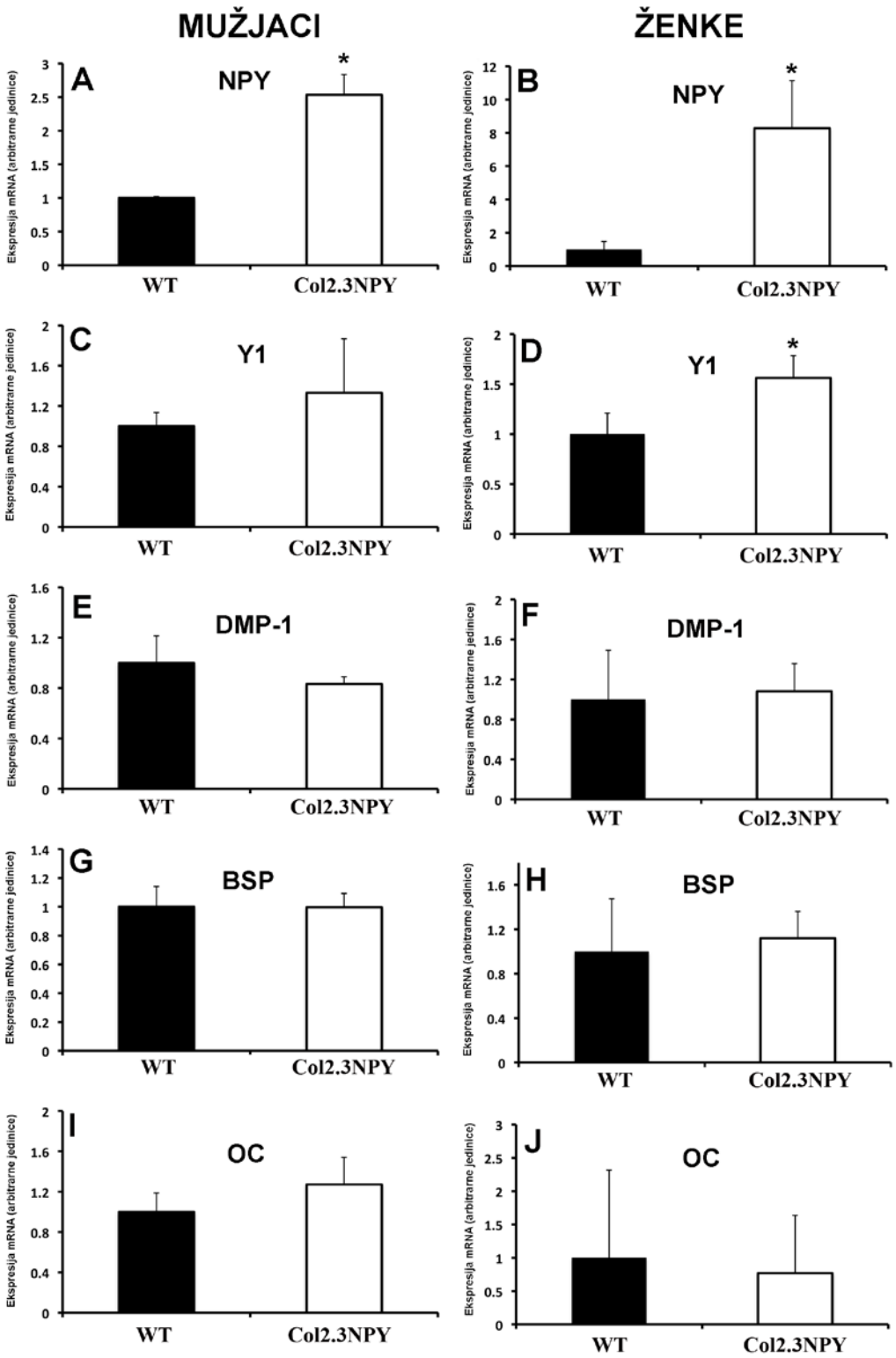


Slika 17. Enzimski imunotest za određivanje NPY proteina u koštanom tkivu i serumu Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. A. EIA kit pokazao je statistički značajani povećan izražaj NPY proteina u kostima transgeničnih mužjaka i ženki. **B.** Istom metodom nisu utvrđene razlike u serumskoj razini NPY proteina između transgeničnih mužjaka i ženki i mužjaka i ženki divljeg tipa. Prikazana je standardna pogreška aritmetičke sredine 3 do 5 uzoraka po grupi. *, $p<0.05$.

4.2. Posljedice povećanog izražaja NPY proteina u koštanom tkivu *in vivo*

Kako bi se ispitale promjene u izražaju markera osteogeneze u kostima transgeničnih Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa, izolirana je ukupna RNA te je izražaj provjeren kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu. Kako bi se procijenila i dokazala povećan izražaj NPY-a u koštanom tkivu, mjerena je relativna količina NPY mRNA. Kao što je

prikazano na Slici 18A-B, NPY je 2.5 puta više izražen u transgeničnih mužjaka te 8 puta u transgeničnih ženki u usporedbi s miševima istog spola iz identičnog legla. Kako bi se utvrdile promjene u izražaju NPY receptora, mjerena je relativna količina mRNA Y1 i Y2 receptora. Rezultati su pokazali blagi trend povećanja izražaja Y1 receptora u koštanom tkivu transgeničnih miševa u usporedbi s miševima divljeg tipa kod mužjaka i ženki (Slika 18C-D). Izražaj Y2 receptora nije detektiran niti kod transgeničnih niti kod miševa divljeg tipa (rezultati nisu prikazani). Analiza genskog izražaja markera osteogeneze, dentin-matrix proteina-1 (DMP-1), koštanog sijaloproteina (BSP) i osteokalcina (OC) nije pokazala nikakve promjene u njihovom izražaju kod Col2.3NPY-ires-GFPtopaz mužjaka i ženki u usporedbi s divljim tipom miševa istog legla (Slika 18E-F-G-H-I-J). Također je validiran izražaj gena koji su uključeni u ranu fazu osteogeneze kao što je osterix i Runx2 (rezultati nisu prikazani). Razine njihovih mRNA nisu bile promijenjene kod transgeničnih životinja kada se usporede s razinama izražaja u miševa divljeg tipa.

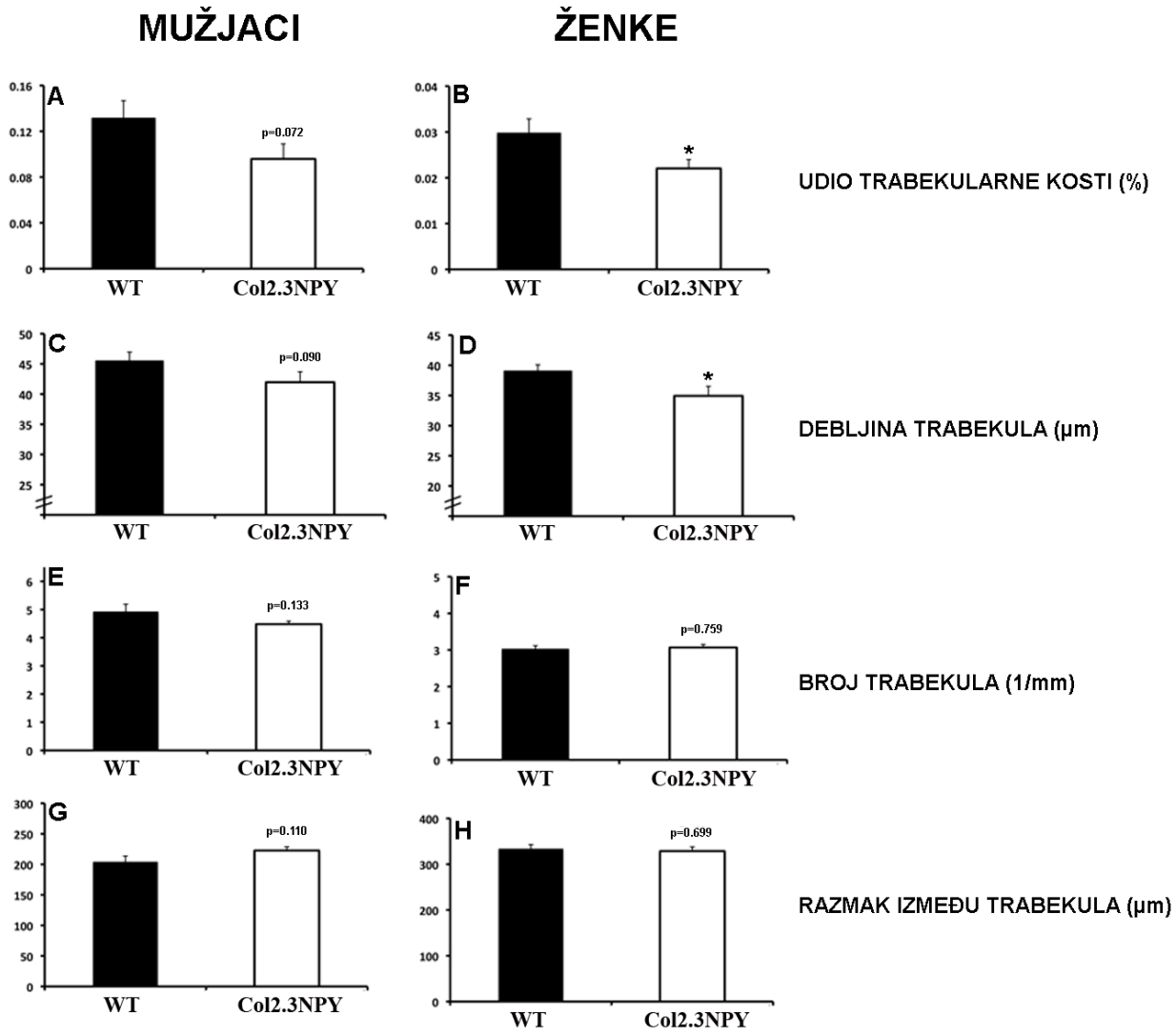


Slika 18. Analiza genskog izražaja u koštanom tkivu kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu. Pomoću kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu provjeren je izražaj NPY-a (**A**, **B**), Y1 receptora (**C**, **D**) te markera osteogeneze (DMP-1, OC, BSP) (**E**, **F**, **G**, **H**,

I, **J**). Ukupna RNA izolirana je iz koštanog tkiva dvomjesečnih mužjaka i tromjesečnih ženki nakon čega je učinjena analiza genskog izražaja gore navedenih gena transgeničnih životinja i životinja divljeg tipa iz istog legla. Pokazan je pojačan izražaj NPY-a u kostima transgeničnih miševa oba spola u odnosu na miševe divljeg tipa (**A**, **B**). Transgenični mužjaci nisu imali nikakve promjene u izražaju Y1 receptora. Kod transgeničnih ženki uočen je trend povećanog izražaja Y1 receptora u odnosu na ženke divljeg tipa iz istog legla (**C**, **D**). Analizom izražaja markera osteogeneze nije utvrđena nikakva razlika u njihovom izražaju između Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa (**E-J**). Transkripcijske vrijednosti su normalizirane prema vrijednosti "housekeeping" GAPDH gena i relativne prema izražaju u miševa divljeg tipa. Prikazana je standardna pogreška aritmetičke sredine 3 do 11 uzoraka po grupi. *, $p<0.05$.

4.3. Smanjen udio trabekularne kosti u Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa

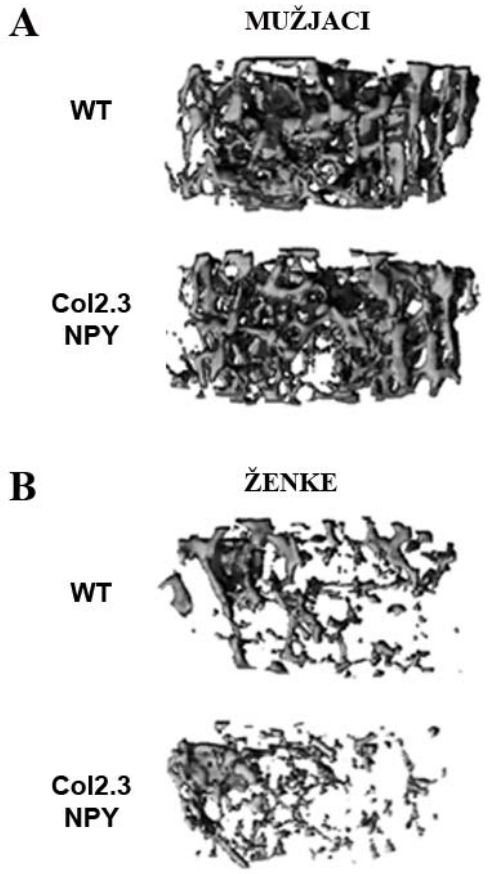
Miševi starosti 3 mjeseca su eutanazirani te su bedrene kosti transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa analizirane pomoću mikro-kompjuterizirane tomografije. Povećan izražaj NPY-a u koštanom tkivu Col2.3NPY-ires-GFPtopaz mužjaka i ženki rezultirala je smanjenjem udjela trabekularne kosti od 25% u odnosu na mužjake i ženke divljeg tipa iz istog legla (Slika 19A-B). Ovakve promjene koštane mase povezane su s narušenom koštanom mikrostrukturom. Naime analiza trabekula bedrene kosti pokazala je smanjenje njihove debljine od gotovo 10% kod transgeničnih miševa oba spola u odnosu na miševe divljeg tipa (Slika 19C-D). Kod ostalih parametra kojima opisujemo koštanu mikrostrukturu, kao što je broj trabekula i razmak između trabekula, nisu zamijećene nikakve promjene u transgeničnih miševa oba spola u odnosu na miševe divljeg tipa (Slika 19E-F-G-H).



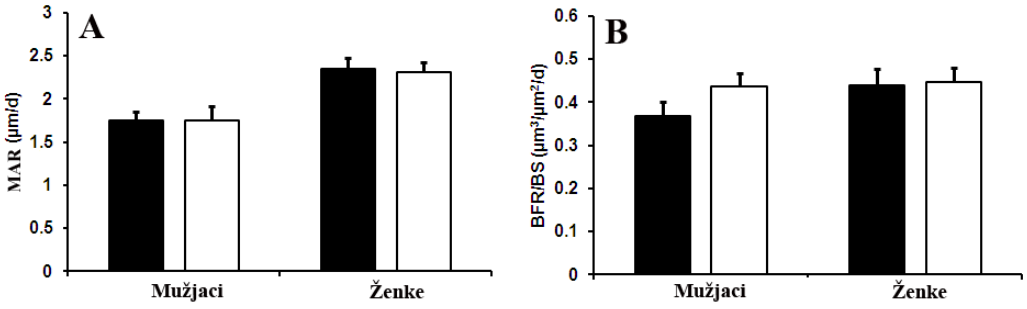
Slika 19. Mikro-CT analiza trabekula bedrene kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. Pojačan izražaj NPY-a u koštanom tkivu transgeničnih životinja rezultirao je smanjenjem udjela trabekularne kosti od 25% (**A**, **B**) te smanjenjem debljine trabekula od 7-10% (**C**, **D**) kod mužjaka i ženki. Broj trabekula (**E**, **F**) i razmak među njima (**G**, **H**) nisu promijenjeni kod transgeničnih životinja u odnosu na divlji tip. Prikazana je standardna pogreška aritmetičke sredine po grupi; *, $p<0,05$.

Trodimenzionalni mikro-CT prikaz trabekula bedrene kosti transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa izabrani su od životinja čiji su parametri koštane mikrostrukture bili najbliže standardnoj pogrešci aritmetičke sredine svake od grupe. Ove trodimenzionalne slike odraz su promjena morfometrijskih parametara trabekularne kosti transgeničnih mužjaka (Slika 20A) i

transgeničnih ženki (Slika 20B) u odnosu na miševe divljeg tipa istog spola. Povećan izražaj NPY proteina u koštanom tkivu transgeničnih Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa nije imao značajan utjecaj na brzinu odlaganja minerala (MAR) (Slika 21A) i brzini stvaranja kosti (BFR) (Slika 21B) u trabekularnoj kosti mužjaka i ženki.



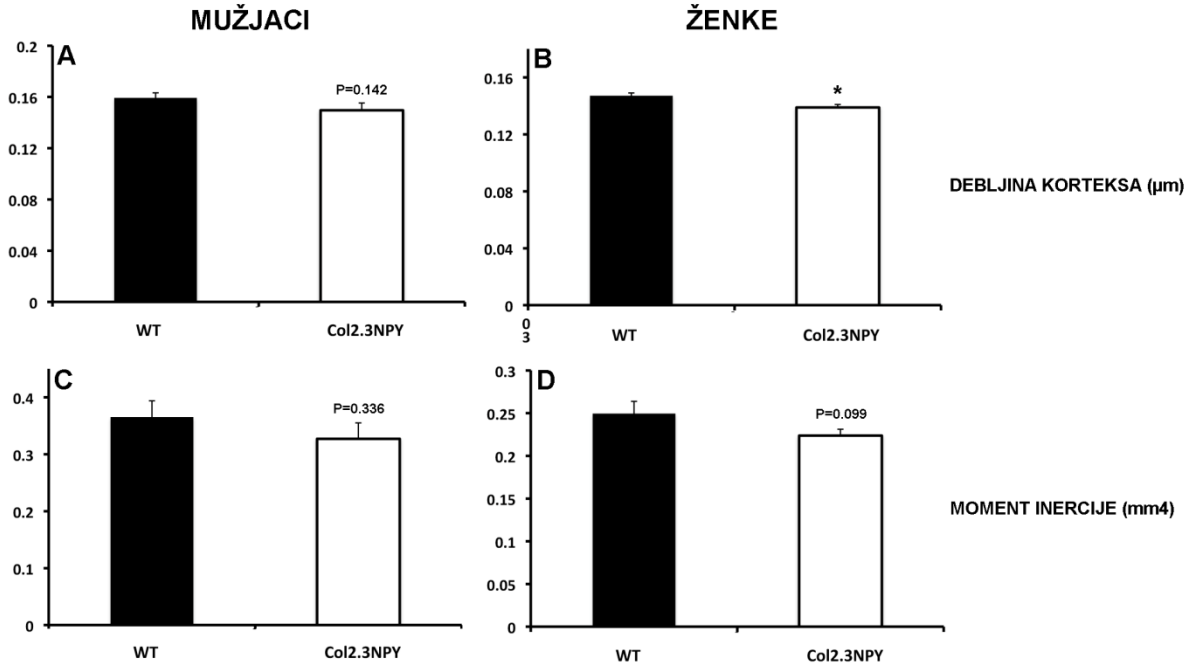
Slika 20. Trodimenzionalni mikro-CT prikaz trabekula bedrene kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. A. Trodimenzionalni prikaz trabekula bedrene kosti transgeničnih mužjaka i mužjaka divljeg tipa. **B.** 3-D prikaz trabekula Col2.3NPY-ires-GFPtopaz ženki i ženki divljeg tipa.



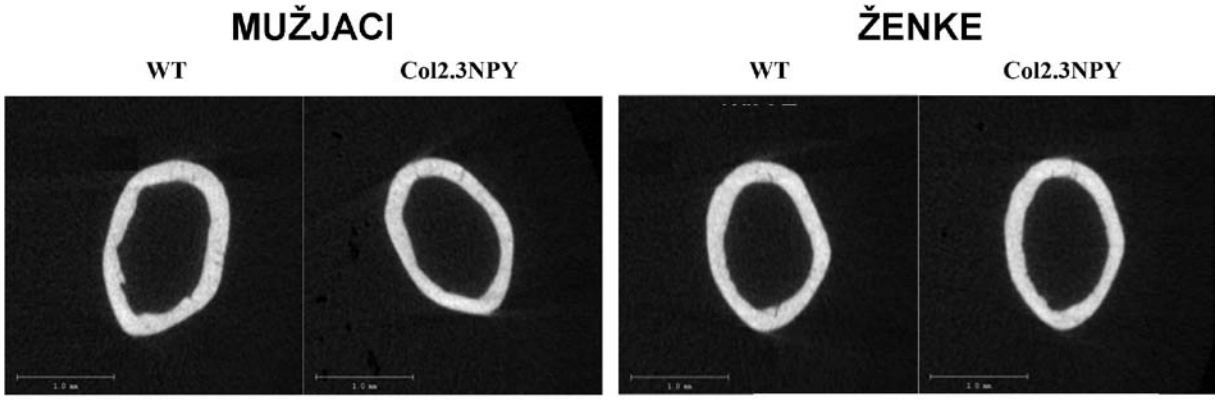
Slika 21. Brzina odlaganja minerala (MAR) i brzina stvaranja kosti (BFR) u trabekulama bedrene kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. A. Povećan izražaj NPY proteina u transgeničnih životinja nije doveo do promjena u brzini odlaganja minerala transgeničnih mužjaka i ženki (**A**). Promjene nisu primjećene niti u brzini stvaranja kosti kod mužjaka i ženki (**B**). Prikazana je standardna pogreška aritmetičke sredine po grupi.

4.4. Parametri morfometrijskih promjena čvrste kosti nisu značajno promijenjeni u transgeničnih miševa

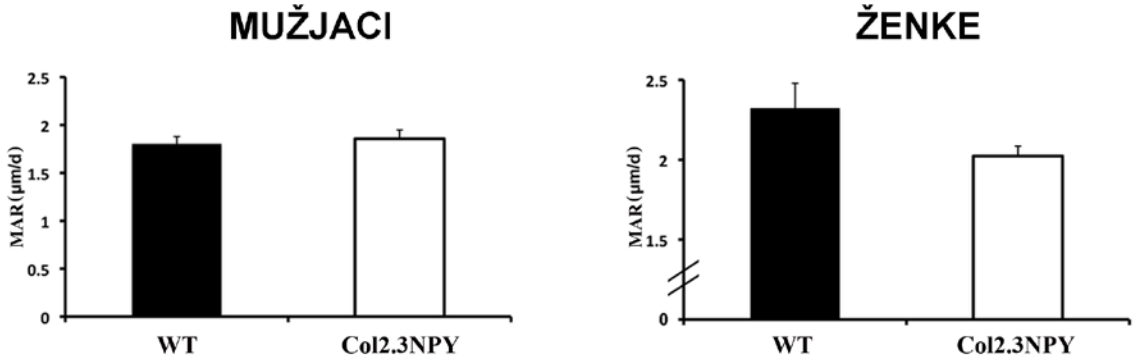
Jedno od nametnutih pitanja je bilo i može li povećan izražaj NPY proteina u koštanom tkivu rezultirati promjenama u čvrstoj kosti transgeničnih Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa. Osnovna duljina bedrene kosti transgeničnih mužjaka i ženki nije promijenjena u odnosu na mužjake i ženke divljeg tipa. Zamijećeno je smanjenje debljine korteksa od 6% kod Col2.3NPY-ires-GFPtopaz ženki u usporedbi sa ženkama divljeg tipa iz istog legla (Slika 22B). Ovu promjenu debljine korteksa povezujemo s trendom smanjenja brzine odlaganja minerala (MAR) u čvrstoj kosti transgeničnih ženki (Slika 24). Parametri debljine korteksa (Slika 22A) i brzine odlaganja minerala čvrste kosti (Slika 24) nisu bili promijenjeni kod transgeničnih mužjaka u odnosu na divlji tip mužjaka iz istog legla. Parametar snage čvrste kosti (moment inercije) nije narušen ili promijenjen u transgeničnih miševa oba spola u odnosu na miševe divljeg tipa (Slika 22C-D). Ovakve male promjene u morfometrijskim parametrima čvrste kosti nemoguće je vidjeti na dvodimenzionalnim mikro-CT slikama (Slika 23).



Slika 22. Mikro-CT analiza čvrste kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. Mikro-CT analiza čvrste kosti pokazala je da povećan izražaj NPY-a rezultira smanjenjem debljine korteksa od 6% kod transgeničnih ženki (**B**). takve promjene strukture čvrste kosti nisu zamijećene kod mužjaka (**A**). Nisu zamijećene nikakve promjene u parametrima snage čvrste kosti kod transgeničnih mužjaka (**C**) i ženki (**D**). Prikazana je standardna pogreška aritmetičke sredine po grupi; *, p<0,05.



Slika 23. Dvodimenzionalni mikro-CT prikaz čvrste kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. Povećan izražaj NPY-a u čvrstoj kosti nema veliki utjecaj na njezinu strukturu što vidimo na 2-D prikazu čvrste kosti transgeničnih mužjaka i ženki te mužjaka i ženki divljeg tipa.

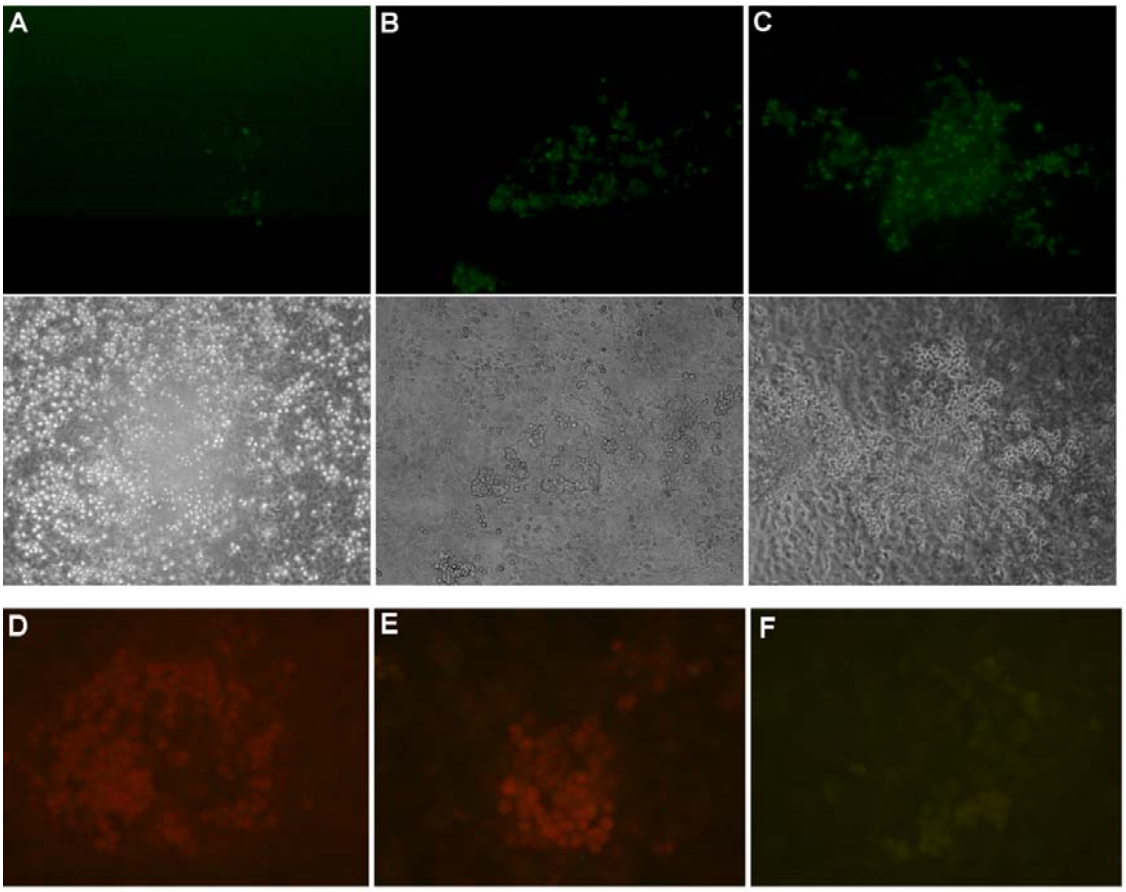


Slika 24. Brzina odlaganja minerala u čvrstoj kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. Transgenične ženke imale su 13% smanjenu brzinu odlaganja minerala u čvrstoj kosti (p=0,099), dok takav trend nije zamijećen kod mužjaka (p=0,657). Prikazana je standardna pogreška aritmetičke sredine po grupi.

4.5. Povećan izražaj NPY proteina u Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševima rezultira smanjenom mineralizacijom i smanjenim izražajem markera osteogeneze u kulturi mišjih kalvarijskih stanica

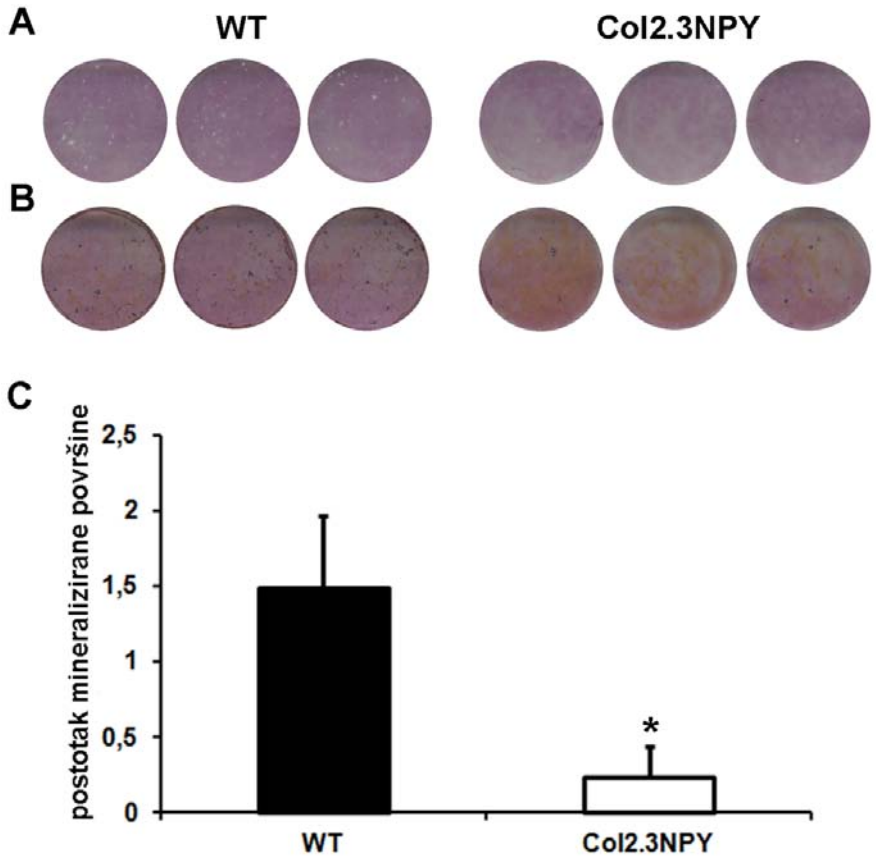
Mišje kalvarijske stanice (mCOB) uzgajane su u mediju za rast stanica kroz 7 dana, nakon čega su uzgajane dodatnih 14 dana u uvjetima osteoindukcije. Col2.3 promotor bio je neaktivan do četrnaestog dana kulture (deveti nakon što su stanice uzgajane u diferencirajućem mediju) kada samo nekoliko stanica unutar novonastalih nodula izražava GFPtopaz transgen (Slika 25A). Fluorescencija GFPtopaz transgena se povećava sedamnaestog (Slika 25B) i dvadeset i prvog (Slika 25C) dana kulture kada većina stanica unutar mineraliziranih područja izražava transgen. Imunohistokemijsko bojanje na NPY protein mCOB kultura starih 21 dan pokazalo je prisutnost NPY-a u kulturama mišjih kalvarijskih stanica dobivenih iz mladunaca divljeg tipa (Slika 25D) i kulturama dobivenih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz mladunaca (Slika 25E). Ovom metodom imunohistokemijskog

bojanja nemoguće je bilo dokazati razliku u izražaju NPY proteina između kultura dobivenih iz transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa. Nespecifično bojanje nije zamijećeno u negativnoj kontroli (Slika 25F).



Slika 25. Izražaj Col2.3NPY-ires-GFPtopaz transgena te imunocitokemijska detekcija NPY proteina u mCOB kulturama. Neonatalni mišji kalvarijski osteoblasti uzgajani su u uvjetima osteoindukcije. Petnaestog dana kulture (**A**) samo mali broj stanica unutar novoformiranih nodula izražava GFPtopaz. Fluorescencija postaje jača sedamnaestog dana kulture (**B**) te dvadesetprvog dana (**C**) gotovo sve stanice unutar nodula izražavaju GFPtopaz. Imunohistokemijsko bojanje 21 dan starih mCOB kultura pokazalo je prisutnost NPY proteina u kulturama izoliranim iz miševa divljeg tipa (**D**) te u kulturama dobivenih iz kalvarija transgeničnih miševa (**E**). (**F**) predstavlja negativnu kontrolu imunohistokemijske reakcije.

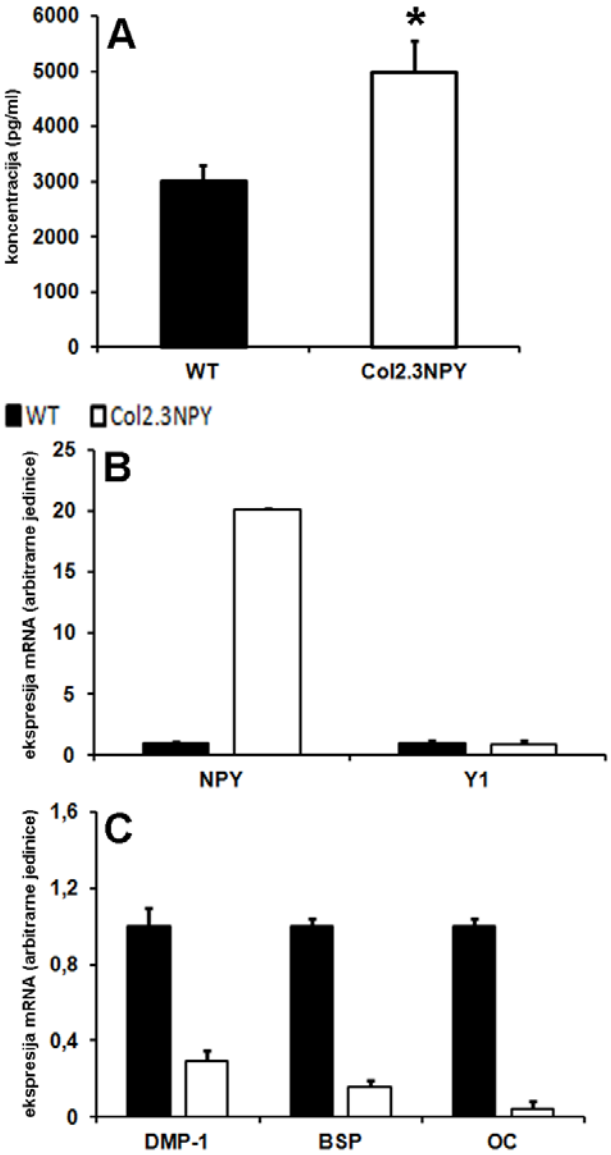
Nakon 21 dan, kulture su bojane na aktivnost alkalne fosfataze (ALP) te je analizirana mineralizacija metodom von Kossa bojanja srebrom. Izabran je jedan od tri neovisna pokusa koji je prikazan na Slici 26. Bojanje na aktivnost alkalne fosfataze pokazalo je smanjenu aktivnost alkalne fosfataze u kulturama mišjih kalvarijskih stanica izoliranih iz transgeničnih miševa u odnosu na kulture dobivene iz miševa divljeg tipa (Slika 26A). Pojačan izražaj NPY proteina u kulturama mišjih kalvarijskih stanica dobivenih iz transgeničnih miševa rezultira 6 puta smanjenom mineralizacijom tih kultura u odnosu na kulture dobivene iz divljeg tipa miševa (Slika 26B-C).



Slika 26. Aktivnost alkalne fosfataze i mineralizacija mCOB kultura. Dvadesetprvog dana mCOB kulture su bojane na aktivnost alkalne fosfataze (**A**) te je analizirana mineralizacija metodom von Kossa bojanja (**B**). Uspoređene su kulture dobivene iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa s kulturama dobivenim iz miševa divljeg tipa. Primijećena je smanjena aktivnost alkalne fosfataze u kulturama dobivenih iz transgeničnih miševa. Von Kossa

bojanjem utvrđen je smanjeni potencijal mineralizacije mCOB kultura dobivenih iz transgeničnih životinja. Razlike u mineralizaciji su evaluirane pomoću ImageJ programa. Pokazano je da je mineralizacija mCOB kultura dobivenih iz transgeničnih životinja 6 puta smanjena u odnosu na kulture dobivene iz miševa divljeg tipa (**C**). Prikazana je standardna pogreška aritmetičke sredine od 3 kulture po grupi; *, $p<0,05$.

Nakon 21. dana kulture, diferencirajući medij je skupljen te je izolirana ukupna RNA iz kulture dobivene iz transgeničnih miševa i kulture dobivene iz miševa divljeg tipa. NPY EIA analiza pokazala je da kod transgeničnih kultura dolazi do pojačane sekrecije NPY proteina u medij u odnosu na kulture divljeg tipa (Slika 27A). Analizom genskog izražaja kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu, potvrđen je pojačan izražaj NPY-a u kulturama dobivenih iz transgeničnih životinja u odnosu na kulture dobivene iz životinja divljeg tipa (Slika 27B). Relativna količina NPY mRNA bila je 20 puta povećana u kulturama dobivenim iz Col2.3-ires-NPY mladunaca. Nikakva razlika među ovim kulturama u izražaju Y1 receptora nije primijećena (Slika 27B). Izražaj svih promatranih markera osteogeneze bio je smanjen u kulturama dobivenih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa u odnosu na kulture dobivene iz miševa divljeg tipa. Relativan izražaj DMP-1 gena bio je smanjen 3 puta, BSP gena 6 puta te je najveća promjena relativnog izražaja (22 puta) bila zamijećena kod osteokalcina (Slika 27C).

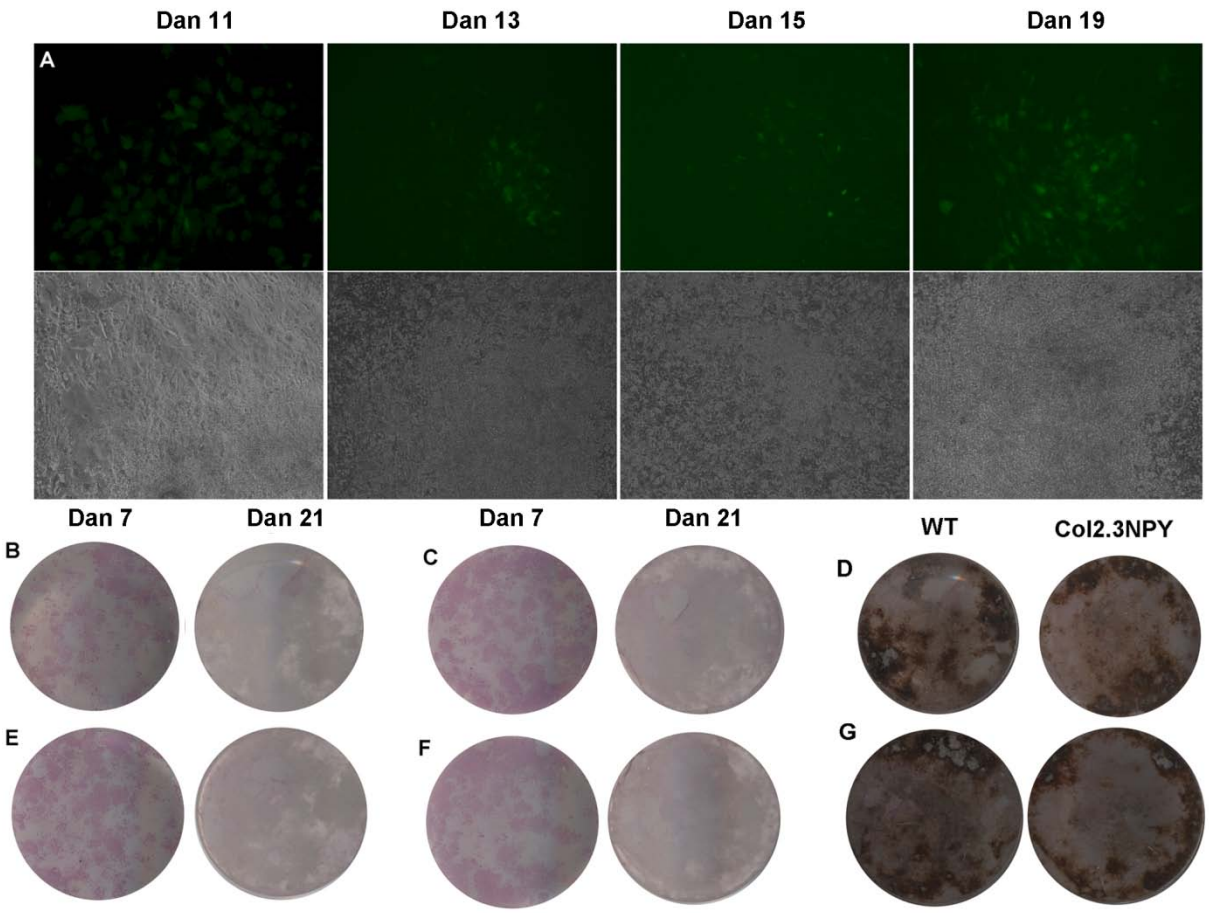


Slika 27. Analiza izražaja NPY-a, Y1 receptora i markera osteogeneze u mCOB kulturama. EIA kit pokazao je 2 puta veću koncentraciju NPY proteina u mediju mCOB kultura dobivenih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa u odnosu na kulture dobivene iz miševa divljeg tipa (**A**). Prikazana je standardna pogreška aritmetičke sredine od 3 kulture po grupi; *, $p<0,05$. Izolirana je RNA iz 21 dan starih mCOB kultura dobivenih iz transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa te je analiziran izražaj NPY-a (**B**), Y1 receptora (**B**) i markera osteogeneze (DMP-1, BSP, OC) (**C**). Analiza genskog izražaja pokazala je povećan izražaj NPY-a u kulturama dobivenima iz transgeničnih životinja u odnosu na izražaj u kulturama dobivenima iz miševa divljeg tipa (**B**). Izražaj Y1 receptora nije bio promijenjen (**B**). Analiza izražaja markera osteogeneze pokazala je smanjen izražaj DMP-1, BSP i OC (**C**). Prikazan je

jedan reprezentativan pokus (od 4 neovisna). Transkripcijske vrijednosti su normalizirane prema vrijednosti "housekeeping" GAPDH gena i relativne prema izražaju u kulturi dobivenoj iz miševa divljeg tipa.

4.6. Relativan izražaj NPY-a, Y1 receptora i markera osteogeneze u osteoblastima

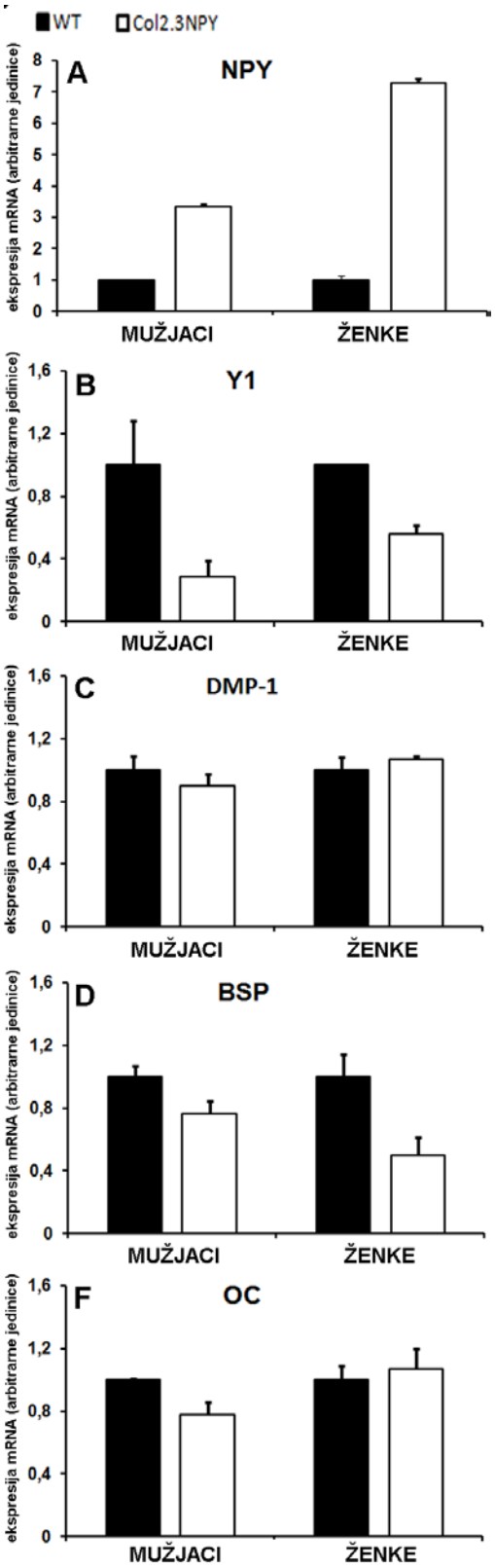
Stanice strome koštane srži (BMSC) uzgajane su 7 dana u mediju za rast stanica, nakon čega su slijedećih 14 dana rasle u diferencirajućem mediju. Fluorescentna mikroskopija pokazala je da nakon 11 dana pojedine stanice počinju izražavati GFP transgen u području novoformiranih nodula (Slika 28A). Kako su stanice bile više vremena u diferencirajućem mediju sve više je njih bilo GFP pozitivno te 19. dana veliki broj stanica unutar nodula je izražavao GFPtopaz transgen (Slika 28A). Nakon 21 dana izolirana je ukupna RNA iz kultura dobivenih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa te kultura dobivenih iz miševa divljeg tipa te su iste kulture obojane na aktivnost alkalne fosfataze i evaluirana je mineralizacija metodom von Kossa bojanja. Stanice strome koštane srži su skupljene i zasađene iz jednomjesečnih transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa. Ovim pokusima nije utvrđena razlika u aktivnosti alkalne fosfataze nakon 7 i 21 dana diferencijacije između kultura dobivenih iz mužjaka divljeg tipa (Slika 28B) i kultura dobivenih iz transgeničnih mužjaka (Slika 28C). Identični rezultati dobiveni su kod kultura izoliranih iz ženki divljeg tipa (Slika 28E) i kultura iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz ženki (Slika 28F). Kulture dobivene iz transgeničnih mužjaka (Slika 28D) i transgeničnih ženki (Slika 28G) nisu pokazale nikakve promjene u stupnju mineralizacije u usporedbi s kulturama dobivenima iz miševa divljeg tipa.



Slika 28. GFP izražaj, aktivnost alkalne fosfataze i stupanj mineralizacije u BMSC kulturama Matične stanice koštane srži rasle su u uvjetima osteoindukcije. Jedanaestog dana kulture, stanice unutar nodula započele su izražavati GFPtopaz te 19. dana kulture većina stanica unutar nodula je izražavala GFP transgen (**A**). Bojanje na alkalnu fosfatazu 7 i 21 dan starih kultura dobivenih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa nije pokazalo nikakvu razliku u aktivnosti alkalne fosfataze kod mužjaka (**B**, **C**) i ženki (**E**, **F**). Metodom von Kossa bojanja nije pronađena nikakva razlika u stupnju mineralizacije između BMSC kultura dobivenih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz mužjaka (**D**) i ženki (**G**) u odnosu na kulture dobivene iz divljeg tipa miševa iz istog legla.

Ovdje su prikazani rezultati jednog od tri neovisna pokusa. Procijenjen je relativni izražaj mRNA od slijedećih gena: neuropeptid Y, Y1 receptor, koštani sijaloprotein, osteokalcin i dentin-matrix protein-1. Slika 29 prikazuje relativni izražaj navedenih gena u osteoblastima nakon 21. dana kulture. Analiza kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu pokazala je da

je NPY 3 puta više izražen u BMSC kulturama dobivenih iz transgeničnih mužjaka u odnosu na kulture dobivene iz mužjaka divljeg tipa (Slika 29A). Još veća razlika u relativnom izražaju NPY mRNA (7 puta) primjećena je kod kultura dobivenih iz transgeničnih ženki u odnosu na kulture dobivene iz ženki divljeg tipa (Slika 29A). Primijećen je trend smanjenog relativnog izražaja Y1 receptora (Slika 29B) i BSP-a (Slika 29D) u kulturama dobivenih iz transgeničnih životinja oba spola u odnosu na kulture dobivene od miševa divljeg tipa. Sličan trend zamijećen je kod relativnog izražaja OC mRNA u kulturama dobivenih iz transgeničnih mužjaka, dok nikakva razlika nije zamijećena kod ženki (Slika 29F). Kulture dobivene iz transgeničnih mužjaka i ženki pokazale su nepromijenjen relativan izražaj DMP-1 mRNA u odnosu na kulture dobivene iz mužjaka i ženki divljeg tipa (Slika 29C).

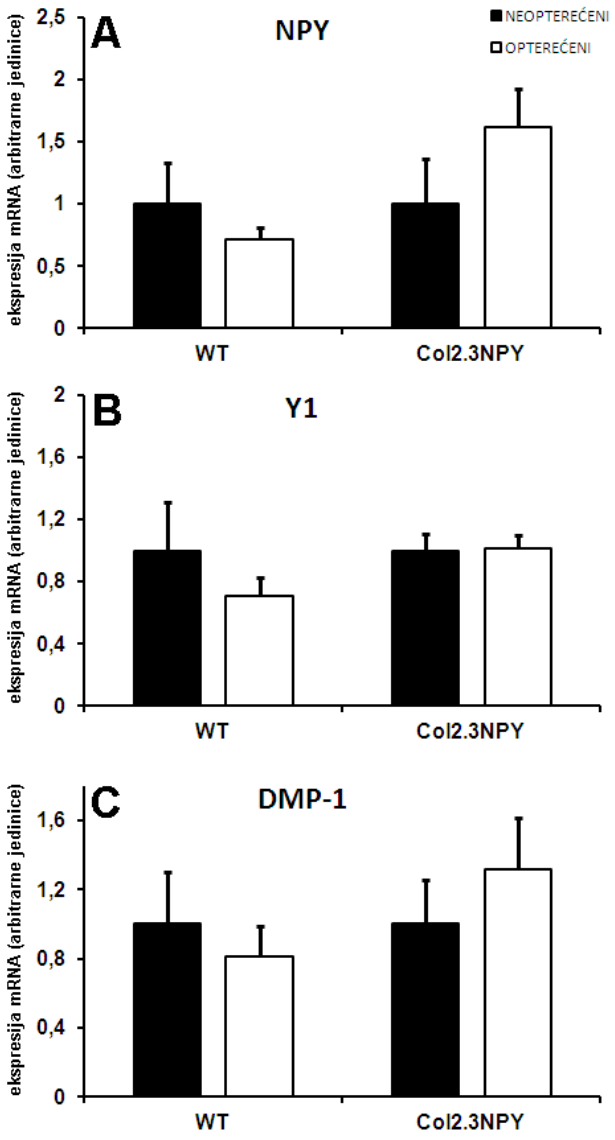


Slika 29. Analiza izražaja NPY-a, Y1 receptora i markera osteogeneze u BMSC kulturama metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu. RT-qPCR analiza

pokazala je povećan izražaj NPY-a u kulturama dobivenima iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa u odnosu na kulture dobivene iz divljeg tipa miševa (**A**). BMSC kulture transgeničnih mužjaka imale su smanjen izražaj Y1 receptora, (**B**), BSP-a (**D**), OC-a (**F**) u odnosu na BMSC kulture dobivene iz mužjaka divljeg tipa. Smanjen izražaj Y1 receptora (**B**) i BSP-a (**D**) zamijećen je u transgeničnih BMSC kulturama dobivenih iz ženki u odnosu na kulture dobivene iz ženki divljeg tipa. Izražaj OC-a nije bio promijenjen u kulturama dobivenima iz transgeničnih ženki (**F**). Transgenične kulture mužjaka i ženki nisu imale nikakve promijene u izražaju DMP-1 gena u odnosu na kulture divljeg tipa (**C**). Prikazan je reprezentativan pokus. Transkripcijske vrijednosti su normalizirane prema vrijednosti "housekeeping" GAPDH gena i relativne prema izražaju u kulturi dobivenoj iz miševa divljeg tipa.

4.7. NPY nije uključen u regulaciju Wnt signalnog puta

Jedan dan nakon mehaničkog opterećenja desne lakatne kosti, 3 mjeseca stari Col2.3NPY-ires-GFP topaz miševi i miševi divljeg tipa su eutanizirani. Izolirana je ukupna RNA iz mehanički opterećenih lakatnih kostiju, dok je RNA iz lijevih neopterećenih kostiju služila kao negativna kontrola. Pomoću kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu analiziran je izražaj NPY-a, Y1 receptora i DMP-1 gena. Aktivacijom Wnt signalnog puta dolazi do povećanog izražaja markera osteogeneze kao što je DMP-1, BSP i gen regulator fosfata homologan endopeptidazama na X kromosomu (PHEX, prema. engl. *phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked*) [274]. Nakon opterećenja lakatne kosti miševa divljeg tipa RT-qPCR analiza pokazala je trend smanjenog izražaja NPY-a (Slika 30A) i Y1 receptora (Slika 30B) u odnosu na lakatnu kost koja nije bila mehanički opterećena. Izražaj DMP-1 gena nije se mijenjao 24 sata nakon mehaničkog opterećenja u miševa divljeg tipa (Slika 30C). Kod opterećenja lakatne kosti transgeničnih miševa javlja se trend povećanog izražaja NPY-a (Slika 30A) u odnosu na laktnu kost koja nije bila mehanički opterećena. Naša analiza nije utvrdila promjene u izražaju Y1 receptora (Slika 30B) i DMP-1 gena (Slika 30C) nakon mehaničkog opterećenja lakatne kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa. Povećan izražaj NPY-a u transgeničnih miševa nakon mehaničkog opterećenja nije mijenjao izražaj DMP-1 gena, iz čega je zaključeno da NPY signalni put nije uključen u regulaciju DMP-1 izražaja preko Wnt signalnog puta.



Slika 30. Analiza genskog izražaja NPY-a, Y1 receptora i DMP-1 gena nakon 24 sata nakon mehaničkog opterećenja lakatne kosti metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu. Desne lakatne kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa bile su mehanički opterećene te je 24 sata nakon opterećenja izolirana ukupna RNA iz opterećenih lakatnih kostiju te iz lijevih neopterećenih (kontrola). RT-qPCR analiza genskog izražaja pokazala je trend smanjenja izražaja NPY-a (**A**) i Y1 receptora (**B**) nakon mehaničkog opterećenja u miševa divljeg tipa. Transgenični miševi nakon mehaničkog opterećenja imali su povećan izražaj NPY gena (**A**) dok se izražaj Y1 receptora nije mijenjao (**B**). Ovom analizom nisu utvrđene promijene u izražaju DMP-1 gena mehanički opterećenih lakatnih kostiju niti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa, niti miševa divljeg tipa (**C**).

5. RASPRAVA

5.1. Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševi imaju pojačanu izražaj NPY proteina u koštanom tkivu

Modelni organizam ovog istraživanja bili su transgenični miševi kod kojih je NPY pojačano izražen u koštanom tkivu pod kontrolom 2.3 kilobaznog proksimalnog dijela promotora alfa 1 lanca kolagena tipa 1. Pod kontrolom istog promotora bio je i gen za topaz inačicu GFP-a, koji je služio kao pokazatelj izražaja transgena. Histološka analiza prereza raznih tkiva fluorescentnim mikroskopom potvrdila je izražaj transgena u koštanom tkivu trabekularne kosti, čvrste kosti i kalvarije kod transgeničnih mužjaka i ženki. Preciznijim mikroskopiranjem uočena je zelena fluorescencija u osteoblastima i osteocitima. Ostala mikroskopirana tkiva, mozak, slezena, bubreg, jetra, koža, mokraćni mjehur i pluća, bila su negativna na zelenu fluorescenciju. Ovi rezultati potvrdili su da je NPY iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz gena izražen isključivo u koštanom tkivu i to u stanicama osteoblasta i osteocita.

Kako bi se potvrdio pojačan izražaj NPY-a na proteinskoj razini napravljeno je imunohistokemijsko bojanje prereza bedrene kosti transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa. Ova analiza potvrdila je prisutnost NPY proteina u osteocitima trabekularne i čvrste kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. Ovom metodom detekcije NPY proteina u koštanom tkivu bilo je nemoguće potvrditi pojačan izražaj NPY-a u transgeničnim životinjama u odnosu na životinje divljeg tipa. Nedavno je otkriveno da osteoblasti i osteociti izražavaju NPY [151, 152] te su ovi rezultati potvrdili prisutnost NPY proteina u stanicama koštanog tkiva.

Kako bi se utvrdila razlika u izražaju NPY proteina između transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa, izolirane se neonatalne kalvarije Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. Kako osteoblasti i osteociti ne formiraju NPY vezikule te je NPY vrlo brzo nakon sinteze oslobođen u međustanični prostor, usporili smo metabolizam stanica kalvarije tako što su kalvarije kultivirane 2 sata na sobnoj temperaturi te nakon toga odmah fiksirane. Na taj način pokušali smo usporiti otpuštanje NPY-a. Niti ova metoda nije dokazala razliku u izražaju NPY proteina između transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa.

Pojačan izražaj NPY-a u koštanom tkivu transgeničnih miševa potvrđen je metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu te pomoću RayBio Neuropeptide Enzyme Immunoassay kita. Od prije je poznato da stanice osteoblastne loze izražavaju NPY [151,

272] i ovi RT-qPCR rezultati potvrdili su da je NPY lokalno izražen u koštanom tkivu. RT-qPCR analiza pokazala je da je NPY 2.5 puta više izražen u koštanom tkivu transgeničnih mužjaka te 8 puta u koštanom tkivu transgeničnih ženki u odnosu na miševe divljeg tipa istog spola. Nakon translacije NPY mRNA nastaje pre-pro-NPY koji se cijepa pomoću nekoliko proteaza i biva posttranslacijski modificiran [150]. Značajna razlika u izražaju NPY-a između transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa koja je utvrđena RT-qPCR analizom nije potvrđena NPY EIA metodom. Ovom metodom utvrđeno je da transgenični mužjaci izražavaju 1.5 puta, a transgenične ženke 2 puta više NPY proteina u koštanom tkivu u odnosu na miševe divljeg tipa istog spola. Razlika u izražaju NPY proteina i izražaju NPY mRNA vjerojatno je posljedica nemogućnosti postranslacijske obrade neuobičajne količine pre-pro-NPY-a do biološki aktivnog amidiranog oblika NPY-a u osteoblastima i osteocitima.

NPY EIA metoda nije utvrdila nikakve razlike u količini serumskog NPY proteina između Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. Pojačan izražaj NPY proteina u koštanom tkivu transgeničnih životinja ne mijenja razinu NPY proteina u serumu takvih životinja, tako da su sve promjene koštanog metabolizma transgeničnih životinja posljedica pojačanog izražaja NPY-a u koštanom tkivu. Pojačano izražen NPY djeluje lokalno na koštani metabolizam i nema nikakav utjecaj na udaljena područja.

5.2. Pojačan izražaj NPY proteina u koštanom tkivu mijenja koštanu masu trabekularne i čvrste kosti

NPY inhibira stvaranje kosti tako što se veže na Y1 receptor u koštanom tkivu i inhibira diferencijaciju mezenhimskih stanica i aktivnost zrelih osteoblasta [150, 250]. Postavljeno je pitanje da li pojačan izražaj NPY proteina u koštanom tkivu ima utjecaj na izražaj Y1 receptora. RT-qPCR analiza pokazala je da je Y1 receptor izražen u koštanom tkivu te da pojačan izražaj NPY-a uzrokuje pojačan izražaj Y1 receptora u koštanom tkivu transgeničnih mužjaka i ženki. Prijašnja istraživanja *in vitro* [218] i *in vivo* [275] pokazala su da NPY negativno utječe na izražaj Y1 receptora. Naša *in vivo* istraživanja pokazala su pozitivnu korelaciju izražaja NPY-a i Y1 receptora.

Pokazano je da delecija Y2 receptora u zametnoj liniji te selektivna delecija Y2 receptora u hipotalamusu rezultira dvostrukim povećanjem mase trabekularne kosti [250]. Kako je poznato da MC3T3-E1 preosteoblastna stanična linija izražava Y2 receptor [218] te da su

kulture stanica strome negativne na Y2 izražaj [250], zanimao nas je potencijalan izražaj Y2 receptora u koštanom tkivu transgeničnih životinja i životinja divljeg tipa. RT-qPCR analizom utvrđeno je da Y2 receptor nije izražen u koštanom tkivu transgeničnih miševa, niti u koštanom tkivu miševa divljeg tipa. Kako Y2 receptor nije prisutan u koštanom tkivu, bilo kakve promjene u koštanom metabolizmu Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa, posljedica su aktivacije lokalnog Y1-NPY signalnog puta.

Analiza izražaja markera osteogeneze, osteokalcina, dentin-matrix proteina-1, koštanog sijaloproteina, osterixa i proteina „runt“, nije pokazala nikakve promjene u njihovom izražaju kod Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa u odnosu na miševe divljeg tipa istog spola iz istog legla. Pregradnja kostiju opada sa starenjem, a kako su sve pokusne životinje bile 2 ili 3 mjeseca stare, upravo njihova starost mogući je uzrok identičnog izražaja markera osteogeneze u koštanom tkivu transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa.

Unatoč rezultatima koji su pokazali nepromijenjen izražaj markera osteogeneze, povećan izražaj NPY-a u koštanom tkivu transgeničnih mužjaka i ženki rezultirao je smanjenjem udjela trabekularne kosti od 25% u odnosu na miševe divljeg tipa iz istog legla. Smanjenje udjela trabekularne kosti povezujemo s narušenom mikrostrukturom kosti transgeničnih životinja. Naime trabekule bedrene kosti transgeničnih životinja imale su smanjenu debljinu od gotovo 10% u odnosu na miševe divljeg tipa. Ostali mikro-CT parametri trabekularne kosti, broj trabekula i razmak između trabekula, nisu bili promijenjeni u Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa u odnosu na miševe divljeg tipa istog spola.

Povećan izražaj NPY proteina u transgeničnih miševa nije imao nikakav utjecaj na brzinu odlaganja minerala i brzinu stvaranja trabekularne kosti. Starenjem se usporava brzina odlaganja minerala [276], a kako su pokusni miševi bili stari od 2 do 3 mjeseca, moguće je da su razlike u brzini odlaganja minerala vidljive u ranijoj dobi.

Col2.3NPY-ires-GFPtopaz ženke imale su smanjenu debljinu korteksa od 6%, što je bilo u korelaciji s promjenama u brzini odlaganja minerala čvrste kosti. Naime, dinamička histomorfometrijska analiza je pokazala da transgenične ženke imaju smanjeni MAR od 6% u odnosu na ženke divljeg tipa, ali bez statističke značajne p vrijednosti (p=0,099). Isti parametri morfometrijskih promjena čvrste kosti u transgeničnih mužjaka nisu bili promijenjeni. Vrijednosti momenta inercije nisu pokazale promjene u čvrstoći čvrste kosti Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa u odnosu na miševe divljeg tipa.

U miševa s izbačenim genom za Y1 receptor dolazi do povećanja koštane mase [190]. Gonadektomijom $Y1^{-/-}$ mužjaka prikriva se anabolički fenotip ovakvih miševa dok kod ženki gonadektomija nema nikakav utjecaj na fenotip [277]. Jak utjecaj androgenog signaliziranja na Y1 signalni put može objasniti manje promjene mikro-CT parametara transgeničnih Col2.3NPY-ires-GFPtopaz mužjaka od promjena koje su detektirane kod transgeničnih ženki.

Važna uloga NPY-a u centralnoj kontroli koštanog metabolizma dokazana je pomoću mišjeg modela gdje je gen za NPY bio izbačen u zametnoj lozi, što je dovelo do povećanja koštane mase kod takvih miševa [244]. Povećan adenovirusni izražaj NPY-a u tkivu hipotalamusa takvih miševa, nije uspjela u potpunosti povratiti fenotip divljeg tipa miševa. Ovakvi rezultati otvorili su pitanje može li lokalno izražen NPY imati ulogu u homeostazi koštanog metabolizma. Ovo istraživanje pokazalo je da postoji lokalni NPY-Y1 signalni put, koji na lokalnoj razini inhibira koštani metabolizam, čija je direktna posljedica smanjenje koštane mase.

5.3. Kulture mišjih kalvarijskih stanica dobivenih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa imaju smanjenu mineralizaciju i smanjen izražaj markera osteogeneze

Mišje kalvarijske stanice izolirane su iz transgeničnih miševa i miševa divljeg tipa te su uzgajane 7 dana u mediju za rast stanica te dodatnih 14 dana u diferencirajućem mediju. Tijekom 14 dana diferencijacije kalvarijskih stanica, sve veći broj stanica izražavao je GFPtopaz transgen unutar formiranih nodula.

Kako bi se dokazao povećan izražaj NPY proteina u kulturama dobivenim iz transgeničnih miševa, evaluiran je njegov izražaj pomoću imunohistokemijskog bojanja i NPY EIA analizom. Imunohistokemijskim bojanjem detektiran je izražaj NPY proteina unutar novonastalih nodula mCOB kultura dobivenim iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz mladunaca i mladunaca divljeg tipa. Ova metoda bila je nedovoljno osjetljiva da bi se njome mogla utvrditi razlika u izražaju NPY proteina između ove dvije kulture. Već je spomenuto da osteoblasti nemaju vezikule u kojima bi se pohranio NPY. Nakon što se sintetizira NPY se otpušta van stanice te je zbog toga mjerena njegova koncentracija u diferencirajućem mediju 21. dana mCOB kulture. NPY EIA analiza takvog medija pokazala je 1.5 puta veći izražaj i otpuštanje NPY proteina u mCOB kulturama dobivenima iz transgeničnih mladunaca u odnosu na kulture dobivene iz mladunaca divljeg tipa.

RT-qPCR analiza izražaja NPY mRNA pokazala je da mCOB kulture dobivene iz transgeničnih životinja imaju 20 puta veći izražaj NPY gena u odnosu na mCOB kulture dobivene iz životinja divljeg tipa.

Time je utvrđeno da transgenične mCOB kulture pojačano izražavaju NPY transgen na mRNA i proteinskoj razini u odnosu na kulture mišjih kalvarijskih stanica dobivenih iz mladunaca divljeg tipa. Identični rezultati, gdje su RT-qPCR i NPY EIA analize pokazale puno veći izražaj NPY mRNA od izražaja NPY proteina, dobiveni su analizom koštanog tkiva transgeničnih miševa. Vjerojatno osteoblasti i osteociti u kojima dolazi do pojačanog izražaja NPY gena nisu u mogućnosti obraditi NPY prekursore do biološki aktivne forme NPY-a.

Kao direktna posljedica povećane koncentracije NPY proteina u mediju, javlja se 6 puta slabija mineralizacija transgeničnih mCOB kultura u odnosu na mCOB kulture dobivene iz mladunaca divljeg tipa. U ovim pokusima smanjena mineralizacija kao posljedica endogenog povećanja izražaja NPY proteina, odgovara rezultatima koji su dobiveni tretiranjem mCOB kultura egzogenim NPY-om. Naime, tretiranje mišjih kalvarijskih stanica egzogenim NPY proteinom rezultira smanjenom mineralizacijom tretiranih kultura u odnosu na netretirane kulture, a takve promjene praćene su smanjenim izražajem markera osteogeneze kao što je osteokalcin, dentin-matrix protein-1 i koštani sijaloprotein [152]. Bojanje na aktivnost alkalne fosfataze pokazalo je da pojačan izražaj NPY proteina u transgeničnim mCOB kulturama inhibira i smanjuje aktivnost alkalne fosfataze u odnosu na mCOB kulture dobivene iz miševa divljeg tipa. Ovakva promjena mineralizacije i aktivnosti alkalne fosfataze *in vitro* u skladu je sa smanjenim koštanim volumenom Col2.3NPY-ires-GFPtopaz mišjeg modela *in vivo*.

Kako bi se vidjelo da je smanjena mineralizacija transgeničnih mCOB kultura posljedica smanjenog izražaja markera osteogeneze, učinjena je RT-qPCR analiza. Povećan izražaj NPY-a uzrokovao je smanjen izražaj DMP-1 gena (3 puta), BSP gena (6 puta) i OC gena (22 puta). Ovakvi rezultati zrcalna su slika objavljenih istraživanja gdje su mCOB kulture dobivene iz $Y1^{-/-}$ miševa imale pojačan izražaj markera osteogeneze te visok stupanj mineralizacije [190].

Prema objavljenim rezultatima *in vitro* istraživanja, NPY ima važnu ulogu u negativnoj regulaciji izražaja Y1 receptora [218]. RT-qPCR analiza genskog izražaja Y1 receptora u mCOB kulturama nije utvrdila nikakve razlike u izražaju Y1 receptora između transgeničnih mCOB kultura i kultura koje su izolirane iz životinja divljeg tipa. Dok je pojačan izražaj

NPY-a bio u pozitivnoj korelaciji s izražajem Y1 receptora *in vivo*, takva korelacija nije zamijećena *in vitro*.

5.4. Pojačan izražaj NPY proteina u kulturama stanica strome koštane srži ne mijenja diferencijaciju osteoblasta

Stanice strome koštane srži nalaze se u šupljini koštane srži te mogu diferencirati u razne tipove stanica uključujući osteoblaste [2, 3, 278, 279]. BMSC uzgajane su 7 dana u mediju za rast te dodatnih 14 dana u diferencirajućem mediju.

Nediferencirane matične stanice Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa nisu izražavale GFPtopaz transgen. Nakon što je započeta njihova diferencijacija, sve više osteoblasta unutar novonastalih nodula bilo je zeleno. Izražaj GFPtopaz transgena dokaz je aktivnosti Col2.3 promotora i izražaja NPY transgena.

Bojanje na alkalnu fosfatazu 7. i 21. dana kulture nije utvrdilo nikakve razlike u aktivnosti aktivnosti alkalne fosfataze između BMSC dobivenih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i BMSC dobivenih iz miševa divljeg tipa. Kako je alkalna fosfataza marker rane diferencijacije osteoblasta, pokušano je utvrditi razliku u kapacitetu mineralizacije transgeničnih kultura i kultura divljeg tipa. Von Kossa bojanje srebrom je pokazalo da BMSC dobivene iz transgeničnih miševa nakon 21. dana kulture imaju jednaku sposobnost mineralizacije kao i BMSC dobivene iz miševa divljeg tipa. Odvojeno se radilo na stanicama strome koštane srži muških i ženskih transgeničnih Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa. Niti kod jednog spola nisu utvrđene nikakve razlike u aktivnosti alkalne fosfataze i stupnju mineralizacije između transgeničnih kultura i kultura divljeg tipa.

Analiza genskog izražaja 21 dan starih kultura metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu pokazala je da BMSC dobivene iz transgeničnih mužjaka i ženki izražavaju 3 odnosno 7 puta veću količinu NPY-a u odnosu na BMSC dobivene iz mužjaka i ženki divljeg tipa.

Delecija Y2 receptora u zametnoj liniji dovodi do smanjenog izražaja Y1 receptora u stanicama strome i koštanom tkivu, vjerojatno zbog nedostatka povratne inhibicije izražaja NPY-a te pretjerane stimulacije Y1 receptora [250]. Slični rezultati RT-qPCR analize dobiveni su i u ovom istraživanju. Y1 receptor je 2-3 puta manje izražen u kulturama

dobivenima iz transgeničnih miševa u odnosu na kulture dobivene iz divljeg tipa miševa. Moguće je da povećan izražaj NPY proteina u transgeničnim kulturama direktno ili indirektno smanjuje izražaj Y1 receptora. Analiza genskog izražaja Y1 receptora *in vivo* pokazala je da povećan izražaj NPY-a uzrokuje i povećan izražaj Y1 receptora.

Razlika u *in vivo* i *in vitro* promjenama genskog izražaja Y1 receptora prilikom pojačanog izražaja NPY-a posljedica je razlike uvjeta u kojima matične stanice koštane srži diferenciraju. Koštani milje je vrlo složena okolina u kojem matične stanice diferenciraju te je veliki broj raznih faktora i drugih NPY receptora uključen u NPY signaliziranje dok kod *in vitro* pokusa stanice rastu i diferenciraju u kontroliranim uvjetima. Dva *in vitro* modela, BMSC i mCOB, korištena u ovom istraživanju pokazala su različite modele izražaja Y1 receptora u uvjetima pojačanog izražaja NPY proteina. Moguće je da NPY protein ima jači utjecaj na izražaj Y1 receptora kod slabije diferenciranih stanica kao što su stanice strome koštane srži te tijekom diferencijacije njegov utjecaj opada, tako da NPY ima manji utjecaj na izražaj Y1 receptora u diferenciranim mišjim kalvarijskim stanicama.

Analizom izražaja markera osteogeneze 21.dana kulture utvrđeno je da stanice strome koštane srži dobivene iz transgeničnih miševa izražavaju manju količinu koštanog sialoproteina u odnosu na kulture dobivene iz miševa divljeg tipa. Identični rezultati dobiveni su kod BMSC kultura dobivenih iz mužjaka i ženki. Analiza izražaja osteokalcina pokazala je da kulture stanica koštane srži dobivene iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz muških miševa imaju trend smanjenja njegovog izražaja dok kod kultura dobivenih iz transgeničnih ženki pojačan izražaj NPY-a nije imao nikakav utjecaj na njegov izražaj. Relativan izražaj DMP-1 mRNA bio je nepromijenjen u BMSC kulturama koje su pojačano izražavale NPY.

Promjene u izražaju markera osteogeneze bile su minimalne u BMSC kulturama, ako ih usporedimo s promjenama koje su uočene kod mCOB kultura. Pojačan izražaj NPY-a nije mijenjao izražaj Y1 receptora u mCOB kulturama. NPY protein vezao se na Y1 receptore te je na taj način smanjio izražaj markera osteogeneze, što je dovelo do oslabljene mineralizacije i aktivnosti alkalne fosfataze. Kako je izražaj Y1 receptora u BMSC kulturama bio smanjen zbog pojačanog izražaja NPY-a, iako u suvišku, sve molekule NPY-a nisu se vezale na svoje receptore te vjerojatno iz tog razloga nije došlo do bitnih promjena u genskom izražaju markera osteogeneze, stupnju mineralizacije i aktivnosti alkalne fosfataze.

Ovo istraživanje je potvrdilo da je Y1 receptor jedini izražen receptor u koštanom tkivu. Afinitet njegovog vezivanja na NPY protein te biološka aktivnost opada skraćivanjem N kraja

NPY proteina (NPY_{2-36}, NPY_{3-36}, NPY_{13-36}) [203]. Primarnu ulogu u cijepanju NPY proteina ima aminopeptidaza P, metaloproteaza koja hidrolizira peptidnu vezu između prve i druge aminokiseline na N kraju pri čemu nastaje NPY_{2-36} [139]. NPY_{2-36} se dodatno cijepa dipeptidil peptidazom IV, serinskom peptidazom čijim se djelovanjem otpušta N terminalni dipeptid i nastaje NPY_{3-36} [280]. Kinetičke studije su pokazale da se NPY_{1-36} vrlo brzo u serumu cijepa pomoću dipeptidil peptidaze IV i nešto sporije pomoću aminopeptidaze P. Kao rezultat je smanjeni afinitet cijepanog NPY-a za vezivanje na Y1 receptor. NPY_{3-36} se dodatno cijepa kallikreinom iz plazme pri čemu nastaje krnji NPY_{3-35} koji se ne veže na niti jedan od NPY receptora [281].

Svi mediji korišteni u *in vitro* pokusima sadržavali su fetalni goveđi serum koji sadrži proteaze koje cijepaju NPY. Kako se Y1 receptor najvećim afinitetom veže na NPY_{1-36} [192], vjerojatno se izražen NPY vrlo brzo cijepao u mediju s FBS-om i na taj se način smanjio njegov afinitet za vezivanje na Y1 receptor. Stanice strome koštane srži ne izražavaju NPY transgen čiji je izražaj pod kontrolom Col2.3 promotora sve dok ne započne njihova osteodiferencijacija. Mišje kalvarijske stanice su diferencirani osteoblasti kod kojih je Col2.3 promotor aktivan tako da takve stanice već na samom početku kulture izražavaju NPY. Upravo razlika u vremenu u kojem se kod ova dva *in vitro* modela aktivira Col2.3 promotor, a i sama količina izraženog NPY-a može objasniti zašto NPY ima snažan utjecaj na izražaj markera osteogeneze, mineralizaciju i aktivnost alkalne fosfataze u mCOB kulturama, dok takve promjene nisu primijećene u BMSC kulturama. Kako mišje kalvarijske stanice izražavaju NPY od prvog dana uspostavljanja kulture, vjerojatno u mediju postoji NPY u suvišku kojeg serumske proteaze ne uspijevaju u potpunosti pocijepati. Takav nepocijepani NPY visokim se afinitetom vezao na Y1 receptor. Stanice strome koštane srži započinju izražavati transgen tek nakon osteoindukcije te zbog manje količine izlučenog NPY-a serumske proteaze vjerojatno većinu izlučenog NPY-a cijepaju i time smanjuju njegov afinitet vezivanja na Y1 receptor.

5.5. NPY nije modulator Wnt signalnog puta

Do danas je otkriveno nekoliko proteina koji sudjeluju u Wnt signalnom putu te je pokazano da imaju bitnu ulogu u regulaciji koštanog metabolizma [282]. Wnt protein, kojeg luči veliki broj staničnih tipova, veže se na Frizzled receptor (na njegovu transmembransku domenu), koji je vezan na svoj koreceptor LRP5. Ako na receptor nije vezan Wnt protein,

unutarstanična glikogen sintaza kinaza (GSK)3 fosforilira beta-katenin i on se nakon toga ubikvitinira i razgradi u proteosomu. Kada se Wnt veže na svoj receptor , fosforilira se i na taj način aktivira Dishevelled (Dsh). Takav aktivirani Dsh inhibira aktivnost GSK3 prilikom čega se otpušta Axin te oslobađa beta-katenin. Beta-katenin odlazi u staničnu jezgru, veže se na TCF transkripcijske faktore te povećava izražaj markera osteogeneze kao što je Dmp-1, Phex i Bsp [274]. Dickkopf (Dkk) protein i Sclerostin vežu se na LRP5 i inhibiraju Wnt signalni put [282].

Pokusi mehaničkog opterećenja lakatne kosti, gdje je analiziran izražaj NPY-a, Y1 receptora i DMP-1, pokazali su različite trendove promjena genskog izražaja prilikom mehaničkog opterećenja Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa i miševa divljeg tipa, iako nisu uspjeli doseći statistički značajne vrijednosti. *In vitro* studije pokazale su da mehanički stres smanjuje izražaj NPY i DMP-1 mRNA [152]. Ovo istraživanje pokazalo je da mehaničko opterećenje lakatne kosti dovodi do smanjenog izražaja NPY-a i Y1 receptora, dok nikakve promjene nisu viđene u izražaju DMP-1 mRNA u miševa divljeg tipa. Opterećenje lakatne kosti transgeničnih miševa nije utjecalo na izražaj Y1 receptora. Kako je NPY transgen pod kontrolom Col2.3 promotora, a poznato je da mehaničko opterećenje vodi do pojačanog izražaja alfa 1 lanca kolagena tipa 1 [283], RT-qPCR analiza pokazala je pojačan izražaj NPY mRNA nakon mehaničkog opterećenja lakatne kosti transgeničnih miševa. Ukoliko bi NPY bio uključen u Wnt signalni put, povećan izražaj NPY proteina, rezultirao bi smanjenim izražajem DMP-1 gena. Ovaj pokus nije utvrdio promjene izražaja DMP-1 gena, iako je nakon mehaničkog opterećenja uslijedio pojačani izražaj NPY-a. Iz ovih rezultata zaključujem da NPY signalni put ne sudjeluje u kontroli Wnt signalnog puta.

Novi mišji model proučen u ovoj studiji, omogućio je opisati i demonstrirati ulogu lokalno izraženog neuropeptida Y u kontroli koštane pregradnje. Prezentirani rezultati pokazali su da osteoblasti imaju smanjeni mineralizacijski potencijal u uvjetima povećanog izražaja NPY-a *in vivo* i *in vitro*. Promjene u lokalnom izražaju NPY proteina bile su dovoljne kao bi došlo do promijene u koštanoj masi kod oba spola Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa. Promjene koštanog metabolizma u Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa nisu bile drastične kao promjene u miševa s povećanim izražajem NPY proteina u tkivu hipotalamusa [244]. Usporedbom ova dva mišja modela može se zaključiti da centralna uloga NPY-a u regulaciji koštanog metabolizma ima glavnu ulogu u kontroli NPY ovisne koštane pregradnje. Pojačan izražaj NPY-a u tkivu hipotalamusa miševa sa izbačenim genom za NPY, ne uspijeva u potpunosti korigirati fenotip visoke koštane mase [244], što ukazuje na postojanje lokalnog NPY

signalnog puta. Ovim modelom dokazano je postojanje takvog signalnog puta, gdje lokalno izražen NPY u koštanom tkivu ima važnu ulogu u regulaciji koštane mase. Osteoblasti i osteociti izražavaju NPY [151, 152], no postoji veliki broj drugih izvora NPY-a kao što je simpatički živčani sustav [284] i glatke mišićne stanice krvnih žila [147]. Upravo NPY i iz ovih izvora sudjeluje u lokalnoj regulaciji koštanog metabolizma.

Col2.3NPY-ires-GFPtopaz mišji model uspio je dokazati postojanje NPY-Y1 signalnog puta *in vitro* i *in vivo*, gdje se lokalno eskprimiran NPY veže na jedini izraženi receptor u koštanom tkivu, Y1 receptor, te djeluje inhibirajući na koštani metabolizam. NPY signalni put ne modulira Wnt signalni put te bi daljnja istraživanja trebala objasniti mehanizam, kojim lokalno izražen NPY mijenja koštani metabolizam.

6. ZAKLJUČCI

- Klonirani su Col2.3NPY-ires-GFPtopaz transgenični miševi kod kojih je NPY pojačano izražen u koštanom tkivu pod kontrolom 2.3 kilobaznog proksimalnog dijela promotora alfa 1 lanca kolagena tipa 1. Transgen je prisutan u osteoblastima i osteocitima tkiva trabekularne kosti, čvrste kosti i kalvarije. Zelena fluorescencija nije zamijećena u nekoštanim tkivima.
- Transgenični miševi imali su statistički značajan povećan izražaj NPY mRNA i NPY proteina u koštanom tkivu te pojačan izražaj NPY-a u kostima nije mijenjao razinu cirkulirajućeg NPY proteina.
- Pojačan izražaj NPY-a u koštanom tkivu transgeničnih mužjaka i ženki doveo je do smanjenja udjela trabekularne kosti od 25% u odnosu na miševe divljeg tipa. Analiza koštane mikrostrukture pokazala je smanjenje debljine trabekularne kosti od 10% Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa.
- Parametri morfometrijskih promjena čvrste kosti nisu značajno promijenjeni u transgeničnih miševa. Transgenične ženke imale su 6% smanjenu debljinu korteksa. Brzina odlaganja minerala bila 13% sporija u transgeničnih ženki iako rezultati ne uspijevaju doseći vrijednosti koje bi bile statistički značajne.
- Povećan izražaj NPY-a u kulturama mišjih kalvarijskih stanica dobivenih iz Col2.3NPY-ires-GFPtopaz miševa rezultira 6 puta smanjenim mineralizirajućim potencijalom koji je praćen smanjenim izražajem markera osteogeneze (BSP, OC, DMP-1) i smanjenom aktivnošću alkalne fosfataze
- Kulture stanica strome koštane srži dobivene iz transgeničnih životinja nisu pokazale nikakve razlike u stupnju mineralizacije, aktivnosti alkalne fosfataze i izražaju markera osteogeneze u odnosu na kulture dobivene iz miševa divljeg tipa.
- Metodom mehaničkog opterećenja lakatne kosti utvrđeno je da NPY nije uključen u regulaciju Wnt signalnog puta.

7. LITERATURA

1. Lee, N.J. and H. Herzog, *NPY regulation of bone remodelling.* Neuropeptides, 2009. **43**(6): p. 457-63.
2. Grigoriadis, A.E., J.N. Heersche, and J.E. Aubin, *Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone.* J Cell Biol, 1988. **106**(6): p. 2139-51.
3. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.* Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
4. Hughes, F.J., et al., *Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation.* Periodontol 2000, 2006. **41**: p. 48-72.
5. Anderson, H.C., *Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage.* J Cell Biol, 1969. **41**(1): p. 59-72.
6. Akisaka, T. and C.V. Gay, *The plasma membrane and matrix vesicles of mouse growth plate chondrocytes during differentiation as revealed in freeze-fracture replicas.* Am J Anat, 1985. **173**(4): p. 269-86.
7. Ali, S.Y., S.W. Sajdera, and H.C. Anderson, *Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1970. **67**(3): p. 1513-20.
8. Ducy, P., et al., *Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice.* Nature, 1996. **382**(6590): p. 448-52.
9. Wu, J.Y., D.T. Scadden, and H.M. Kronenberg, *Role of the osteoblast lineage in the bone marrow hematopoietic niches.* J Bone Miner Res, 2009. **24**(5): p. 759-64.
10. Tokoyoda, K., et al., *Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development.* Immunity, 2004. **20**(6): p. 707-18.
11. Zhu, J., et al., *Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells.* Blood, 2007. **109**(9): p. 3706-12.
12. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche.* Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
13. Jung, Y., et al., *Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing.* Bone, 2006. **38**(4): p. 497-508.
14. Hadjidakis, D.J. and Androulakis, II, *Bone remodeling.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1092**: p. 385-96.
15. Ducy, P., et al., *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.* Cell, 1997. **89**(5): p. 747-54.
16. Yoshida, C.A., et al., *Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog.* Genes Dev, 2004. **18**(8): p. 952-63.
17. Komori, T., et al., *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts.* Cell, 1997. **89**(5): p. 755-64.
18. Nakashima, K., et al., *The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.* Cell, 2002. **108**(1): p. 17-29.
19. Yang, X., et al., *ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome.* Cell, 2004. **117**(3): p. 387-98.
20. Stein, G.S., et al., *Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation.* Physiol Rev, 1996. **76**(2): p. 593-629.
21. Lynch, M.P., et al., *Apoptosis during bone-like tissue development in vitro.* J Cell Biochem, 1998. **68**(1): p. 31-49.

22. Zhou, G., et al., *Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(50): p. 19004-9.
23. Franceschi, R.T., et al., *Transcriptional regulation of osteoblasts.* Ann N Y Acad Sci, 2007. **1116**: p. 196-207.
24. Manolagas, S.C., *Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis.* Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 115-37.
25. Noble, B.S., et al., *Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone.* Bone, 1997. **20**(3): p. 273-82.
26. Jilka, R.L., et al., *Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines.* J Bone Miner Res, 1998. **13**(5): p. 793-802.
27. Li, M., et al., *Histochemical evidence of the initial chondrogenesis and osteogenesis in the periosteum of a rib fractured model: implications of osteocyte involvement in periosteal chondrogenesis.* Microsc Res Tech, 2004. **64**(4): p. 330-42.
28. Hong, J.H., et al., *TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation.* Science, 2005. **309**(5737): p. 1074-8.
29. Maeda, S., et al., *Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells.* EMBO J, 2004. **23**(3): p. 552-63.
30. Hughes, F.J., et al., *The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro.* Endocrinology, 1995. **136**(6): p. 2671-7.
31. Canalis, E., M. Centrella, and T. McCarthy, *Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro.* J Clin Invest, 1988. **81**(5): p. 1572-7.
32. Naganawa, T., et al., *In vivo and in vitro comparison of the effects of FGF-2 null and haplo-insufficiency on bone formation in mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(2): p. 490-8.
33. Canalis, E. and L.G. Raisz, *Effect of fibroblast growth factor on cultured fetal rat calvaria.* Metabolism, 1980. **29**(2): p. 108-14.
34. Graves, D.T., et al., *The potential role of platelet-derived growth factor as an autocrine or paracrine factor for human bone cells.* Connect Tissue Res, 1989. **23**(2-3): p. 209-18.
35. Hughes, F.J., J.E. Aubin, and J.N. Heersche, *Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta.* Bone Miner, 1992. **19**(1): p. 63-74.
36. Lorenzo, J.A., et al., *Comparison of the bone-resorbing activity in the supernatants from phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear cells with that of cytokines through the use of an antiserum to interleukin 1.* Endocrinology, 1987. **121**(3): p. 1164-70.
37. Canalis, E., *Interleukin-1 has independent effects on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis in cultures of rat calvariae.* Endocrinology, 1986. **118**(1): p. 74-81.
38. Taguchi, Y., et al., *Interleukin-6-type cytokines stimulate mesenchymal progenitor differentiation toward the osteoblastic lineage.* Proc Assoc Am Physicians, 1998. **110**(6): p. 559-74.
39. Gowen, M., B.R. MacDonald, and R.G. Russell, *Actions of recombinant human gamma-interferon and tumor necrosis factor alpha on the proliferation and osteoblastic characteristics of human trabecular bone cells in vitro.* Arthritis Rheum, 1988. **31**(12): p. 1500-7.
40. Nanes, M.S., W.M. McKoy, and S.J. Marx, *Inhibitory effects of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis by rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8).* Endocrinology, 1989. **124**(1): p. 339-45.

41. Eriksen, E.F., et al., *Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells.* Science, 1988. **241**(4861): p. 84-6.
42. Colvard, D.S., et al., *Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(3): p. 854-7.
43. Darwish, H.M. and H.F. DeLuca, *Recent advances in the molecular biology of vitamin D action.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1996. **53**: p. 321-44.
44. Kindmark, A., et al., *Reverse transcription-polymerase chain reaction assay demonstrates that the 9-cis retinoic acid receptor alpha is expressed in human osteoblasts.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. **192**(3): p. 1367-72.
45. Frost, H.M., *In vivo osteocyte death.* J Bone Joint Surg Am, 1960. **42-A**: p. 138-43.
46. Marotti, G., *The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition.* Ital J Anat Embryol, 1996. **101**(4): p. 25-79.
47. Liu, F., L. Malaval, and J.E. Aubin, *The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity.* Exp Cell Res, 1997. **232**(1): p. 97-105.
48. Banks, W.J., *The ossification process of the developing antler in the white-tailed deer (Odocoileus virginianus).* Calcif Tissue Res, 1974. **14**(4): p. 257-74.
49. Knothe Tate, M.L., et al., *The osteocyte.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(1): p. 1-8.
50. Dudley, H.R. and D. Spiro, *The Fine Structure of Bone Cells.* J Biophys Biochem Cytol, 1961. **11**(3): p. 627-49.
51. Palumbo, C., et al., *Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes.* Acta Anat (Basel), 1990. **137**(4): p. 350-8.
52. Franz-Odendaal, T.A., B.K. Hall, and P.E. Witten, *Buried alive: how osteoblasts become osteocytes.* Dev Dyn, 2006. **235**(1): p. 176-90.
53. Bonewald, L.F. and M.L. Johnson, *Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling.* Bone, 2008. **42**(4): p. 606-15.
54. Li, X., et al., *Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling.* J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19883-7.
55. van Bezooijen, R.L., et al., *Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist.* J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 805-14.
56. Burger, E.H., J. Klein-Nulend, and T.H. Smit, *Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal.* J Biomech, 2003. **36**(10): p. 1453-9.
57. Turner, C.H., et al., *Mechanobiology of the skeleton.* Sci Signal, 2009. **2**(68): p. pt3.
58. Civitelli, R., *Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage.* Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 188-92.
59. Jiang, J.X., A.J. Siller-Jackson, and S. Burra, *Roles of gap junctions and hemichannels in bone cell functions and in signal transmission of mechanical stress.* Front Biosci, 2007. **12**: p. 1450-62.
60. Kwiecinski, G.G., L. Krook, and W.A. Wimsatt, *Annual skeletal changes in the little brown bat, Myotis lucifugus lucifugus, with particular reference to pregnancy and lactation.* Am J Anat, 1987. **178**(4): p. 410-20.
61. Steinberg, B., I.J. Singh, and O.G. Mitchell, *The effects of cold-stress. Hibernation, and prolonged inactivity on bone dynamics in the golden hamster, Mesocricetus auratus.* J Morphol, 1981. **167**(1): p. 43-51.
62. Tazawa, K., et al., *Osteocytic osteolysis observed in rats to which parathyroid hormone was continuously administered.* J Bone Miner Metab, 2004. **22**(6): p. 524-9.
63. Haller, A.C. and M.L. Zimny, *Effects of hibernation on interradicular alveolar bone.* J Dent Res, 1977. **56**(12): p. 1552-7.

64. Frost, H.M., *Bone remodelling dynamics.* Thomas Publishers, 1963.
65. Tomkinson, A., et al., *The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis.* J Bone Miner Res, 1998. **13**(8): p. 1243-50.
66. Tomkinson, A., et al., *The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone.* J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(9): p. 3128-35.
67. Kousteni, S., et al., *Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity.* Cell, 2001. **104**(5): p. 719-30.
68. Weinstein, R.S., et al., *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone.* J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 274-82.
69. Weinstein, R.S., R.W. Nicholas, and S.C. Manolagas, *Apoptosis of osteocytes in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the hip.* J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(8): p. 2907-12.
70. Bilezikian, J.P., Raisz, L.G., Rodan, G.A., *Principles of Bone Biology.* 2002(2nd edition): p. 151-168.
71. Bellido, T., et al., *Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity.* J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26328-32.
72. Plotkin, L.I., S.C. Manolagas, and T. Bellido, *Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels.* J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8648-57.
73. Walker, D.G., *Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells.* Science, 1975. **190**(4216): p. 784-5.
74. Kahn, A.J. and D.J. Simmons, *Investigation of cell lineage in bone using a chimaera of chick and quial embryonic tissue.* Nature, 1975. **258**(5533): p. 325-7.
75. Hayman, A.R., et al., *Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis.* Development, 1996. **122**(10): p. 3151-62.
76. Malone, J.D., et al., *Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents.* J Cell Biol, 1982. **92**(1): p. 227-30.
77. Yu, X., P. Collin-Osdoby, and P. Osdoby, *SDF-1 increases recruitment of osteoclast precursors by upregulation of matrix metalloproteinase-9 activity.* Connect Tissue Res, 2003. **44 Suppl 1**: p. 79-84.
78. Delaisse, J.M., et al., *Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities.* Microsc Res Tech, 2003. **61**(6): p. 504-13.
79. Ross, F.P. and S.L. Teitelbaum, *alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology.* Immunol Rev, 2005. **208**: p. 88-105.
80. Vaananen, K., *Mechanism of osteoclast mediated bone resorption--rationale for the design of new therapeutics.* Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(7): p. 959-71.
81. Miyazaki, T., et al., *Src kinase activity is essential for osteoclast function.* J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17660-6.
82. Baron, R., *Molecular mechanisms of bone resorption: therapeutic implications.* Rev Rhum Engl Ed, 1996. **63**(10): p. 633-8.
83. Holtrop, M.E. and G.J. King, *The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications.* Clin Orthop Relat Res, 1977(123): p. 177-96.
84. Vaes, G., *Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments on the formation, activation, and mode of action of osteoclasts.* Clin Orthop Relat Res, 1988(231): p. 239-71.

85. Gowen, M., et al., *Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization.* J Bone Miner Res, 1999. **14**(10): p. 1654-63.
86. Drake, F.H., et al., *Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts.* J Biol Chem, 1996. **271**(21): p. 12511-6.
87. Bar-Shavit, Z., *The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell.* J Cell Biochem, 2007. **102**(5): p. 1130-9.
88. Stenbeck, G. and M.A. Horton, *A new specialized cell-matrix interaction in actively resorbing osteoclasts.* J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 9)**: p. 1577-87.
89. Tinkler, S.M., et al., *Formation of osteoclasts from blood monocytes during 1 alpha-OH Vit D-stimulated bone resorption in mice.* J Anat, 1981. **133**(Pt 3): p. 389-96.
90. Miyamoto, T., et al., *Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors.* Blood, 2001. **98**(8): p. 2544-54.
91. Arai, F., et al., *Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors.* J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1741-54.
92. Tolar, J., S.L. Teitelbaum, and P.J. Orchard, *Osteopetrosis.* N Engl J Med, 2004. **351**(27): p. 2839-49.
93. Yoshida, H., et al., *The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene.* Nature, 1990. **345**(6274): p. 442-4.
94. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.* Cell, 1997. **89**(2): p. 309-19.
95. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation.* Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.
96. Dewhirst, F.E., et al., *Purification and partial sequence of human osteoclast-activating factor: identity with interleukin 1 beta.* J Immunol, 1985. **135**(4): p. 2562-8.
97. Walsh, M.C., et al., *Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism.* Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 33-63.
98. Anderson, D.M., et al., *A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function.* Nature, 1997. **390**(6656): p. 175-9.
99. Darnay, B.G., et al., *Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase.* J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20551-5.
100. Galibert, L., et al., *The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily.* J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34120-7.
101. Wong, B.R., et al., *The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor.* J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28355-9.
102. Wong, B.R., et al., *TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src.* Mol Cell, 1999. **4**(6): p. 1041-9.
103. Naito, A., et al., *Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice.* Genes Cells, 1999. **4**(6): p. 353-62.
104. Lomaga, M.A., et al., *TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling.* Genes Dev, 1999. **13**(8): p. 1015-24.
105. Kim, N., et al., *Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis.* J Exp Med, 2005. **202**(5): p. 589-95.
106. Gohda, J., et al., *RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis.* EMBO J, 2005. **24**(4): p. 790-9.

107. Kobayashi, N., et al., *Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis.* EMBO J, 2001. **20**(6): p. 1271-80.
108. Takayanagi, H., et al., *T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma.* Nature, 2000. **408**(6812): p. 600-5.
109. Asagiri, M. and H. Takayanagi, *The molecular understanding of osteoclast differentiation.* Bone, 2007. **40**(2): p. 251-64.
110. Takayanagi, H., *Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(4): p. 292-304.
111. Schneeweis, L.A., D. Willard, and M.E. Milla, *Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor activator of NF-kappaB ligand.* J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41155-64.
112. Glass, D.A., 2nd and G. Karsenty, *In vivo analysis of Wnt signaling in bone.* Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2630-4.
113. Glass, D.A., 2nd, et al., *Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation.* Dev Cell, 2005. **8**(5): p. 751-64.
114. Kieslinger, M., et al., *EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts.* Dev Cell, 2005. **9**(6): p. 757-67.
115. Coetzee, M. and M.C. Kruger, *Osteoprotegerin-receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio: a new approach to osteoporosis treatment?* South Med J, 2004. **97**(5): p. 506-11.
116. Hofbauer, L.C., et al., *The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption.* J Bone Miner Res, 2000. **15**(1): p. 2-12.
117. Olsen, B.R., A.M. Reginato, and W. Wang, *Bone development.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 191-220.
118. Mundlos, S. and B.R. Olsen, *Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways.* FASEB J, 1997. **11**(2): p. 125-32.
119. Karsenty, G., *The complexities of skeletal biology.* Nature, 2003. **423**(6937): p. 316-8.
120. Erlebacher, A., et al., *Toward a molecular understanding of skeletal development.* Cell, 1995. **80**(3): p. 371-8.
121. Yamaguchi, A., T. Komori, and T. Suda, *Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1.* Endocr Rev, 2000. **21**(4): p. 393-411.
122. St-Jacques, B., M. Hammerschmidt, and A.P. McMahon, *Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation.* Genes Dev, 1999. **13**(16): p. 2072-86.
123. Vortkamp, A., et al., *Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein.* Science, 1996. **273**(5275): p. 613-22.
124. Linsenmayer, T.F., et al., *Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analyses of mRNAs and proteins.* Development, 1991. **111**(1): p. 191-6.
125. Fridenshtein, A., *[Osteogenic stem cells of the bone marrow]*. Ontogenez, 1991. **22**(2): p. 189-97.
126. Tonna, E.A. and E.P. Cronkite, *An autoradiographic study of periosteal cell proliferation with tritiated thymidine.* Lab Invest, 1962. **11**: p. 455-62.
127. Tenenbaum, H.C. and J.N. Heersche, *Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro.* Endocrinology, 1985. **117**(5): p. 2211-7.
128. Urist, M.R., *Bone: formation by autoinduction.* Science, 1965. **150**(3698): p. 893-9.
129. Petrtyl, M., J. Hert, and P. Fiala, *Spatial organization of the haversian bone in man.* J Biomech, 1996. **29**(2): p. 161-9.

130. Parfitt, A.M., *Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone.* J Cell Biochem, 1994. **55**(3): p. 273-86.
131. Harada, S. and G.A. Rodan, *Control of osteoblast function and regulation of bone mass.* Nature, 2003. **423**(6937): p. 349-55.
132. Teti, A., *Bone development: overview of bone cells and signaling.* Curr Osteoporos Rep, 2011. **9**(4): p. 264-73.
133. Chapuy, M.C., et al., *Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women.* N Engl J Med, 1992. **327**(23): p. 1637-42.
134. Britto, J.M., et al., *Osteoblasts mediate thyroid hormone stimulation of osteoclastic bone resorption.* Endocrinology, 1994. **134**(1): p. 169-76.
135. Srivastava, S., et al., *Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation.* J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 8836-40.
136. Gehlert, D.R., *Multiple receptors for the pancreatic polypeptide (PP-fold) family: physiological implications.* Proc Soc Exp Biol Med, 1998. **218**(1): p. 7-22.
137. Tatemoto, K., M. Carlquist, and V. Mutt, *Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide.* Nature, 1982. **296**(5858): p. 659-60.
138. Kimmel, J.R., L.J. Hayden, and H.G. Pollock, *Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone.* J Biol Chem, 1975. **250**(24): p. 9369-76.
139. Gehlert, D.R., *Introduction to the reviews on neuropeptide Y.* Neuropeptides, 2004. **38**(4): p. 135-40.
140. Fuhlendorff, J., et al., *[Leu31, Pro34]neuropeptide Y: a specific Y1 receptor agonist.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 182-6.
141. Blundell, T.L., et al., *X-ray analysis (1. 4-A resolution) of avian pancreatic polypeptide: Small globular protein hormone.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(7): p. 4175-9.
142. Larhammar, D., et al., *Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type.* J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 10935-8.
143. Larhammar, D., et al., *Origins of the many NPY-family receptors in mammals.* Peptides, 2001. **22**(3): p. 295-307.
144. Palkovits, M., *Peptidergic neurotransmitters in the endocrine hypothalamus.* Ciba Found Symp, 1992. **168**: p. 3-10; discussion 10-5.
145. Kalra, S.P., et al., *Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight.* Endocr Rev, 1999. **20**(1): p. 68-100.
146. Chronwall, B.M., et al., *The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain.* Neuroscience, 1985. **15**(4): p. 1159-81.
147. Dumont, Y., et al., *Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues.* Prog Neurobiol, 1992. **38**(2): p. 125-67.
148. Cavadas, C., et al., *Catecholamine and neuropeptide Y secretion from human adrenal chromaffin cells: effect of nicotine and KCl.* Ann N Y Acad Sci, 2002. **971**: p. 332-4.
149. Ericsson, A., et al., *Detection of neuropeptide Y and its mRNA in megakaryocytes: enhanced levels in certain autoimmune mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5585-9.
150. Silva, A.P., C. Cavadas, and E. Grouzmann, *Neuropeptide Y and its receptors as potential therapeutic drug targets.* Clin Chim Acta, 2002. **326**(1-2): p. 3-25.
151. Nunes, A.F., et al., *Neuropeptide Y expression and function during osteoblast differentiation--insights from transthyretin knockout mice.* FEBS J, 2009. **277**(1): p. 263-75.

152. Igwe, J.C., et al., *Neuropeptide Y is expressed by osteocytes and can inhibit osteoblastic activity.* J Cell Biochem, 2009. **108**(3): p. 621-30.
153. Sousa, D.M., H. Herzog, and M. Lamghari, *NPY signalling pathway in bone homeostasis: Y1 receptor as a potential drug target.* Curr Drug Targets, 2009. **10**(1): p. 9-19.
154. Pedrazzini, T., F. Pralong, and E. Grouzmann, *Neuropeptide Y: the universal soldier.* Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(2): p. 350-77.
155. Cerda-Reverter, J.M. and D. Larhammar, *Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function, and molecular evolution.* Biochem Cell Biol, 2000. **78**(3): p. 371-92.
156. Kassis, S., et al., *Neuropeptide Y inhibits cardiac adenylate cyclase through a pertussis toxin-sensitive G protein.* J Biol Chem, 1987. **262**(8): p. 3429-31.
157. Westlind-Danielsson, A., et al., *Neuropeptide Y receptors and the inhibition of adenylate cyclase in the human frontal and temporal cortex.* Neurosci Lett, 1987. **74**(2): p. 237-42.
158. Herzog, H., et al., *Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 5794-8.
159. Ewald, D.A., P.C. Sternweis, and R.J. Miller, *Guanine nucleotide-binding protein Go-induced coupling of neuropeptide Y receptors to Ca2+ channels in sensory neurons.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(10): p. 3633-7.
160. Michel, M.C. and W. Rascher, *Neuropeptide Y: a possible role in hypertension?* J Hypertens, 1995. **13**(4): p. 385-95.
161. Motulsky, H.J. and M.C. Michel, *Neuropeptide Y mobilizes Ca2+ and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells.* Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 1): p. E880-5.
162. Millar, B.C., et al., *Positive and negative contractile effects of neuropeptide Y on ventricular cardiomyocytes.* Am J Physiol, 1991. **261**(6 Pt 2): p. H1727-33.
163. Xiong, Z. and D.W. Cheung, *ATP-Dependent inhibition of Ca2+-activated K+ channels in vascular smooth muscle cells by neuropeptide Y.* Pflugers Arch, 1995. **431**(1): p. 110-6.
164. Keffel, S., et al., *Neuropeptide-Y stimulation of extracellular signal-regulated kinases in human erythroleukemia cells.* J Pharmacol Exp Ther, 1999. **291**(3): p. 1172-8.
165. Hansel, D.E., B.A. Eipper, and G.V. Ronnett, *Regulation of olfactory neurogenesis by amidated neuropeptides.* J Neurosci Res, 2001. **66**(1): p. 1-7.
166. Cho, Y.R. and C.W. Kim, *Neuropeptide Y promotes beta-cell replication via extracellular signal-regulated kinase activation.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(3): p. 773-80.
167. Ruscica, M., et al., *Activation of the Y1 receptor by neuropeptide Y regulates the growth of prostate cancer cells.* Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1466-73.
168. Alvaro, A.R., et al., *Neuropeptide Y stimulates retinal neural cell proliferation--involvement of nitric oxide.* J Neurochem, 2008. **105**(6): p. 2501-10.
169. Nilsson, T., et al., *Vasodilation in human subcutaneous arteries induced by neuropeptide Y is mediated by neuropeptide Y Y1 receptors and is nitric oxide dependent.* Can J Physiol Pharmacol, 2000. **78**(3): p. 251-5.
170. Gregor, P., et al., *Cloning and characterization of a novel receptor to pancreatic polypeptide, a member of the neuropeptide Y receptor family.* FEBS Lett, 1996. **381**(1-2): p. 58-62.
171. Weinberg, D.H., et al., *Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor.* J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16435-8.

172. Matsumoto, M., et al., *Inactivation of a novel neuropeptide Y/peptide YY receptor gene in primate species.* J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27217-20.
173. Burkhoff, A., D.L. Linemeyer, and J.A. Salon, *Distribution of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor gene and it's absence in rat.* Brain Res Mol Brain Res, 1998. **53**(1-2): p. 311-6.
174. Larhammar, D. and E. Salaneck, *Molecular evolution of NPY receptor subtypes.* Neuropeptides, 2004. **38**(4): p. 141-51.
175. Wraith, A., et al., *Evolution of the neuropeptide Y receptor family: gene and chromosome duplications deduced from the cloning and mapping of the five receptor subtype genes in pig.* Genome Res, 2000. **10**(3): p. 302-10.
176. Lundell, I., et al., *Cloning and characterization of a novel neuropeptide Y receptor subtype in the zebrafish.* DNA Cell Biol, 1997. **16**(11): p. 1357-63.
177. Mullins, D.E., X. Zhang, and B.E. Hawes, *Activation of extracellular signal regulated protein kinase by neuropeptide Y and pancreatic polypeptide in CHO cells expressing the NPY Y(1), Y(2), Y(4) and Y(5) receptor subtypes.* Regul Pept, 2002. **105**(1): p. 65-73.
178. Gerald, C., et al., *Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype.* J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26758-61.
179. Bard, J.A., et al., *Cloning and functional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y, and peptide YY.* J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26762-5.
180. Stenkamp, R.E., et al., *Crystal structure of rhodopsin: a template for cone visual pigments and other G protein-coupled receptors.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1565**(2): p. 168-82.
181. Eva, C., et al., *Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family.* FEBS Lett, 1990. **271**(1-2): p. 81-4.
182. Ball, H.J., J. Shine, and H. Herzog, *Multiple promoters regulate tissue-specific expression of the human NPY-Y1 receptor gene.* J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 27272-6.
183. Herzog, H., et al., *Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor.* J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6703-7.
184. Marklund, U., et al., *Intron-mediated expression of the human neuropeptide Y Y1 receptor.* Mol Cell Endocrinol, 2002. **188**(1-2): p. 85-97.
185. Kopp, J., et al., *Expression of the neuropeptide Y Y1 receptor in the CNS of rat and of wild-type and Y1 receptor knock-out mice. Focus on immunohistochemical localization.* Neuroscience, 2002. **111**(3): p. 443-532.
186. Inui, A., *Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides--mediation of the actions of leptin.* Trends Neurosci, 1999. **22**(2): p. 62-7.
187. Nakamura, M., et al., *Identification of two isoforms of mouse neuropeptide Y-Y1 receptor generated by alternative splicing. Isolation, genomic structure, and functional expression of the receptors.* J Biol Chem, 1995. **270**(50): p. 30102-10.
188. Caberlotto, L., et al., *Localization of neuropeptide Y Y1 mRNA in the human brain: abundant expression in cerebral cortex and striatum.* Eur J Neurosci, 1997. **9**(6): p. 1212-25.
189. Wharton, J., et al., *Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 687-91.
190. Baldock, P.A., et al., *Novel role of Y1 receptors in the coordinated regulation of bone and energy homeostasis.* J Biol Chem, 2007. **282**(26): p. 19092-102.

191. Wahlestedt, C. and R. Hakanson, *Effects of neuropeptide Y (NPY) at the sympathetic neuroeffector junction. Can pre- and postjunctional receptors be distinguished?* Med Biol, 1986. **64**(2-3): p. 85-8.
192. Grundemar, L., et al., *Characterization of vascular neuropeptide Y receptors.* Br J Pharmacol, 1992. **105**(1): p. 45-50.
193. Wahlestedt, C., et al., *Modulation of anxiety and neuropeptide Y-Y1 receptors by antisense oligodeoxynucleotides.* Science, 1993. **259**(5094): p. 528-31.
194. Thiele, T.E., M.T. Koh, and T. Pedrazzini, *Voluntary alcohol consumption is controlled via the neuropeptide Y Y1 receptor.* J Neurosci, 2002. **22**(3): p. RC208.
195. Wheway, J., et al., *A fundamental bimodal role for neuropeptide Y1 receptor in the immune system.* J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1527-38.
196. Hansel, D.E., B.A. Eipper, and G.V. Ronnett, *Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor.* Nature, 2001. **410**(6831): p. 940-4.
197. Howell, O.W., et al., *Neuropeptide Y stimulates neuronal precursor proliferation in the post-natal and adult dentate gyrus.* J Neurochem, 2005. **93**(3): p. 560-70.
198. Milenkovic, I., et al., *Neuropeptide Y-evoked proliferation of retinal glial (Muller) cells.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2004. **242**(11): p. 944-50.
199. Doyle, K.L., et al., *Y1 receptors are critical for the proliferation of adult mouse precursor cells in the olfactory neuroepithelium.* J Neurochem, 2008. **105**(3): p. 641-52.
200. Agasse, F., et al., *Neuropeptide Y promotes neurogenesis in murine subventricular zone.* Stem Cells, 2008. **26**(6): p. 1636-45.
201. Pedrazzini, T., *Importance of NPY Y1 receptor-mediated pathways: assessment using NPY Y1 receptor knockouts.* Neuropeptides, 2004. **38**(4): p. 267-75.
202. Lee, N.J., et al., *Critical role for Y1 receptors in mesenchymal progenitor cell differentiation and osteoblast activity.* J Bone Miner Res, 2010. **25**(8): p. 1736-47.
203. Krause, J., et al., *Neuropeptide Y1 subtype pharmacology of a recombinantly expressed neuropeptide receptor.* Mol Pharmacol, 1992. **41**(5): p. 817-21.
204. Ferguson, S.S., *Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling.* Pharmacol Rev, 2001. **53**(1): p. 1-24.
205. Okamoto, T., et al., *Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane.* J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5419-22.
206. Fabry, M., et al., *Monitoring of the internalization of neuropeptide Y on neuroblastoma cell line SK-N-MC.* Eur J Biochem, 2000. **267**(17): p. 5631-7.
207. Parker, S.L., et al., *Cloned neuropeptide Y (NPY) Y1 and pancreatic polypeptide Y4 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells show considerable agonist-driven internalization, in contrast to the NPY Y2 receptor.* Eur J Biochem, 2001. **268**(4): p. 877-86.
208. Ammar, D.A., et al., *Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor gene.* Genomics, 1996. **38**(3): p. 392-8.
209. Michel, M.C., et al., *XVI. International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors.* Pharmacol Rev, 1998. **50**(1): p. 143-50.
210. Zimanyi, I.A., Z. Fathi, and G.S. Poindexter, *Central control of feeding behavior by neuropeptide Y.* Curr Pharm Des, 1998. **4**(4): p. 349-66.
211. Rose, P.M., et al., *Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor.* J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 29038.

212. Goumain, M., et al., *Identification and distribution of mRNA encoding the Y1, Y2, Y4, and Y5 receptors for peptides of the PP-fold family in the rat intestine and colon.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(1): p. 52-6.
213. Pheng, L.H., et al., *The dog saphenous vein: a sensitive and selective preparation for the Y2 receptor of neuropeptide Y.* Eur J Pharmacol, 1997. **327**(2-3): p. 163-7.
214. Baldock, P.A., et al., *Hypothalamic Y2 receptors regulate bone formation.* J Clin Invest, 2002. **109**(7): p. 915-21.
215. Caberlotto, L., et al., *Regional distribution of neuropeptide Y Y2 receptor messenger RNA in the human post mortem brain.* Neuroscience, 1998. **86**(1): p. 167-78.
216. Zhang, X., et al., *Expression and regulation of the neuropeptide Y Y2 receptor in sensory and autonomic ganglia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 729-34.
217. Sainsbury, A., et al., *Synergistic effects of Y2 and Y4 receptors on adiposity and bone mass revealed in double knockout mice.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(15): p. 5225-33.
218. Teixeira, L., et al., *NPY revealed as a critical modulator of osteoblast function in vitro: new insights into the role of Y1 and Y2 receptors.* J Cell Biochem, 2009. **107**(5): p. 908-16.
219. Gicquiaux, H., et al., *Rapid internalization and recycling of the human neuropeptide Y Y(1) receptor.* J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6645-55.
220. Darby, K., et al., *Assignment of the Y4 receptor gene (PPYR1) to human chromosome 10q11.2 and mouse chromosome 14.* Genomics, 1997. **46**(3): p. 513-5.
221. Lundell, I., et al., *Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY.* J Biol Chem, 1995. **270**(49): p. 29123-8.
222. Lundell, I., et al., *The cloned rat pancreatic polypeptide receptor exhibits profound differences to the orthologous receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 5111-5.
223. Eriksson, H., et al., *The cloned guinea pig pancreatic polypeptide receptor Y4 resembles more the human Y4 than does the rat Y4.* Regul Pept, 1998. **75-76**: p. 29-37.
224. Berglund, M.M., et al., *Studies of the human, rat, and guinea pig Y4 receptors using neuropeptide Y analogues and two distinct radioligands.* Peptides, 2001. **22**(3): p. 351-6.
225. Gehlert, D.R., et al., *Characterization of the peptide binding requirements for the cloned human pancreatic polypeptide-preferring receptor.* Mol Pharmacol, 1996. **50**(1): p. 112-8.
226. Voisin, T., et al., *Functional and molecular properties of the human recombinant Y4 receptor: resistance to agonist-promoted desensitization.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. **292**(2): p. 638-46.
227. Herzog, H., et al., *Overlapping gene structure of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation.* Genomics, 1997. **41**(3): p. 315-9.
228. Gerald, C., et al., *A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake.* Nature, 1996. **382**(6587): p. 168-71.
229. Hu, Y., et al., *Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior.* J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 26315-9.
230. Nichol, K.A., et al., *Conservation of expression of neuropeptide Y5 receptor between human and rat hypothalamus and limbic regions suggests an integral role in central neuroendocrine control.* J Neurosci, 1999. **19**(23): p. 10295-304.
231. Naveilhan, P., et al., *Complementary and overlapping expression of Y1, Y2 and Y5 receptors in the developing and adult mouse nervous system.* Neuroscience, 1998. **87**(1): p. 289-302.

232. Bischoff, A. and M.C. Michel, *Emerging functions for neuropeptide Y5 receptors.* Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**(3): p. 104-6.
233. Sambrook, P. and C. Cooper, *Osteoporosis.* Lancet, 2006. **367**(9527): p. 2010-8.
234. Baldock, P.A., et al., *Hypothalamic regulation of cortical bone mass: opposing activity of Y2 receptor and leptin pathways.* J Bone Miner Res, 2006. **21**(10): p. 1600-7.
235. Baldock, P.A., et al., *Hypothalamic control of bone formation: distinct actions of leptin and y2 receptor pathways.* J Bone Miner Res, 2005. **20**(10): p. 1851-7.
236. Ducy, P., et al., *Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass.* Cell, 2000. **100**(2): p. 197-207.
237. Takeda, S., et al., *Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system.* Cell, 2002. **111**(3): p. 305-17.
238. Gordeladze, J.O. and J.E. Reseland, *A unified model for the action of leptin on bone turnover.* J Cell Biochem, 2003. **88**(4): p. 706-12.
239. Bjurholm, A., *Neuroendocrine peptides in bone.* Int Orthop, 1991. **15**(4): p. 325-9.
240. Tabarowski, Z., K. Gibson-Berry, and S.Y. Felten, *Noradrenergic and peptidergic innervation of the mouse femur bone marrow.* Acta Histochem, 1996. **98**(4): p. 453-7.
241. Lundberg, P. and U.H. Lerner, *Expression and regulatory role of receptors for vasoactive intestinal peptide in bone cells.* Microsc Res Tech, 2002. **58**(2): p. 98-103.
242. Mori, T., et al., *Substance P regulates the function of rabbit cultured osteoclast; increase of intracellular free calcium concentration and enhancement of bone resorption.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **262**(2): p. 418-22.
243. Shih, C. and G.W. Bernard, *Calcitonin gene related peptide enhances bone colony development in vitro.* Clin Orthop Relat Res, 1997(334): p. 335-44.
244. Baldock, P.A., et al., *Neuropeptide Y knockout mice reveal a central role of NPY in the coordination of bone mass to body weight.* PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8415.
245. Lin, S., et al., *Compensatory changes in [125I]-PYY binding in Y receptor knockout mice suggest the potential existence of further Y receptor(s).* Neuropeptides, 2005. **39**(1): p. 21-8.
246. Allison, S.J., et al., *Conditional deletion of hypothalamic Y2 receptors reverts gonadectomy-induced bone loss in adult mice.* J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23436-44.
247. Shi, Y.C. and P.A. Baldock, *Central and peripheral mechanisms of the NPY system in the regulation of bone and adipose tissue.* Bone, 2011.
248. Parker, R.M. and H. Herzog, *Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain.* Eur J Neurosci, 1999. **11**(4): p. 1431-48.
249. Dumont, Y., et al., *Differential distribution of neuropeptide Y1 and Y2 receptors in the rat brain.* Eur J Pharmacol, 1990. **191**(3): p. 501-3.
250. Lundberg, P., et al., *Greater bone formation of Y2 knockout mice is associated with increased osteoprogenitor numbers and altered Y1 receptor expression.* J Biol Chem, 2007. **282**(26): p. 19082-91.
251. Stanley, B.G., et al., *Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion.* Peptides, 1985. **6**(6): p. 1205-11.
252. Welch, C.C., et al., *Preference and diet type affect macronutrient selection after morphine, NPY, norepinephrine, and deprivation.* Am J Physiol, 1994. **266**(2 Pt 2): p. R426-33.
253. Zarjevski, N., et al., *Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity.* Endocrinology, 1993. **133**(4): p. 1753-8.

254. Wieland, H.A., et al., *The role of NPY in metabolic homeostasis: implications for obesity therapy.* Expert Opin Investig Drugs, 2000. **9**(6): p. 1327-46.
255. Clark, J.T., et al., *Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats.* Endocrinology, 1984. **115**(1): p. 427-9.
256. Stanley, B.G., et al., *Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity.* Peptides, 1986. **7**(6): p. 1189-92.
257. Larsen, P.J., et al., *Activation of central neuropeptide Y Y1 receptors potently stimulates food intake in male rhesus monkeys.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(10): p. 3781-91.
258. Raposinho, P.D., et al., *Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism.* Mol Cell Endocrinol, 2001. **185**(1-2): p. 195-204.
259. Kalra, S.P., et al., *Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10931-5.
260. Williams, G., et al., *Increased hypothalamic neuropeptide Y concentrations in diabetic rat.* Diabetes, 1988. **37**(6): p. 763-72.
261. Schwartz, M.W., et al., *Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus.* J Clin Invest, 1996. **98**(5): p. 1101-6.
262. McKibbin, P.E., et al., *Insulin deficiency is a specific stimulus to hypothalamic neuropeptide Y: a comparison of the effects of insulin replacement and food restriction in streptozocin-diabetic rats.* Peptides, 1992. **13**(4): p. 721-7.
263. Sipols, A.J., D.G. Baskin, and M.W. Schwartz, *Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression.* Diabetes, 1995. **44**(2): p. 147-51.
264. Sahu, A., et al., *Insulin and insulin-like growth factor II suppress neuropeptide Y release from the nerve terminals in the paraventricular nucleus: a putative hypothalamic site for energy homeostasis.* Endocrinology, 1995. **136**(12): p. 5718-24.
265. Schwartz, M.W., et al., *Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice.* Diabetes, 1996. **45**(4): p. 531-5.
266. White, J.D., et al., *Increased hypothalamic content of preproneuropeptide-Y messenger ribonucleic acid in streptozotocin-diabetic rats.* Endocrinology, 1990. **126**(2): p. 765-72.
267. Inui, A., *Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved?* Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**(2): p. 43-6.
268. Dumont, Y., et al., *Species differences in the expression and distribution of the neuropeptide Y Y1, Y2, Y4, and Y5 receptors in rodents, guinea pig, and primates brains.* J Comp Neurol, 1998. **402**(3): p. 372-84.
269. Pedrazzini, T., et al., *Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor.* Nat Med, 1998. **4**(6): p. 722-6.
270. Kanatani, A., et al., *A typical Y1 receptor regulates feeding behaviors: effects of a potent and selective Y1 antagonist, J-115814.* Mol Pharmacol, 2001. **59**(3): p. 501-5.
271. Marsh, D.J., et al., *Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity.* Nat Med, 1998. **4**(6): p. 718-21.
272. Ruohonen, S.T., et al., *Transgenic mice overexpressing neuropeptide Y in noradrenergic neurons: a novel model of increased adiposity and impaired glucose tolerance.* Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1517-25.

273. Hogan, B., *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual.* Painview (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
274. Friedman, M.S., S.M. Oyserman, and K.D. Hankenson, *Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2.* J Biol Chem, 2009. **284**(21): p. 14117-25.
275. Beck, B., *Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1471): p. 1159-85.
276. Ferguson, V.L., et al., *Bone development and age-related bone loss in male C57BL/6J mice.* Bone, 2003. **33**(3): p. 387-98.
277. Allison, S.J., et al., *Critical interplay between neuropeptide Y and sex steroid pathways in bone and adipose tissue homeostasis.* J Bone Miner Res, 2009. **24**(2): p. 294-304.
278. Yamaguchi, A. and A.J. Kahn, *Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipocytic developmental potential.* Calcif Tissue Int, 1991. **49**(3): p. 221-5.
279. Owen, M. and A.J. Friedenstein, *Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors.* Ciba Found Symp, 1988. **136**: p. 42-60.
280. de Meester, I., et al., *Dipeptidyl peptidase IV substrates. An update on in vitro peptide hydrolysis by human DPPIV.* Adv Exp Med Biol, 2003. **524**: p. 3-17.
281. Abid, K., et al., *Kinetic study of neuropeptide Y (NPY) proteolysis in blood and identification of NPY3-35: a new peptide generated by plasma kallikrein.* J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 24715-24.
282. Ott, S.M., *Sclerostin and Wnt signaling--the pathway to bone strength.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(12): p. 6741-3.
283. Mantila Roosa, S.M., Y. Liu, and C.H. Turner, *Gene expression patterns in bone following mechanical loading.* J Bone Miner Res, 2011. **26**(1): p. 100-12.
284. Ekblad, E., et al., *Neuropeptide Y co-exists and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibers.* Regul Pept, 1984. **8**(3): p. 225-35.

8. POPIS KRATICA

3'-UTR	3' netranslatirana regija
5'-UTR	5' netranslatiranA regijA (prema engl. *5'untranslated region*)
AC	adenil ciklaza
AP	(prema engl. *alkaline phosphatase*)
AP1	aktivacijskog proteina 1
bGHpolyA	sekvenca poliadenilacije goveđeg hormona rasta (prema engl. *bovine growth hormone polyadenylation sequence*)
BMP	koštani morfogenetski proteini (prema engl. *bone morphogenetic proteins*)
BMSC	stanice strome koštane srži (prema engl. *bone marrow stromal cells*)
BMU	temeljna višestanična jedinica (prema engl. *basic multicellular unit*)
BSA	goveđi serumski albumin (prema engl. *bovine serum albumin*)
cAMP	ciklički adenozin-monofosfat (prema engl. *cyclic adenosine monophosphate)*
cDNA	komplementarnu DNA (prema engl. *complementary DNA*)
CFU-GM	(prema engl. *colony-forming unit for granulocytes and macrophages*)
CFU-M	(prema engl. *colony-forming unit for macrophages*)
CGRP	peptid vezan za gen kalcitonina (prema engl. *calcitonin-gene related peptide*)
VIP	vazoaktivni intestinalni polipeptid
ClC-7	kloridni kanal
COL1A1	alfa 1 lanac kolagena tipa 1
CPON	C-terminalni peptid NPY proteina (prema engl. *C-terminal flanking peptide of neuropeptide Y*)
CXCL12	(prema engl. *chemokine (C-X-C motif) ligand 12*)
DAG	diacilglicerol
DC-STAMP	(prema engl. *dendritic cell-specific transmembrane protein*)
Dkk	Dickkopf
DMP-1	dentin-matrix protein-1 (prema engl. *dentin matrix protein-1*)
EBF2	rani faktor stanica B (prema engl. *early B-cell factor 2*)

ECD	vanstanične domene (prema engl. *extracellular domain*)
EDTA	(prema engl. *etilen-diaminotetra-octena kiselina*)
EDTA	(prema engl. *etilen-diaminotetra-octena kiselina*),
EL	vanstanične omče (prema engl. *extracellular loop*)
FADD	Fas povezani protein sa smrtonosnom domenom (prema engl. *Fas associated death domain*)
FCS	fetalni serum (prema engl. *fetal calf serum*)
FGF	faktor rasta fibroblasta (prema engl. *fibroblast growth factor*)
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (prema engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)
GDP	guanozin difosfat (prema engl. *guanosine diphosphate*)
GM-CSF	granulocitno-makrofagni čimbenik rasta kolonija (prema engl. *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*)
GSK	glikogen sintaza kinaza
GTP	guanozin trifosfat (prema engl. *guanosine triphosphate*)
ICD	unutarstaničnA domenA (prema engl. *intracellular domain*)
ICV	Intercerebroventrikularna
IFN-γ	interferon-γ
IGF	(prema engl. *insulin-like growth factors*)
IL-1	interleukin 1
IL-7	interleukin 7
IP_3	inozitol 3,4,5-trifosfat (prema engl. *inositol trisphosphate*)
IRES	(prema engl. *internal ribosomal entry site*)
JNK	(prema engl. *Jun N-terminal kinase*)
LEF	faktor pojačivač limfocita (prema engl. *lymphocyte enhancer factor*)
LH	luteinizirajući hormon
LRP5/6	lipoprotein 5 i 6
MAP	mitogenom aktivirane protein

MAR	brzina odlaganja minerala (prema engl. *mineral apposition rate*)
mCOB	kultura mišjih kalvarijskih stanica (prema engl. *mouse calvarial osteoblasts*)
M-CSF	čimbenik makrofagnog čimbenika rasta kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*)
MMP	metaloproteinaze matriksa 14 (prema engl. *matrix metalloproteinase*)
NFATc1	jezgrin čimbenik aktiviranih limfocita T (prema engl. *nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin depended 1*)
NOS/sGC	sintetaza dušikovog monoksida/topljiva gvanil-ciklaza (prema engl. *nitric oxide synthase/ soluble guanylyl cyclase*)
NPY	Neuropeptid Y
OC	osteokalcin (prema engl. *osteocalcin*)
OPG	osteoprotegerin
Osx	osterix
PBS	(prema engl. *phosphate buffered saline*)
PC	prohormonska konvertaza (prema engl. *prohormone convertase*)
PDGF	faktor rasta trombocita (prema engl. *platelet-derived growth factor*)
PIP_2	fosfatidil-inozitol 4,5-difosfat (prema engl. *phosphatidyl inositol-4, 5-bisphosphate*)
PKA	protein kinaza A
PLC	fosfolipaza C (prema engl. *phospholipase C*)
PP	pankreasni polipeptid
PPAR-δ	(prema engl. *peroxisome proliferator-activated receptor delta*)
PTH	paratiroidni hormon (prema engl. *parathyroid hormone*)
PYY	peptid YY
RANK	poticatelj receptora NF-kB (prema engl. *activator of nuclear factor kappa-B*)
RANKL	ligand poticatelja receptora NF-kB (prema engl. *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*).
ROCC	receptorima upravljani kalcijevi kanali (prema engl. *receptor-operated calcium channel*)

RT	reverzno prepisivanje (prema engl. *reverse transcription*)
RT-qPCR	kvantitativni PCR u stvarnom vremenu (prema engl. *real-time quantitative PCR*)
Runx2	protein „runt“ (prema engl. *runt related transcription factor 2*)
SDF-1	čimbenik stromalnih stanica-1 (prema engl. *stromal cell-derived factor-1*)
SP	supstanca P
TAZ	(prema engl. *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*)
TCF	faktor stanica T (prema eng. *T-cell faktor*)
TGF-β	transformacijski faktor rasta-β (prema engl. *transforming growth factor- β*)
TM	transmembranska domena
TNF	čimbenik tumorske nekroze (prema engl. *tumor necrosis factor*)
TNF-α	(prema engl. *tumor necrosis factor- α*)
TRAF	TNF udružene receptorske čimbenike (prema engl. *tumor necrosis factor receptor-associated factor*)
TRAP	kisela fosfataza otporna na tartarat (prema engl. *tartarate-resistent acid phosphatase*)
VEGF	čimbenik vaskularnog endotelnog faktora rasta (prema engl. *vascular endothelial growth factor)*
αMEM	(prema engl. *minimum essential medium alpha*)

9. ŽIVOTOPIS

Igor Matić rođen je 5. Lipnja 1981. godine u Rijeci, gdje završava osnovnu i srednju Prvu riječku hrvatsku gimnaziju. Nakon završetka srednjoškolskog obrazovanja, 2000. godine upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer molekularne biologije. Diplomski rad izradio je u KBC Rebro pod vodstvom prof. dr. sc. Branka Malenice i dr. sc. Sanje Davidović-Mrsić te 2006. godine diplomirao na temi „Mutacije gena N-myc i lokusa 11q23 u neuroblastomu“.

Od 2006. godine radi na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Biološkom odsjeku, Zavodu za molekularnu biologiju. Iste godine upisuje poslijediplomski doktorski studij na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta te radi na projektu MZOS-a „Učinak ekspresije FADD-a na karcinogenezu izazvanu UV zračenjem“ pod vodstvom prof. dr. sc. Biserke Nagy. Odlaskom prof. dr. sc. Biserke Nagy u mirovinu nastavlja svoj istraživački rad pod vodstvom doc. dr. sc. Inge Marijanović. Za vrijeme svog poslijediplomskog obrazovanja 2010. godine boravi 4 mjeseca na University Hospital Centre Groningen, Department of Hematology and Department of Stem Cell Biology gdje se pod vodstvom prof. dr. sc. Edo Vellenga i dr. sc. Hein Schepersa bavi problematikom diferencijalne ekspresije gena u leukemijskim matičnim stanicama te uvodi metodu single-cell multiplex PCR-a. 2010. i 2011. godine boravi 13 mjeseci na University of Connecticut Health Center, Department of Reconstructive Sciences gdje pod vodstvom prof. dr. sc. Ive Kalajzića završava eksperimentalni dio svojeg doktorskog istraživanja.

Igor Matić član je Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR) i The European Association for Cancer Research (EACR). Sudjelovao je na više međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova te je objavio 2 rada citirana u Current Contents-u.